



HAL
open science

Étude de la réponse cellulaire et des Vésicules Extracellulaires produites par des macrophages primaires exposés aux particules fines (PM .)

Amélie Heliot

► **To cite this version:**

Amélie Heliot. Étude de la réponse cellulaire et des Vésicules Extracellulaires produites par des macrophages primaires exposés aux particules fines (PM .). Toxicologie. Université du Littoral Côte d'Opale, 2018. Français. NNT : 2018DUNK0522 . tel-02951813

HAL Id: tel-02951813

<https://theses.hal.science/tel-02951813>

Submitted on 29 Sep 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 de la réponse cellulaire et des Vésicules
Extracellulaires produites par des macrophages primaires
exposés aux particules fines (PM_{2.5})**

Présentée par :

Amélie HELIOT

Le 28 septembre 2018

COMPOSITION DU JURY :

Dr Dominique LAGADIC-GOSSMANN

Prof. Marc PALLARDY

Prof. Nadira DELHEM

Prof. Christelle MONTEIL

Dr Hélène DESQUEYROUX

Dr Perrine MARTIN

Prof. Dominique COURCOT

Université de Rennes 1

Université Paris-Sud

Université de Lille

Université de Rouen

ADEME

Université du Littoral Côte d'Opale

Université du Littoral Côte d'Opale

Rapporteur

Rapporteur

Examinateur

Examinateur

Membre invité

Encadrant

Directeur

Pour Raphaël, Aurélien, Audrey et Pauline

Pour mes Parents

Remerciements

Arrivant au terme de ces trois années de thèse, je souhaite remercier toutes les personnes ayant contribué à l'aboutissement de ce travail.

Je tiens tout d'abord à remercier les membres de mon jury de thèse, le Docteur Dominique LAGADIC-GOSSMAN et le Professeur Marc PALLARDY pour avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse en tant que rapporteurs, le Professeur Nadira DELHEM ainsi que le Professeur Christelle MONTEIL pour avoir accepté d'être les examinateurs de ma thèse et pour leurs conseils lors des différents comités de suivi de thèse.

Je tiens à remercier particulièrement mon directeur de thèse, le Professeur Dominique COURCOT. Merci pour votre accueil chaleureux au sein de l'équipe, mais aussi et surtout pour votre gentillesse, votre disponibilité malgré vos nombreuses tâches et votre attention tout au long de ces années. Je vous remercie pour les soirées et les weekends passés à corriger ce manuscrit et tous vos conseils et encouragements. C'était un grand plaisir que de travailler avec vous.

J'adresse mes remerciements les plus chaleureux au Docteur Perrine MARTIN qui m'a encadrée depuis mon stage de Master 1. Merci Perrine pour m'avoir donnée ma chance et avoir cru en moi. Ces années passées à travailler ensemble resteront de très bons moments. Tu m'as transmis énormément de connaissances et de savoir-faire. Tes conseils et tes remarques m'ont permis d'arriver au bout de ces travaux. Je te remercie de tout le temps passé à mes côtés et de ta confiance. Merci d'avoir fait de moi un des membres à part entière de la Vesiteam ! Une bien jolie découverte que ces Vésicules Extracellulaires !

Je souhaiterais remercier le Professeur Frédéric LEDOUX pour son implication dans ma thèse. Fred, merci pour tout ce que tu as fait, les manips, les résultats... Tu as contribué pour beaucoup dans ces travaux. Et au-delà du volet professionnel, merci pour ta bonne humeur, les rires, les chansons et les moments partagés.

Je remercie également le Centre Commun de Mesures pour son travail dans le prélèvement et la caractérisation des particules.

Gauthier.... Je crois que je ne pourrai jamais te remercier assez pour tout ce que tu as fait pour moi. Cette thèse c'est aussi toi. Parce que tout cela ne serait pas arrivé si tu n'avais pas été là. Tu as toujours été présent, à la paillasse mais aussi dans les autres moments. Merci pour toutes les manips que tu as gérées, refaites et j'en passe... Tu as été mon allié et mon soutien depuis ton arrivée. Merci de ton amitié, elle est précieuse !

Yann, Docteur Landkocz ! Pour toi aussi les mots me manquent. Merci d'avoir été là depuis mon tout premier stage en 2014. Les années ont vite passées et travailler avec toi à été un réel plaisir. Merci de tes conseils, ton temps, ta bonne humeur, merci aussi d'avoir trouvé des solutions quand je n'y arrivais pas et tout le reste, je ne pourrai pas tout énumérer ! J'ai de la chance de t'avoir rencontré et l'honneur que tu sois devenu mon ami.

Je souhaite remercier le Docteur Sylvain BILLET, le Docteur Anthony VERDIN, Véro et tous les autres membres qui font ou ont fait partie de l'équipe. Merci à tous pour ces moments partagés, merci de vos conseils et de votre gentillesse. Vous avez contribué à ce que cette thèse se passe pour le mieux.

Merci à tous les doctorants, collègues et membres de la MREI 1 et 2 pour les moments agréables passés en votre compagnie, dans le laboratoire ou même à l'extérieur.

Un merci tout particulier à « pépère » ! Tu es une de mes plus belles rencontres Cyril. Je ne sais pas comment j'aurai fait sans toi pour traverser ces quatre dernières années. Merci pour tout, nos discussions, ton aide tout le temps et sans condition. Tout simplement, merci...

Guitta et Clémence !! Merci les filles, merci pour votre amitié, nos moments de rires, nos sorties et soirées. J'ai de la chance d'avoir des amies comme vous.

Je remercie mes ami(e)s de longues dates, ils se reconnaîtront et savent déjà tout ce que j'ai envie de leur dire. Merci Bertrand et Alex ! Et merci à Aurélie et Marie. Des amis comme vous, c'est assez exceptionnel.

Et puis, il y a des rencontres que l'on n'attendait pas et qui viennent ajouter des jolies choses dans une vie. Merci Julien pour avoir relu mon manuscrit, pour ton soutien

ces dernières semaines, pour avoir su trouver les mots quand il le fallait et pour le reste aussi...

Enfin je voudrai remercier ma famille : mon frère et ma sœur, Pauline, et mon petit Raphaël et surtout mes parents Emmanuel et Ghislaine. Sans vous, je ne serai pas là. Sans vous, tout cela n'aurait pas été possible. Vous avez été ma force et mon réconfort. J'ai de la chance de vous avoir et je vous aime énormément.

SOUTIENS FINANCIERS

La réalisation de ce travail a été rendue possible grâce au soutien :

- ✚ de l'Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie (ADEME), de la Région Hauts-de-France et de l'Unité de Chimie Environnementale et Interactions sur le Vivant (UCEiV, EA4492) qui ont financé mes travaux de thèse.



- ✚ des partenaires qui ont financé le projet de recherche : la Région Hauts-de-France, dans le cadre de l'APR Environnement, Santé, Société et l'ITMO Cancer de l'Alliance Nationale pour les Sciences de la Vie et de la Santé (AVIESAN) dans le cadre du plan cancer 2014-2019 (2015/1/028) et du programme Environnement-Santé-Travail de l'Agence Nationale de Sécurité Sanitaire Alimentation, Environnement, Santé (ANSES).



VALORISATION SCIENTIFIQUE

Communications affichées dans un congrès international

ISEV 2015 (*International Society for Extracellular Vesicles*)- Washington, USA, Avril 2015

« Differential profiling of smokers vs non-smokers Broncho Alveolar Lavages extracellular vesicles: towards tobacco smoke exposition biomarkers identification? »

Amélie Héliot, Yann Landkocz, Françoise Roy Saint-Georges, Pierre Gosset, Sylvain Billet, Dominique Courcot, Pirouz Shirali, Perrine J. Martin

EUROTOX 2015 – Porto, Septembre 2015

« Indirect genotoxicity of diesel engine emission: An *in vivo* study under controlled conditions »

Yann Landkocz, Pierre Gosset, Amélie Héliot, Cécile Corbière, Cathy Vendeville, Veronika Kevarec, Sylvain Billet, Anthony Verdin, Christelle Monteil, David Preterre, Jean-Paul Morin, François Sichel, Thierry Douki, Perrine J. Martin

ISEV 2017 (*International Society of Extracellular Vesicles*) – Toronto, Mai 2017

1. « Smoker Extracellular Vesicles influence status of Human Bronchial Epithelial Cells »

Amélie Héliot, Gauthier Tremolet, Yann Landkocz, Dorothée Dewaele, Frédéric Ledoux, Dominique Courcot, Perrine J. Martin

2. « Fine Particulate Matter (PM_{2.5}) exposure consequences on macrophages polarization and release Extracellular Vesicles (EVs) »

Amélie Héliot, Gauthier Tremolet, Yann Landkocz, Dorothée Dewaele, Frédéric Ledoux, Dominique Courcot, Perrine J. Martin

Communications affichées dans un congrès national

SFTG 2015 (*Société Française de Toxicologie Génétique*) - Caen, France, Juillet 2015

« Analyses différentielles des vésicules extracellulaires issues de lavages broncho-alvéolaires de fumeurs vs non-fumeurs : vers l'identification de biomarqueurs d'exposition et d'effet à la fumée de cigarette ? »

Amélie Héliot, Yann Landkocz, Françoise Roy Saint-Georges, Pierre Gosset, Sylvain Billet, Dominique Courcot, Pirouz Shirali, Perrine J. Martin

Cancéropôle Nord-Ouest 2016 *Deauville, France, 18-20 Mai 2016*

« Effet des vésicules extracellulaires sur les cellules épithéliales bronchiques : initiation d'un processus d'inflammation vers un processus de transformation ? »

Amélie Héliot, Yann Landkocz, Françoise Roy Saint-Georges, Pierre Gosset, Sylvain Billet, Dominique Courcot, Pirouz Shirali, Perrine J. Martin

Journée de lancement CPER Climibio *Lille, France, 6 septembre 2017*

« Impact des polluants atmosphériques sur la santé respiratoire : Identification de biomarqueurs d'exposition ou d'effet des contaminants chimiques gazeux et particulaires.»

Margueritta Al Zallouha, Ghidaa Badran, Amélie Héliot, Clémence Méausoone, Pamela Melki, Awa Ndong, Mireille Borgie, Simone Poddighe, Gauthier Tremolet, Anthony Verdin, Sylvain Billet, Yann Landkocz, Frédéric Ledoux, Perrine J. Martin, Dominique Courcot

Communication orale dans un congrès national

SFTG 2015 (*Société Française de Toxicologie Génétique*) - *Caen, France, Juillet 2015*

« Analyses différentielles des vésicules extracellulaires issues de lavages broncho-alvéolaires de fumeurs vs non-fumeurs : vers l'identification de biomarqueurs d'exposition et d'effet à la fumée de cigarette ? »

Amélie Héliot, Yann Landkocz, Françoise Roy Saint-Georges, Pierre Gosset, Sylvain Billet, Dominique Courcot, Pirouz Shirali, Perrine J. Martin

➤ *Obtention du Prix Jeune Chercheur de la SFTG 2015*

JIQA 2017 (*Journées Interdisciplinaires de la Qualité de l'Air*) – *Lille, Février 2017*

« Les Vésicules Extracellulaires comme nouveaux biomarqueurs de toxicité de la pollution atmosphérique »

Amélie Héliot, Gauthier Tremolet, Yann Landkocz, Frédéric Ledoux, Fabrice Cazier
Dominique Courcot, Perrine J. Martin

FSEV 2017 (French Society of Extracellular Vesicles) – Paris, Novembre 2017

« Fine particulate matter (PM_{2,5}) exposure consequences on macrophages polarization and released extracellular vesicles »

Amélie Héliot, Gauthier Tremolet, Yann Landkocz, Dorothée Dewaele, Frédéric Ledoux, Dominique Courcot, Perrine J. Martin

Communication orale dans un congrès international

CES 2017 (Colloque International Francophone en Environnement et Santé) – Dunkerque, Octobre 2017

« Les Vésicules Extracellulaires comme nouveaux biomarqueurs de toxicité de la pollution atmosphérique »

Amélie Héliot, Gauthier Tremolet, Yann Landkocz, Frédéric Ledoux, Fabrice Cazier, Dominique Courcot, Perrine J. Martin

Publication dans des revues scientifiques internationales à comité de lecture

« Smoker extracellular vesicles influence status of human bronchial epithelial cells »

Amélie Héliot, Yann Landkocz, Françoise Roy Saint-Georges, Pierre Gosset, Sylvain Billet, Dominique Courcot, Pirouz Shirali, Perrine J. Martin

International Journal of Hygiene and Environmental Health, 2016 Dec 30. pii: S1438-4639(16)30277-2. doi: 10.1016/j.ijheh.2016.12.010.

Articles publiés dans des actes de colloques / congrès : avec comité de lecture

« Fine particulate matter (PM_{2,5}) exposure consequences on macrophages polarization and released extracellular vesicles (EVs) »

Amélie Héliot, Gauthier Tremolet, Yann Landkocz, Dorothée Dewaele, Frédéric Ledoux, Dominique Courcot, Perrine J. Martin

Abstract Book: ISEV2017 - Journal of Extracellular Vesicles. Taylor & Francis, p. 75.

TABLE DES MATIERES

Remerciements	5
SOUTIENS FINANCIERS	9
VALORISATION SCIENTIFIQUE	11
TABLE DES MATIERES	14
LISTE DES FIGURES.....	18
LISTES DES TABLEAUX.....	22
GLOSSAIRE	24
INTRODUCTION	32
I. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	38
A. POLLUTION ATMOSPHERIQUE	38
1. Historique	38
1. Réglementation.....	39
2. Pollution atmosphérique particulaire	42
a) Paramètres physiques.....	44
b) Paramètres chimiques.....	45
3. Pollution et santé publique.....	50
B. APPAREIL RESPIRATOIRE	53
1. Structure	53
2. Histologie	55
3. Déposition des PM _{2.5} le long de l'appareil respiratoire	57
4. Rétention et clairance pulmonaire des particules.....	59
C. MACROPHAGES	60
1. Origine des macrophages.....	61
2. Fonctions	63
3. Polarisation.....	64
a) Polarisation M1	65
b) Polarisation M2	66
4. Macrophages et PM _{2.5}	69
D. TOXICITE DES PM_{2.5}	70
1. Stress Oxydant.....	71
2. Inflammation	73
3. Apoptose.....	75
4. Métabolisation des composants des PM _{2.5}	77
a) Généralités	77

b)	Métabolisation des composés organiques des PM _{2.5}	79
E.	VESICULES EXTRACELLULAIRES	82
1.	Biogénèse	83
a)	Biogénèse des exosomes	83
b)	Biogénèse des ectosomes	86
2.	Composition	86
a)	Protéines.....	87
b)	Lipides	88
c)	Acides nucléiques	88
3.	Interactions avec les cellules cibles	89
4.	Biomarqueurs	91
5.	Effets	91
6.	EV et PM _{2.5}	94
F.	miARN.....	95
1.	Définition	95
2.	Biogénèse	96
3.	Régulation post-transcriptionnelle.....	97
4.	miARN et pathologies	98
5.	miARN et EV	99
6.	miARN et PM _{2.5}	100
G.	PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS.....	101
II.	MATERIELS ET METHODES.....	107
A.	ECHANTILLONNAGE DES PM _{2.5}	107
B.	CARACTERISATION PHYSICO-CHIMIQUE DES PM _{2.5}	110
1.	Caractéristiques physiques des PM _{2.5}	110
a)	Granulométrie	110
b)	Surface spécifique.....	110
2.	Caractéristiques chimiques des PM _{2.5}	111
a)	Teneurs en éléments majeurs et traces métalliques	111
b)	Teneur en ions hydrosolubles	111
c)	Analyse des dioxines, furanes et polychlorobiphényles.....	112
d)	Mesure de la teneur en hydrocarbures aromatiques polycycliques et en alcanes linéaires (n-alcane)	112
e)	Analyse par diffraction des rayons X (DRX).....	112
f)	Analyse par microscopie électronique à balayage couplée à la microanalyse X (MEB-EDX).....	113
C.	CULTURE CELLULAIRE	113

1.	Isolement et culture cellulaire des monocytes / macrophages	113
2.	Exposition des macrophages aux PM _{2.5}	114
3.	Cytométrie en flux	114
4.	Culture des BEAS-2B et exposition aux EV	115
5.	Test de cytotoxicité	116
D.	VESICULES EXTRACELLULAIRES	116
1.	Isolement des EV	116
2.	Quantification des EV.....	116
3.	Dosage des EV par la méthode Bradford	117
E.	ELISA MULTIPLEX	117
F.	Mesure de l'expression génique	117
1.	Expression génique des monocytes primaires et des BEAS-2B.....	118
a)	Extraction des ARN.....	118
b)	Quantification des ARNm	118
c)	Quantification des miARN.....	119
2.	Quantification des miARN des vésicules extracellulaires	122
3.	Microscopie électronique	122
G.	WESTERN BLOT.....	123
H.	ANALYSES STATISTIQUES	124
III.	RESULTATS	127
A.	CARACTERISATION PHYSICO-CHIMIQUE DES PM _{2.5}	127
1.	Concentrations en PM _{2.5}	127
2.	Teneurs en éléments et ions inorganiques hydrosolubles	129
3.	Dioxines, furanes et polychlorobiphényles.....	134
4.	Hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP)	136
5.	Alcanes linéaires (n-alcanes).....	139
6.	Etudes des phases cristallisées par diffraction des rayons X (DRX).....	141
7.	Analyse par microscopie électronique à balayage couplée à la microanalyse X (MEB-EDX).....	144
B.	OPTIMISATION SUR LES THP1	146
1.	Détermination de la cytotoxicité de l'exposition aux PM _{2.5}	146
2.	Exposition des THP1 aux PM _{2.5} pour l'obtention des EV.....	147
a)	Protocole expérimental.....	147
b)	Mesure de la réponse inflammatoire	148
c)	Mesure de la réponse cellulaire au stress oxydant.....	152
a)	Expression des miARN dans les THP1.....	154

3.	Analyse des EV libérées par les THP1 en réponse à l'exposition aux PM _{2.5}	156
a)	Notation des échantillons des EV de THP1.....	157
b)	Microscopie électronique des EV de THP1	157
c)	Dosage des EV de THP1.....	158
d)	Quantification des miARN dans les EV de THP1	160
C.	EXPOSITION DES MACROPHAGES AUX PM _{2.5}	163
1.	Effet des PM _{2.5} sur la morphologie des macrophages primaires	163
2.	Quantification de la mort cellulaire après exposition des macrophages primaires aux PM _{2.5}	164
3.	Mesure de la réponse des macrophages au stress oxydant.....	165
4.	Réponse immunitaire des macrophages aux PM _{2.5}	166
5.	Expression des miARN dans les macrophages primaires après exposition aux PM _{2.5}	171
6.	Analyse des EV libérées par les macrophages primaires en réponse à l'exposition aux PM _{2.5}	174
D.	EXPOSITION DES BEAS-2B AUX EV LIBEREES EN REPOSE A L'EXPOSITION DES THP1 ET DES MACROPHAGES PRIMAIRES.....	178
1.	Effets des EV de THP1 sur des BEAS-2B.....	178
2.	Effets des EV de macrophages primaires sur des BEAS-2B	181
IV.	DISCUSSION GENERALE	189
A.	Effet de l'exposition des PM _{2.5} sur les macrophages.....	189
B.	Effets de l'exposition des PM _{2.5} sur les EV libérées en réponse	194
C.	Effets des EV libérées par les macrophages sur les BEAS-2B.....	195
	CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	199
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	207
	ANNEXE I.....	231
	ANNEXE II	233
	ANNEXE III.....	235
	ANNEXE IV.....	237
	ANNEXE V	239

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Pourcentage des émissions de PM _{2.5} dans l'atmosphère en fonction des secteurs d'activités	43
Figure 2 : Schéma illustrant les différents types de particules (primaires et secondaires), ainsi que les différentes sources d'émissions (naturelles et anthropiques).....	44
Figure 3 : Représentation schématique des catégories de particules atmosphériques (PM) en fonction de leur diamètre aérodynamique équivalent (D _{ae}).....	45
Figure 4 : Concentrations moyennes annuelles de PM _{2.5} en France métropolitaine (2007-2008).....	52
Figure 5 : Espérance de vie (en mois) gagnée à 30 ans dans un scénario « sans pollution d'origine anthropique » (2007-2008)	53
Figure 6 : Représentation schématique de l'appareil respiratoire humain.....	54
Figure 7 : Histologie des bronches : coupe transversale de tissu bronchique	55
Figure 8 : Image en microscopie d'un épithélium de type respiratoire	56
Figure 9 : Pénétration des particules atmosphériques le long de l'arbre respiratoire humain.	58
Figure 10 : Prédiction du dépôt total et régional des particules dans l'appareil respiratoire en fonction de la taille des particules	59
Figure 11 : Macrophages pulmonaires dérivés des monocytes provenant des cellules souches pluripotentes de la moelle osseuse et recrutés dans le tissu pulmonaire.	61
Figure 12 : Hématopoïèse	63
Figure 13 : Les différents types de polarisation des macrophages : inducteurs, caractéristiques et fonctions	65
Figure 14 : Représentation schématique des différents types de polarisation des macrophages	68
Figure 15 : Polarisation des macrophages en cas d'inflammation aiguë ou chronique.....	69
Figure 16 : Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) et leur système simplifié de détoxification.....	72
Figure 17 : Réponses inflammatoires mises en œuvre après exposition aux PM	73
Figure 18 : Les patients atteints de BPCO ont au moins quatre types de macrophages dans leurs poumons.....	75
Figure 19 : Représentation schématique des processus d'apoptose.....	76
Figure 20 : Métabolisation et activation métabolique des xénobiotiques.....	78
Figure 21 : Régulation du métabolisme des xénobiotiques par l'AhR et NRF2	81

Figure 22 : Vésicules extracellulaires (EV) et mode de libération par la cellule d'origine	82
Figure 23 : Représentation schématique de la libération des Vésicules Extracellulaire (EV) et du transfert de leur matériel biologique à la cellule cible	83
Figure 24 : Représentation schématique de la biogénèse des exosomes	84
Figure 25 : Biogénèse ESCRT-dépendante	85
Figure 26 : Représentation schématique de la voie de biogénèse ESCRT-indépendante .	86
Figure 27 : Organisation générale des Vésicules Extracellulaires (EV) : représentation schématique des composants protéiques, lipidiques et des acides nucléiques	87
Figure 28 : Représentation schématique des différents composés des EV : lipides, acides nucléiques et protéines.	89
Figure 29 : Représentation schématique des différentes liaisons entre les exosomes et leur cellule cible.....	91
Figure 30 : Fonctions des EV dans un microenvironnement tumoral.....	93
Figure 31 : Représentation schématique de la manière dont les EV induites par des expositions respiratoires peuvent contribuer à la pathogenèse des maladies chroniques	94
Figure 32 : Biogénèse des miARN : de la transcription des gènes des miARN sous forme de Pri-miARN aux miARN matures et fonctionnels	97
Figure 33 : Illustration schématique de la biogénèse des miARN, leur encapsulation dans les EV et leur internalisation dans les cellules cibles.....	99
Figure 34 : Problématique et objectifs de la thèse	103
Figure 35 : Localisation du site d'étude dans l'agglomération de Dunkerque	108
Figure 36 : Impaction en cascade	109
Figure 37 : Distribution en taille de l'échantillon moyen annuel de PM _{0,3-2,5} collecté à Dunkerque entre mars 2014 et mars 2015.....	110
Figure 38 : Evolution des concentrations moyennes journalières de PM _{2,5} à Dunkerque au cours de la période d'échantillonnage entre mars 2014 et mars 2015.....	128
Figure 39 : Roses de concentration de PM _{2,5} au cours de chaque saison de la période d'échantillonnage mars 2014 - mars 2015.....	129
Figure 40 : Ecart de concentration des éléments par rapport à la moyenne annuelle mettant en évidence les différences saisonnières et l'impact prépondérant de différentes sources.....	134
Figure 41 : Teneurs moyennes en HAP, équivalent toxique-BaP (BaP-TEQ), équivalent mutagène-BaP (BaP-MEQ) des particules fines collectées durant les 4 saisons de la période mars 2014 – mars 2015.....	138

Figure 42 : Teneurs moyennes en alcanes des particules fines collectées durant les 4 saisons de la période mars 2014 – mars 2015	140
Figure 43 : Etude des sources d'alcanes prédominantes selon la saison, à partir du calcul des Carbon Preference Index (CPI) relatifs à l'ensemble des alcanes et à ceux de hauts poids moléculaires.....	141
Figure 44 : Diffractogramme de rayons X de l'échantillon de PM _{0,3-2,5} collecté à Dunkerque	142
Figure 45 : Images de microscopie électronique à balayage des particules PM _{0,3-2,5} collectées à Dunkerque	145
Figure 46 : Mesure de la cytotoxicité suite à l'exposition des THP1 aux PM _{2.5}	146
Figure 47 : Protocole expérimental d'exposition des THP1 aux PM _{2.5} et de leurs analyses	147
Figure 48 : Mesure de l'expression de gènes de l'inflammation dans les THP1 après exposition aux PM _{2.5}	149
Figure 49 : Dosage de l'IL8 dans du milieu de culture avec ou sans PM _{2.5} pendant 6h, 24h et 48h.....	150
Figure 50 : Dosage des cytokines dans les surnageants de culture des THP1 exposées aux PM _{2.5}	151
Figure 51 : Mesure de l'expression de gènes impliqués dans la réponse au stress oxydant dans les THP1 après exposition aux PM _{2.5}	152
Figure 52 : Quantification de NRF2 et CYP1B1 dans les THP1 après exposition aux PM _{2.5}	153
Figure 53 : Analyse des niveaux de miARN dans les THP1 après exposition aux PM _{2.5}	155
Figure 54 : Images de microscopie électronique à balayage des EV libérées par les THP1	157
Figure 55 : Quantification de l'échantillon d'EV [50].48h par Nanoparticle Tracking Analysis.....	158
Figure 56 : Nombre d'EV libérées par cellule après exposition des THP1 aux PM _{2.5}	159
Figure 57 : Analyse protéique de CD63 et CD81 dans les EV de THP1 après exposition aux PM _{2.5}	160
Figure 58 : Analyse des niveaux de let-7a, miR-21 et miR-146a dans les EV libérées par les THP1 après exposition aux PM _{2.5}	162
Figure 59 : Morphologie des macrophages primaires avant et après exposition aux PM _{2.5}	164

Figure 60 : Mesure de la viabilité cellulaire dans les macrophages primaires après exposition aux PM _{2.5}	165
Figure 61 : Expression génique de CYP1B1, NRF2 et SOD2 dans les macrophages exposés pendant 48h aux PM _{2.5}	166
Figure 62 : Mesure de l'expression génique de l'IL1 β , l'IL6, l'IL8, le TNF α et le TGF β dans les macrophages primaires après 48h d'exposition aux PM _{2.5}	167
Figure 63 : Dosage de la sécrétion de cytokines dans le surnageant des macrophages primaires après exposition aux PM _{2.5}	168
Figure 64 : Ratio IL12/IL10, obtenus après quantification de la sécrétion d'IL12 et d'IL10 dans les macrophages primaires après exposition aux PM _{2.5}	169
Figure 65 : Mesure des marqueurs de surface des macrophages primaires.	170
Figure 66 : Quantification relative de l'expression des miARN dans les macrophages primaires après exposition aux PM _{2.5}	172
Figure 67 : Mesure de l'expression génique de BAX et BCL-XL dans les macrophages primaires après exposition aux PM _{2.5}	173
Figure 68 : Mesure de l'expression génique de PTEN et VEGFA dans les macrophages primaires après exposition aux PM _{2.5}	174
Figure 69 : Analyse individuelle par NTA des EV libérées par les macrophages primaires	175
Figure 70 : Quantification des EV libérées par les macrophages primaires suite à l'exposition aux PM _{2.5}	175
Figure 71 : Analyse par western blot de CD63 et CD81 dans les EV libérées par les macrophages en réponse à l'exposition aux PM _{2.5} pendant 48h	176
Figure 72 : Quantification relative du niveau des miARN dans les EV de macrophages primaires après exposition aux PM _{2.5} pendant 48h	177
Figure 73 : Dosage de la mortalité cellulaire des BEAS-2B après exposition aux EV de THP1	179
Figure 74 : Dosage de la sécrétion de sFas dans les surnageants des BEAS-2B exposées aux EV de THP1 libérées en réponse à l'exposition aux PM _{2.5}	180
Figure 75 : Expression génique d'IL1 β , IL6, IL8 et SOD2 dans les BEAS-2B exposées aux EV libérées par les macrophages et au témoin « particule ».....	182
Figure 76 : Dosage de la sécrétion de cytokines dans le surnageant des BEAS-2B aux EV libérées par les macrophages primaires en réponse à l'exposition aux PM _{2.5}	185

LISTES DES TABLEAUX

Tableau 1 : Valeurs réglementaires relatives aux polluants atmosphériques	41
Tableau 2 : Sources des différents métaux entrant dans la composition des particules en suspension dans l'air.....	49
Tableau 3 : Espèces réactives de l'oxygène	71
Tableau 4 : Principales réactions de la phase II de métabolisation	79
Tableau 5 : Noms et références des anticorps utilisés en cytométrie en flux.....	115
Tableau 6 : Nombre de cellules exposées et nombre d'EV utilisées pour l'exposition des BEAS-2B aux EV de macrophages primaires	115
Tableau 7 : Primers utilisés en qPCR (Référence Taqman®).....	119
Tableau 8 : Liste et références des primers spécifiques (RT + qPCR) Taqman®.....	120
Tableau 9 : Liste et références des primers universels (qPCR) Taqman®.....	122
Tableau 10 : Teneurs en éléments et ions inorganiques hydrosolubles des particules PM _{0,3-2,5} collectées à Dunkerque (µg/g).....	130
Tableau 11 : Teneurs moyennes en dioxines, furanes et polychlorobiphényles dans les PM _{0,3-2,5} collectées entre mars 2014 et mars 2015.....	135
Tableau 12 : Teneurs en Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (µg/g) dans les PM _{0,3-2,5} collectées à Dunkerque entre Mars 2014 et Mars 2015 et Facteur d'Equivalence Toxique (BaP-TEF)	136
Tableau 13 : Teneurs moyennes en HAP totaux (TPAH), HAP liés à la combustion (CPAH), ratio CPAH/TPAH et teneurs en équivalent BaP cancérrogène (BaP-TEQ) et Mutagène (BaP-MEQ) des PM _{2,5} collectées entre mars 2014 et 2015 en moyenne et pour les différentes saisons	137
Tableau 14 : Notation des échantillons de THP1.....	148
Tableau 15 : Notation des échantillons de THP1.....	157
Tableau 16 : Quantification des échantillons d'EV libérées par les THP1 suite à l'exposition aux PM _{2,5}	158
Tableau 17 : Concentration en miARN dans les EV de THP1 après exposition aux PM _{2,5}	161
Tableau 18 : Quantification des protéines dans les EV de macrophages primaires	176
Tableau 19 : Concentration en petits ARN dans les EV de macrophages primaires après exposition aux PM _{2,5}	177
Tableau 20 : Nombre d'EV de THP1 utilisées pour l'exposition des BEAS-2B.....	179

Tableau 21 : Nombre de vésicules de macrophages primaires utilisées lors de l'exposition des BEAS-2B.....	181
Tableau 22 : Mesure de l'expression génique dans les BEAS-2B après exposition aux EV de macrophages primaires.....	183
Tableau 23 : Dosage des petits ARN dans les BEAS-2B après exposition aux EV libérées par les macrophages primaires en réponse à l'exposition aux PM _{2.5}	184

GLOSSAIRE

A

Ace	Acénaphthène
ACTB	Beta-actin
Acy	Acénaphtylène
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
AhR	Aryl Hydrocarbon Receptor
AhRNT	Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator
AhRR	Aryl Hydrocarbon Receptor Repressor
Al	Aluminium
Ant	Anthracène
ARNm	Acide ribonucléique messenger
As	Arsenic

B

B[a]A	Benz[a]Anthracène
B[a]P	Benzo[a]Pyrène
B[b]F	Benzo[b]Fluoranthène
B[ghi]P	Benzo[g,h,i]Pérylène
B[k]F	Benzo[k]Fluoranthène
B2M	Beta 2 Microglobulin
Ba	Baryum
Bax	Bcl-2 Associated X protein
Bcl-xL	B-cell lymphoma-extra Large
BPCO	Bonchopneumopathie Chronique Obstructive

C

C	Carbone
Ca²⁺	Ion calcium (II)
CaSO₄	Sulfate de calcium
CAT	Catalase
Cd	Cadmium
CD 63 / 81	Cluster de différenciation 63 / 81
Chr	Chrysène
CIRC	Centre International de Recherche sur le Cancer
CITEPA	Centre Interprofessionnel Technique d'Etudes de la Pollution Atmosphérique
Cl⁻	Ion chlorure
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
Co	Cobalt
CO	Monoxyde de carbone
COV	Composés organiques volatils
CPAH	HAP liés à la combustion
Cr	Chrome
CSH	Cellule souche Hématopoïétique

Cu
CYP1A1 / 1B1

Cuivre
Cytochrome P450 1A1 / 1B1

D

D[ah]A
DAMPs
DL-PCB
DRX

Dibenz[a,h]anthracène
Motifs moléculaires associés aux dégâts cellulaires
Dioxine like polychlorobiphényles
Diffraction des Rayons X

E

EEA
EC
ELISA
ERO
ESCRT
EV

Agence Européenne de l'Environnement
Carbone élémentaire
Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
Espèces réactives de l'oxygène
Endosomal Sorting Complex Required for Transport
Vésicule Extracellulaire

F

F⁻
Fe
Fla
Flu

Ion fluorure
Fer
Fluoranthène
Fluorène

G

GC/MS
GM-CSF
GPx
GSH
GSSG

Chromatographie en phase gazeuse – spectrométrie de masse
Granulocyte Macrophage Colony Stimulating factor
Gluthathion Peroxydase
Gluthathion réduit
Gluthathion oxydé

H

H
HAP

Hydrogène
Hydrocarbures Polycycliques Aromatiques

I

IAP1	Inhibitor of apoptosis protein 1
ICP-OES	Spectrométrie d'émission atomique en mode optique
IFN γ	Interferon gamma
IL	Interleukine
ILV	Vésicules intraluminales
INERIS	Institut National Environnement Industriel et des Risques
InPy	Indeno[1,2,3-c,d]pyrène

K

K ⁺	Ion potassium (I)
----------------	-------------------

L

LDH	Lactate déshydrogénase
-----	------------------------

M

MEQ	Equivalent mutagène
Mg ²⁺	Ion magnésium (II)
miARN	microARN, petit acide ribonucléique non codant
Mn	Manganèse
Mo	Molybdène
MVB	Multivesicular Bodies
MVE	Multivesicular Endosome

N

N	Azote
Na ⁺	Ion sodium (I)
Na ₂ SO ₄	Sulfate de sodium
NaCl	Chlorure de sodium
Nap	Naphtalène
NH ₃	Ammoniac
NH ₄ ⁺	Ion ammonium
Ni	Nickel
NLD-PCB	Polychlorobiphényle non dioxin like
NO ₂	Dioxyde d'azote
NO ₃ ⁻	Ion nitrate
NO _x	Oxyde d'azote
NQO1	NAD(P)H déhydrogenase quinone 1
NRF2	NFE2L2 Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2
NSCLC	Cancer du poumon à non petites cellules
NTA	Nanoparticle Tracking Analysis

O

O ₃	Ozone
OC	Carbone organique
OMS	Organisation Mondiale de la Santé

P

P	Phosphore
PAMPs	Motifs moléculaires associés aux pathogènes
Pb	Plomb
PBS	Phosphate Buffer Saline
PCB	Polychlorobiphényle
PCDD	Polychlorodibenzo-p-dioxine
PCDF	Polychlorodibenzofurane
PDL1	Programmed Death Ligand 1
PF	Particules fines < 2,5 µm
Phe	Phénanthrène
PM	Particulate Matter
PPR	Récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires
PTEN	Phosphatase and TENsing homolog
Pyr	Pyrène

Q

qPCR	Réaction en chaîne par polymérase en temps réel
------	---

R

RPL37A	Ribosomal protein L37a
--------	------------------------

S

S	Soufre
sFas	Fas soluble
SiO ₂	Dioxyde de silicium
Sn	Étain
SO ₂	Dioxyde de soufre
SO ₄ ²⁻	Ion sulfate
SOD2	Superoxyde dismutase 2
Sr	Strontium

T

TEF	Facteur d'Équivalence Toxique
TEQ (I-TEQ)	Equivalent Toxique (International Toxic Equivalent)

TGFβ	Transforming Growth Factor beta
Ti	Titane
TNFα	Tumor Necrosis Factor alpha
TPAH	Hydrocarbures Aromatique Polycycliques Totaux
TSP	Particules Totales en Suspension

U

USEPA	United States Environmental Protection Agency
--------------	---

V

V	Vanadium
VEGFA	Vascular Endothelial Growth Factor A

W

WHO	World Health Organization
------------	---------------------------

Z

Zn	Zinc
-----------	------

INTRODUCTION

INTRODUCTION

La pollution atmosphérique n'est pas un phénomène récent, bien qu'il soit difficile de dater son apparition. Les premières traces de pollution de l'air remontent aux poussières et fumées émises par les mines de la Rome Antique au VII^{ème} siècle avant JC. Cependant, c'est avec la Révolution Industrielle et l'avènement du charbon comme source d'énergie que la pollution de l'air est réellement devenue un problème sanitaire, d'abord dans les pays riches, puis dans les pays pauvres où une partie de ces activités fut délocalisée à la fin du XIX^{ème} siècle.

Aujourd'hui, la pollution atmosphérique est un problème de santé publique. C'est la 3^{ème} cause de décès en France, après le tabac et l'alcool, notamment dû aux cancers du poumon et aux maladies cardiovasculaires. Le cancer du poumon est la principale cause de décès par cancer dans le monde. Des études épidémiologiques suggèrent que la pollution de l'air, notamment l'exposition aux particules fines est associée à un risque accru de mortalité par cette maladie.

En 2013, le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC) a d'ailleurs classé la pollution de l'air extérieur et les particules fines (PM_{2.5}) comme cancérigène de classe I pour l'Homme. Par conséquent, il est important de développer la connaissance, la surveillance et la prévention des cancers liés à l'exposition aux PM_{2.5}. Cet objectif est un point majeur du Plan Cancer 2014-2019 et du Plan National Santé Environnement 3 (PNSE3) (2015-2019).

L'air constitue un mélange complexe de composés gazeux et de particules en suspension. Ces particules solides ou liquides en suspension dans l'air, sont susceptibles d'être inhalées et retenues, selon leur taille, à différents niveaux de l'appareil respiratoire. Les PM_{2.5}, encore appelées particules fines, sont des particules ayant un diamètre aérodynamique équivalent inférieur à 2,5 µm. Elles renferment de nombreux composés chimiques (métaux, hydrocarbures aromatiques polycycliques, dioxines, ions hydrosolubles...) et entités biologiques (champignons, bactéries...), connus pour leurs effets néfastes sur la santé. Du fait de leur petite taille, les particules fines peuvent pénétrer profondément dans les voies respiratoires, où elles vont alors exercer leurs effets toxiques. Ces effets toxiques peuvent être induits à la fois de façon individuelle par les composés des PM_{2.5} mais également être dus à un effet synergique des composés. En se déposant dans les alvéoles pulmonaires, les PM_{2.5} vont activer des mécanismes de défenses

cellulaires : un stress oxydant et par conséquent une réponse anti-oxydante, mais aussi une réaction inflammatoire en stimulant la libération de différents types de médiateurs par les cellules immunitaires résidentes ou infiltrantes. Parmi ces cellules immunitaires, les macrophages répondent aux signaux extérieurs, comme une exposition aux PM_{2.5}, par des changements rapides, notamment dans l'expression de nombreux gènes, résultant en l'activation de deux phénotypes distincts, appelée polarisation des macrophages. Ces deux phénotypes jouent des rôles spécifiques dans la réponse immunitaire : le phénotype dit « classique » ou M1, est pro-inflammatoire et le phénotype dit « alternatif » ou M2, est anti-inflammatoire. Les macrophages, peuvent produire et sécréter plusieurs facteurs, parmi lesquels des molécules solubles circulantes et des Vésicules Extracellulaires (EV) qui peuvent favoriser un processus cancérogène. Les EV représentent en effet d'importants messagers biologiques impliqués dans des processus pathologiques tels que la tumorigénèse. Elles sont générées par tout type de cellules et sécrétées dans l'espace extracellulaire où elles échangent avec leurs cellules cibles des protéines, des lipides et des acides nucléiques (ARNm, miARN) pouvant alors modifier leur phénotype.

Ce projet de thèse s'inscrit dans le programme 4 de l'ADEME « Qualité de l'Air, impacts sur la santé et l'environnement » tant par l'aspect caractérisation de la pollution de l'air extérieur que par celui de l'impact sur la santé. Les objectifs de ce travail sont :

- déterminer la composition physico-chimique des échantillons de PM_{2.5} prélevés sur une période de 12 mois et évaluer la variabilité saisonnière sur la composition de ces particules ;
- Étudier l'impact de l'exposition aux PM_{2.5} sur la réponse immunitaire en particulier celle des monocytes/macrophages infiltrants. Examiner si un effet se traduit au niveau de leur polarisation ;
- évaluer la nature du message potentiel véhiculé par les EV produites par les macrophages en réponse à l'exposition sur des cellules épithéliales afin de savoir si ces EV peuvent produire des biomarqueurs d'exposition et être considérées comme des messagers d'effets suite à l'exposition aux PM_{2.5}.

Ce manuscrit de thèse sera décomposé en six chapitres :

- Le premier chapitre consistera en une revue bibliographique et dressera un état de l'art portant à la fois sur la pollution atmosphérique et l'impact sur la santé publique, la structure et l'histologie de l'appareil respiratoire, les macrophages, la

toxicité cellulaire des PM_{2.5}, les vésicules extracellulaires et les miARN. Ce chapitre se terminera par la problématique et les objectifs de ces travaux de thèse.

- Le chapitre deux présentera les matériels et méthodes utilisés pour mener à bien ces travaux.
- Le chapitre trois fera état des résultats obtenus pendant ce projet, tant en ce qui concerne la caractérisation physico-chimique des particules fines, que l'évaluation de la réponse des macrophages et des vésicules extracellulaires produites suite une exposition aux particules fines.
- Le chapitre cinq proposera une discussion générale des résultats.
- Ce manuscrit sera clôturé par une conclusion et ouvrira sur des perspectives en vue d'approfondir notre étude.

CHAPITRE 1 :

Revue bibliographique

Ce premier chapitre sera divisé en six parties. La première partie de cette revue bibliographique sera consacrée à la pollution atmosphérique, la réglementation mise en place ainsi qu'aux les particules atmosphériques et à leur impact sur la santé publique. La deuxième partie abordera la structure et l'histologie de l'appareil respiratoire, ainsi que la manière dont les particules s'y déposent. La troisième partie sera consacrée aux macrophages, à leurs fonctions et à la façon dont les particules peuvent modifier leur comportement. La quatrième partie abordera certains mécanismes liés à la toxicité des PM_{2.5}, comme le stress oxydant, l'inflammation, l'apoptose ou la métabolisation des particules. La cinquième partie portera sur les vésicules extracellulaires, leur mode de formation, les différents composés qu'elles contiennent et leurs fonctions. La dernière partie s'attachera à décrire les miARN, leur biogénèse et leur mode d'action et fera état des études associant les miARN, les PM_{2.5} et les vésicules extracellulaires.

I. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

A. POLLUTION ATMOSPHERIQUE

1. Historique

La pollution atmosphérique n'est pas un phénomène récent, bien qu'il soit difficile de dater son apparition. Pendant l'Antiquité, une certaine forme d'artisanat a vu le jour avec l'avènement de l'âge du bronze puis de l'âge du fer. Ces activités étaient parfois très polluantes avec le travail des matières premières utilisées pour produire des briques, des tuiles, des amphores ou encore des objets en métal (bronze, fer, plomb) et au Moyen Age, des récits rapportent que l'air était chargé de fumées et de cendres, provenant entre autres des activités domestiques. En 1300, un édit royal interdit l'utilisation du charbon comme moyen de chauffage à Londres. A l'époque, on ne parle pas encore de pollution de l'air, mais de « miasmes » ou de mauvais air. Cette théorie des miasmes (du grec ancien *μιασμα* signifiant « pollution ») est une théorie épidémiologique aujourd'hui infirmée imputant aux miasmes, une forme nocive de « mauvais air », des maladies telles que le choléra, la chlamydie ou encore la peste noire. Acceptée depuis l'antiquité en Europe, en Inde et en Chine, cette théorie a été réfutée au XIXème siècle par la découverte des microbes qui a donné lieu, en retour, à la théorie microbienne comme source de ces maladies. Mais déjà à cette époque, on savait que le « mauvais air » avait des effets néfastes sur la santé. Quelques siècles plus tard, en 1661, John Evelyn publia "*Fumifugum, or the inconvenience of the aer and smoak of London dissipated*", soit les inconvénients de la propagation des miasmes et des fumées de Londres. Ce recueil de correspondances est considéré comme l'un des premiers livres traitant de la pollution de l'air et des effets provoqués sur la santé de ses habitants (Evelyn, 1661).

En 1763, le médecin de Jean Jacques Rousseau, Le Bègue de Presles, décrit la pollution atmosphérique de Paris, alertant déjà des méfaits potentiels sur la santé des habitants : « *Paris a une atmosphère particulière en tout temps, excepté pendant les grands vents. Cette atmosphère est formée par un air rendu très pesant par la quantité de corpuscules ou exhalaisons qu'il soutient et que leur poids empêche de s'élever fort haut : c'est ce que forme le nuage dont Paris paraît couvert et enveloppé dans le temps le plus serein lorsque l'on regarde la ville d'un peu loin. Les brouillards que l'on éprouve si souvent à Paris pendant l'automne et l'hiver qui ont si mauvaise odeur, qui font mal aux yeux, à la gorge, excitent la toux, causent des fluxions...* » (Le Bègue de Presle, 1763).

Cependant, c'est avec la Révolution Industrielle et l'avènement du charbon comme source d'énergie que la pollution de l'air est réellement devenue un problème sanitaire, d'abord dans les pays riches, puis dans les pays pauvres où une partie de ces activités fut délocalisée à la fin du XIX^{ème} siècle. Ces nouvelles formes de pollution, importantes et récurrentes dans les villes, sont d'autant plus dangereuses pour les ouvriers qu'ils habitent avec leur famille à proximité immédiate des usines en plus d'être exposés toute la journée. En 1810, en France, le Décret impérial du 15 Octobre établi par Napoléon introduit un double système d'autorisation et de déclaration. Ce décret, relatif aux Manufactures et Ateliers qui répandent une odeur insalubre ou incommode, réglemente les industries dont les odeurs (que l'on supposait venir de vapeurs toxiques) sont considérées comme des nuisances pour le voisinage.

En 1833, Alain Ladureau, directeur du laboratoire de l'Etat et de la Station agronomique du Nord, décrit dans les Annales de la Chimie-Physique, la pollution de l'air de Lille par ces mots : *« L'air que l'on respire à Lille laisse dans l'arrière-bouche le goût particulier [...] qui caractérise la présence de l'acide sulfureux [...]. Il provoque des "enrouements, des maladies de la gorge, des irritations locales et des bronchites" [...], il attaque les "instruments métalliques, les rideaux et les tentures, les toitures en zinc" ».*

Au cours du XX^{ème} siècle, plusieurs épisodes majeurs de pollution ont été recensés. L'un des plus connus est le smog de Londres, conséquence des conditions météorologiques anticycloniques, de l'absence de vent et des températures très froides qui firent que l'on brula beaucoup plus de charbon qu'à l'accoutumée. Ce smog, mélange de dioxyde de soufre et de poussières, formant une épaisse brume opaque et dont les effets furent néfastes tant pour la santé que pour l'environnement, a recouvert Londres du 5 au 9 décembre 1952. Les premières statistiques annoncèrent 4 000 décès directement liés à cet épisode de pollution, alors que des études plus récentes ont porté à 12 000 le nombre de décès directement lié au smog dans les semaines qui suivirent (Bell et al., 2004).

1. Réglementation

Ces épisodes de pollution ont entraîné la mise en place de mesures sanitaires telles que le Clean Air Act en Angleterre (1956) et le Air Quality Act aux Etats-Unis (1967). A l'échelle de la France, l'Association pour la Prévention de la Pollution Atmosphérique (APPA) et le Centre Interprofessionnel Technique d'Etudes de la Pollution Atmosphérique (CITEPA) ont été créés en 1958 et 1961 respectivement. La prise en compte de la question de la pollution atmosphérique à l'échelle européenne remonte à 1980 avec la première

réglementation sur la qualité de l'air ambiant. Cette dernière a conduit les Etats Membres à adopter en 1996 la directive cadre 96/62/CE concernant l'évaluation et la gestion de la qualité de l'air, qui a donné lieu la même année en France à l'adoption de la Loi sur l'Air et l'Utilisation Rationnelle de l'Energie (LAURE). Cette loi reconnaît « à chacun le droit de respirer un air qui ne nuise pas à sa santé » et dont les objectifs visent « à prévenir; à surveiller; à réduire ou à supprimer les pollutions atmosphériques, à préserver la qualité de l'air et, à ces fins, à économiser et à utiliser rationnellement l'énergie ».

La pollution atmosphérique est ainsi définie comme « l'introduction par l'homme, directement ou indirectement, dans l'atmosphère et les espaces clos, de substances ayant des conséquences préjudiciables de nature à mettre en danger la santé humaine, à nuire aux ressources biologiques et aux écosystèmes, à influencer sur les changements climatiques, à détériorer les biens matériels, à provoquer des nuisances olfactives excessives ».

Cette volonté de protection des personnes s'est traduite en France par la mise en place d'une réglementation pour un certain nombre de polluants dans l'air extérieur, inscrite dans plusieurs directives européennes comme la directive 2008/50/CE de la Commission Européenne du 21 mai 2008, transposées en droit français dans le décret n°2010-1250 du 21 octobre 2010 (MEDDE, Décret n°2010-1250 du 21 octobre 2010 relatif à la qualité de l'air). Différents niveaux de réglementation ont ainsi été fixés pour certains polluants, comme :

- la valeur limite : niveau à ne pas dépasser, et fixé sur la base des connaissances scientifiques afin d'éviter, de prévenir ou de réduire les effets nocifs sur la santé humaine ou sur l'environnement dans son ensemble.
- la valeur cible : niveau à atteindre, dans la mesure du possible, dans un délai donné et fixé, afin d'éviter, de prévenir ou de réduire les effets nocifs sur la santé humaine ou l'environnement dans son ensemble.
- l'objectif de qualité : niveau à atteindre à long terme et à maintenir, sauf lorsque cela n'est pas réalisable par des mesures proportionnées, afin d'assurer une protection efficace de la santé humaine et de l'environnement dans son ensemble.
- le niveau critique : niveau fixé sur la base des connaissances scientifiques, au-delà duquel des effets nocifs directs peuvent se produire sur certains récepteurs, tels que les arbres, les autres plantes ou écosystèmes naturels, à l'exclusion des êtres humains.
- les seuils d'information et de recommandation : niveau au-delà duquel une exposition de courte durée présente un risque pour la santé humaine de groupes

particulièrement sensibles au sein de la population et qui rend nécessaire l'émission d'informations immédiates et adéquates à destination de ces groupes et des recommandations pour réduire certaines émissions.

- le seuil d'alerte : niveau au-delà duquel une exposition de courte durée présente un risque pour la santé de l'ensemble de la population ou de dégradation de l'environnement, justifiant l'intervention de mesures d'urgence.

Cette réglementation vise aussi bien des polluants gazeux que ceux sous forme particulaire. Cinq polluants gazeux sont réglementés par ce dispositif pour la protection de la santé humaine : le dioxyde d'azote (NO₂), l'ozone (O₃), le dioxyde de soufre (SO₂), le monoxyde de carbone (CO) et le benzène (C₆H₆) (Tableau 1).

Des valeurs cibles de concentration ont été définies à partir de 2013 pour le benzo[*a*]pyrène (B[*a*]P), utilisé comme « *marqueur du risque cancérogène lié aux hydrocarbures aromatiques polycycliques dans l'air ambiant* », l'arsenic (As), le cadmium (Cd) et le nickel (Ni). Ces normes, associées aux valeurs préexistantes pour le plomb (Pb), portent à quatre le nombre de métaux et métalloïdes, préalablement qualifiés de métaux lourds, dont la concentration atmosphérique est réglementée.

Les concentrations atmosphériques des particules en suspension ont historiquement été réglementées par la mesure des PM₁₀. Par ailleurs, le décret 2010-1250 du 21 octobre 2010 fixe également les normes à appliquer pour les PM_{2.5} (tableau 1). Toutefois, il n'existe pas pour le moment de seuil d'information et de recommandation ni de seuil d'alerte pour les PM_{2.5}.

En quelques années en Europe, la valeur limite de la concentration moyenne annuelle de PM_{2.5} a diminué, de 30 µg/m³ en 2010 à 25 µg/m³ en 2015. Cette valeur limite reste très éloignée de l'objectif qualité de 10 µg/m³ préconisé par l'OMS. Cependant, une publication de Di et al montre un risque pour des concentrations bien en deçà de 10 µg/m³ (Di et al., 2017).

Tableau 1 : Valeurs réglementaires relatives aux polluants atmosphériques

Source : Décret n°2010-1250 du 21 octobre 2010 relatif à la qualité de l'air et Arrêté du 26 mars 2014 relatif au déclenchement des procédures préfectorales en cas d'épisodes de pollution de l'air ambiant

	Objectif Qualité	Valeur cible	Valeur limite	Seuil info. & recommandation	Seuil alerte
NO₂			40 µg/m ³ (an) 200 µg/m ³ (h) max 18 fois / an	200 µg/m ³ (h)	400 µg/m ³ (h) plus de 3h consécutives 200 µg/m ³ (h) sur 3 jours
O₃	120 µg/m ³ (8h)	120 µg/m ³ (8h) max 25 jours / an		180 µg/m ³ (h)	240 µg/m ³ (h) sur 3 heures consécutives (seuil 1)
SO₂	50 µg/m ³ (an)		350 µg/m ³ (h) max 24 jours / an 125 µg/m ³ (jour) max 3 fois / an	300 µg/m ³ (h)	500 µg/m ³ (h) plus de 3h consécutives
CO			10 000 µg/ m ³ (8h)		
B[a]P		1 ng/m ³ (an)			
As		6 ng/m ³ (an)			
Cd		5 ng/m ³ (an)			
Ni		20 ng/m ³ (an)			
Pb	0,25 µg/m ³ (an)		0,5 µg/m ³ (an)		
Benzène	2 µg/m ³ (an)		5 µg/m ³ (an)		
PM₁₀	30 µg/m ³ (an)		40 µg/m ³ (an) 50 µg/m ³ (jour) max 35 fois / an	50 µg/m ³ (jour)	80 µg/m ³ (jour)
PM_{2,5}	10 µg/m ³ (an)	20 µg/m ³ (an)	25 µg/m ³ (an)		

2. Pollution atmosphérique particulaire

L'air constitue un mélange complexe de gaz et de particules en suspension. Ces particules solides ou liquides en suspension dans l'air, sont susceptibles d'être inhalées et retenues, selon leur taille, à différents niveaux de l'appareil respiratoire.

Les sources d'émissions des particules atmosphériques sont multiples et peuvent être naturelles comme anthropiques (industries, secteurs résidentiel et tertiaire, agriculture, sylviculture, combustion, trafic routier...). Il serait un peu rapide de penser que les sources de particules les plus importantes sont reliées aux activités humaines, alors qu'à l'échelle globale, les émissions d'origine anthropique ne représentent que 10% des émissions de particules. Les sources d'origine naturelle sont multiples : éruptions volcaniques, embruns

marins, érosion des sols et corrosion des roches, pollens, spores, bactéries, sables désertiques... Bien sûr, tout dépend du site étudié : à l'échelle d'une grande ville, les émissions anthropiques prennent le dessus sur les émissions naturelles.

Les particules fines rencontrées dans les grandes zones urbaines sont majoritairement issues des activités humaines comme le transport, l'industrie, le secteur tertiaire et résidentiel, notamment via l'utilisation du bois ou des combustibles fossiles (charbon, fioul) comme mode de chauffage individuel, en zone urbaine. Les données CITEPA de 2017 annoncent près de 165 000 tonnes/ an de PM_{2.5} rejetées dans l'atmosphère en France métropolitaine. Sur le territoire national, plus de 60% des véhicules particuliers roulent au diesel et génèrent 16% des émissions de PM_{2.5} (Secten, CITEPA 2015, Emissions 2013). Enfin, selon l'inventaire du CITEPA, les particules provenant du secteur résidentiel et tertiaire représentent presque la moitié (48,5%) des émissions de PM_{2.5}, alors que les émissions industrielles représentent 20%, et celles liées à l'agriculture et la sylviculture, près de 11% (figure 1).

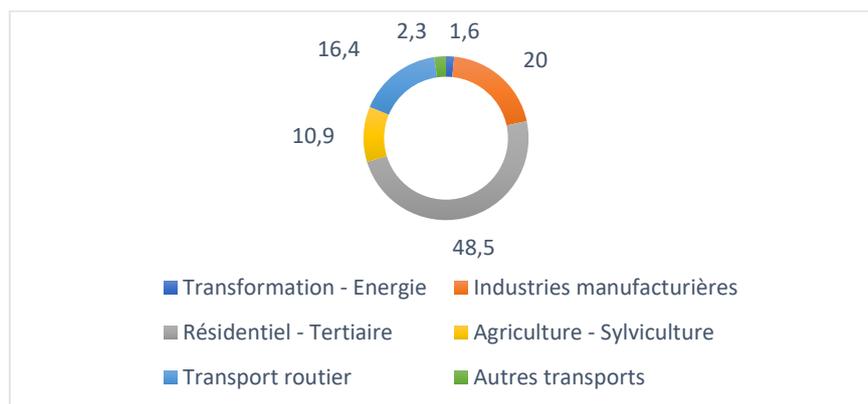


Figure 1 : Pourcentage des émissions de PM_{2.5} dans l'atmosphère en fonction des secteurs d'activités
Données 2013 sur l'ensemble du territoire français, CITEPA, 2015

- Les particules primaires : émises directement dans l'atmosphère sous forme particulaire depuis une source et dont la composition chimique et physique n'a pas été modifiée depuis leur émission. Il peut s'agir par exemple des particules minérales résultant de l'érosion des sols, du sable d'origine désertique, des embruns marins, des cendres volcaniques, etc. En milieu urbain, on peut retrouver des suies provenant du chauffage domestique ou émises directement par les échappements des véhicules lors de la combustion incomplète du carburant.
- Les particules secondaires : formées dans l'atmosphère par réactions chimiques, impliquant des composés gazeux, soit directement par conversion gaz-solide, soit

par l'intermédiaire de gouttelettes d'eau. Les principaux composés impliqués dans la formation des particules secondaires sont le dioxyde de soufre SO_2 , les oxydes d'azote NO_x ou NO_2 , l'ammoniac NH_3 ou encore les composés organiques volatils (COV). Il peut s'agir également de particules initialement primaires qui ont subi une évolution de leur composition.

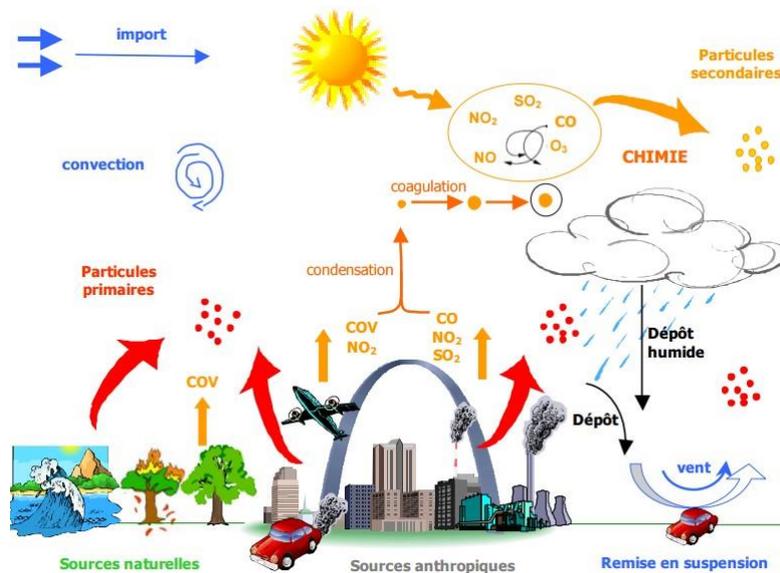


Figure 2 : Schéma illustrant les différents types de particules (primaires et secondaires), ainsi que les différentes sources d'émissions (naturelles et anthropiques)
(Rapport Airparif 2008)

Le terme « particule atmosphérique » est assez large et peut s'appliquer à différents types de particules présentant des caractéristiques physico-chimiques très différentes.

a) Paramètres physiques

o Le diamètre aérodynamique équivalent (D_{ae})

Le D_{ae} correspond au diamètre de la particule sphérique d'une masse volumique de 1 g/cm^3 qui possède la même vitesse limite de chute dans l'air que la particule considérée. Sont ainsi distinguées 4 classes granulométriques (figure 3) :

- les particules totales en suspension (TSP), dont la taille peut varier de quelques nanomètres à plus de cent micromètres ;
- les particules grossières, dont le D_{ae} est compris entre 2,5 et $10 \mu\text{m}$ ($\text{PM}_{2,5-10}$) ;
- les particules fines, dont le D_{ae} est inférieur à $2,5 \mu\text{m}$ ($\text{PM}_{2,5}$) ;
- les particules ultrafines, appelées nanoparticules si elles sont manufacturées, ayant un D_{ae} inférieur à $0,1 \mu\text{m}$ ($\text{PM}_{0,1}$).

Chaque classe granulométrique englobe les particules de la classe inférieure (Bliefer and Perraud, 2009).

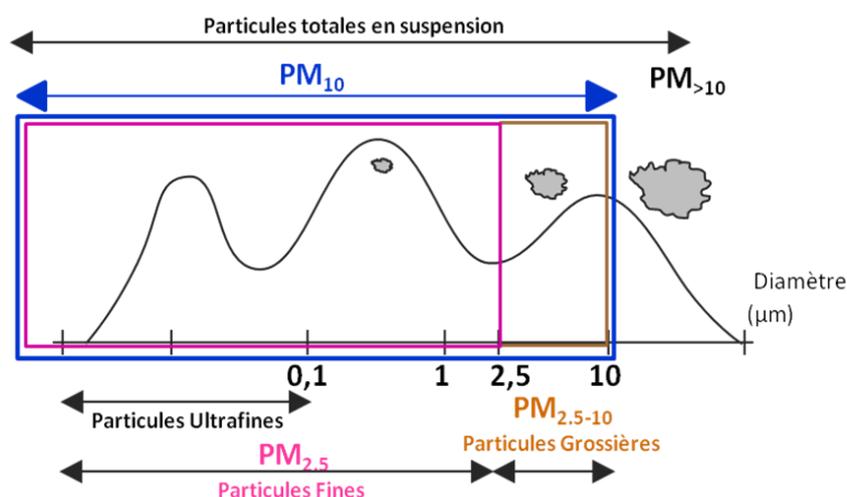


Figure 3 : Représentation schématique des catégories de particules atmosphériques (PM) en fonction de leur diamètre aérodynamique équivalent (Dae)

○ *La surface spécifique*

La surface spécifique des particules désigne la surface totale par unité de masse d'un solide granulaire ou particulaire en opposition à sa surface apparente. Elle peut être déterminée en mesurant la quantité de molécules qui peut être adsorbée à la surface du solide et s'exprime en m²/g. En conséquence, les particules ultrafines ont une surface spécifique supérieure aux particules fines et sont donc susceptibles d'adsorber plus de molécules et d'être plus potentiellement plus toxiques.

b) *Paramètres chimiques*

La composition chimique des particules est très variable et dépend de plusieurs paramètres, notamment de leur source d'émission. On distingue la fraction organique et la fraction inorganique. Les particules sont également composées d'une fraction biologique, non négligeable, composée de bactéries, de champignons, de fragments de végétaux ou encore de pollens.

○ *Fraction organique*

Les particules sont composées d'une fraction carbonée, regroupant le carbone organique (CO) et le carbone élémentaire (CE). Le carbone organique représente l'ensemble des composés organiques présents à l'état particulaire, parmi lesquels sont retrouvés les

hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), les composés organiques semi-volatils, les sucres, les acides carboxyliques, les paraffines ou encore les dioxines (PCDD), les furanes (PCDF) et les polychlorobiphényles (PCB).

Cette fraction organique possède des sources naturelles (végétation, spores fongiques, composés d'origine marine) et anthropiques, notamment via les processus de combustion (Bauer et al., 2008; Buessler et al., 1996). Une partie de cette fraction organique est composée d'espèces secondaires, résultant de la conversion dans l'atmosphère d'espèces gazeuses ou adsorbées sur les particules.

- *Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques*

Les HAP font partis des premiers composés identifiés comme cancérigènes et mutagènes (Grimmer et al., 1991). Ce sont des molécules, composées d'atomes de carbone et d'hydrogène, possédant au moins deux cycles aromatiques condensés.

Ils sont produits pendant la combustion incomplète ou la pyrolyse à haute température de molécules organiques ou de combustibles fossiles (Kawanaka et al., 2009). Leurs sources d'émissions sont nombreuses et majoritairement anthropiques. Ils peuvent par exemple être issus de la combustion de carburant automobile, de la combustion de bois ou de charbon, de l'industrie (métallurgie, sidérurgie, cimenterie...) et de l'incinération des déchets. Il existe également des HAP provenant des sources naturelles, comme lors d'éruptions volcaniques ou de feux de forêt.

Les HAP peuvent être présents sous formes gazeuse ou particulaire, en fonction de leurs propriétés physicochimiques notamment leur poids moléculaire et leur caractère volatil. Des composés secondaires peuvent se former dans l'atmosphère et peuvent présenter une toxicité plus forte que les composés parents, comme c'est le cas par exemple pour les HAP oxygénés ou nitrés (Abbas et al., 2018).

- *Dioxines, furanes et polychlorobiphényles*

Les dioxines, furanes et polychlorobiphényles font l'objet d'une attention particulière dans les études environnementales en raison de la toxicité des formes aromatiques organochlorées prises par une partie des composés. Parmi les dioxines et furanes, les polychlorodibenzo-p-dioxines (ou PCDD) et les polychlorodibenzo-furanes (PCDF) représentent au global 210 types de composés, dont 17 présentent une toxicité importante et notamment la 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine (TCDD), connue sous le nom de « dioxine de Seveso ».

Les procédés de combustion de matières carbonées contenant du chlore ou en sa présence, constituent la voie principale de formation des dioxines/furanes c'est pourquoi l'incinération et le brûlage des déchets et certaines activités industrielles (sidérurgie, cimenterie) constituent des sources importantes d'émission dans l'atmosphère. Suite aux émissions des processus de combustion, ces composés sont émis en phase gazeuse ou sous forme particulaire. Dans l'air ambiant, la répartition des PCDD/Fs entre phase gazeuse et phase particulaire suit souvent une certaine tendance (Mandalakis et al., 2002). La 2,3,7,8 TCDD se retrouve principalement sous forme gazeuse ($\approx 70\%$) et en passant aux formes penta, hexa, hepta et octa, la tendance s'inverse : la OCDD se trouve à 15% sous forme gazeuse et à 85% sous forme particulaire. Une évolution similaire est constatée pour les PCDF (2,3,7,8 TCDF à 82% sous forme gazeuse ; OCDF à 19% sous forme gazeuse). Sur l'ensemble des composés PCDD/Fs, la proportion en phase particulaire est souvent supérieure à celle de la phase gazeuse, ce qui justifie l'intérêt de suivre les dioxines dans les particules atmosphériques.

Les 209 congénères de PCB sont répartis selon 2 catégories, PCB de type dioxine (PCB Dioxine-Like ou encore DL-PCB), et autres PCB (PCB Non Dioxin Like ou encore NDL-PCB), établies en prenant en compte uniquement les effets tératogènes des PCB. Les PCB de type dioxine ont une configuration plane, très comparable aux dioxines. Parmi ceux-ci, 12 sont considérés comme étant les plus toxiques (4 ortho : 77, 81, 126 et 169 ; et 8 non-ortho : 105, 114, 118, 123, 156, 157, 167 et 189). Néanmoins, ils sont les moins abondants dans les mélanges industriels comme dans les matrices environnementales (INERIS, 2011).

En 1982, 7 PCB, appelés indicateurs (PCBi) ont été sélectionnés parmi les 209 congénères par le Bureau Communautaire de Référence de la Commission Européenne (Bruxelles) comme étant les composés à rechercher en priorité dans les analyses de matrices organiques (sédiment, sang, chair, graisse) en raison de leur persistance et de leur abondance dans l'environnement ainsi que pour leurs propriétés toxicologiques. Les « PCB indicateurs » représentent près de 80 % des PCB totaux : le plus souvent les 118, 138, 153 et 180 mais aussi les 28, 52 et 101. Parmi les PCBi, seul le PCB 118 n'est pas un PCB-NDL.

- *Fraction inorganique*

- *Métaux éléments traces métalliques*

A l'intérieur de la fraction inorganique des particules sont retrouvés les éléments métalliques majeurs, comme les Al, et Fe et les éléments traces métalliques comme les Zn,

Ni, V, Pb, Mn, Cr, Cu, Co, Cd... La concentration des es éléments traces dans l'atmosphère est faible en comparaison avec celle d'espèces ioniques, cependant leur contribution, à la toxicité des particules reste importante pour certains de ces éléments (Fortoul et al., 2015). La présence d'espèces métalliques et traces métalliques est majoritairement liée à des activités anthropiques. Les sources d'émissions de ces espèces sont nombreuses et très diverses (tableau 2).

Al et Fe possèdent à la fois des origines crustales, naturelles et industrielles. Les éléments Ni et V sont utilisés comme traceurs de combustion de fioul lourd (Mazzei et al., 2008). Les éléments Cu, K, Mn, Zn, Pb, Ba, Sb, Br, As, V, et Cd sont généralement liés aux émissions dues au trafic routier (Ilacqua et al., 2007; Mazzei et al., 2008; Moloï et al., 2002). Les espèces Pb, Zn, Cr et Mn trouvent également leurs sources dans les émissions industrielles, notamment via l'activité sidérurgique, l'aciérie électrique pour le Zn, la métallurgie ou la pétrochimie (Kfoury et al., 2016a).

Tableau 2 : Sources des différents métaux entrant dans la composition des particules en suspension dans l'air

Sources		Métaux	Référence
Croûte terrestre		Al, Ti, Ca, Fe, Mg, Na	(Cyrus et al., 2003) (Ilacqua et al., 2007) (Wu et al., 2007)
Trafic routier	Lié à l'échappement	Cu, K, Mn, Pb, Ba, Sb, V, Cd	(Cyrus et al., 2003; Ilacqua et al., 2007)
	Hors échappement (frein, usure des pneus...)	Fe, Cu, Cd, Ba, Mn (freins) Zn, Ba, Mn (abrasion des pneus)	(Ilacqua et al., 2007; Mazzei et al., 2008; Moloi et al., 2002)
Combustion	Fioul lourd	Ni, V	(Mazzei et al., 2008)
	Charbon	Ni, Pb, Mn, Hg, Cr, Co, Cu, Cd	(Cyrus et al., 2003; Roche, 2016)
	Biomasse	K	(Ilacqua et al., 2007)
Activités industrielles	Sidérurgie	Pb, Cd, Ag, Rb, K, Fe (agglomération de minerais) Zn, Mn (aciérie) Fe, Pb, Zn, Ni	(Dall'Osto et al., 2008; Kfoury et al., 2016b; Oravisjärvi et al., 2003)
	Pétrochimie	Ni, V, Pb, Zn, Cr, Co	(Moreno et al., 2006)
	Métallurgie	Cu, Pb, Zn, Al, Ag	(Moreno et al., 2006)
	Industrie des pigments	Cr, Mo, Ni, Co, Cu, Ti	(Moreno et al., 2006)
	Cimenterie	Al, Ca, K, Mg, Sr	(Santacatalina et al., 2010)
	Industrie verrière	As, Al, Ti, Ca, Mg, Fe, Mn, Sr, Rb, Ba, Li, Zn, Ag, Cd, Sb, Pb, Cu, Sn	(Ledoux et al., 2017; Rampazzo et al., 2008)

▪ *Ions hydrosolubles*

Les espèces hydrosolubles, chlorures (Cl^-), nitrates (NO_3^-), sulfates (SO_4^{2-}), sodium (Na^+), potassium (K^+), calcium (Ca^{2+}), magnésium (Mg^{2+}) ou encore les ions ammonium (NH_4^+), constituent la plus grande part de la masse des particules.

Les origines de ces ions sont multiples, naturelles (marine ou crustale), anthropiques (utilisation d'engrais, de matières riches en sels...) ou proviennent de la conversion d'espèces gazeuses.

Les espèces nitrates et sulfates correspondent majoritairement à des ions inorganiques secondaires. Ils sont issus de la conversion gaz-particules d'espèces gazeuses, comme les oxydes d'azote pour les nitrates ou le dioxyde de soufre pour les sulfates. Ces ions inorganiques secondaires représentent une part importante des particules (Waked et al., 2013). Il faut préciser néanmoins qu'une partie des sulfates correspond à des espèces

primaires présentes notamment dans des sels marins ou encore sous la forme de gypse ($\text{CaSO}_4, 2\text{H}_2\text{O}$) primaire.

Les sels marins représentent aussi une source d'ions importante. Ils sont formés et introduits dans l'atmosphère lors du séchage des embruns marins générés sous l'effet des vagues et du vent. Ces particules possèdent une composition proche de celle de l'eau de mer lorsqu'ils sont fraîchement émis : les espèces Na^+ , Cl^- et Mg^{2+} sont alors majoritaires. Ces aérosols marins peuvent séjourner un certain temps dans l'atmosphère et interagir avec des espèces gazeuses (SO_2 , NO_x), conduisant alors à une perte d'ions chlorures au profit des nitrates et des sulfates (Seinfeld and Pandis, 2006).

Les poussières crustales renferment également des espèces inorganiques hydrosolubles telles que Ca^{2+} , Mg^{2+} et K^+ . Au niveau de sources anthropiques, l'ion K^+ est l'un des composés caractéristiques des émissions de combustion de biomasse (Harrison et al. 2012) et ces espèces peuvent également être émises par des sources industrielles, comme la sidérurgie (Hleis et al. 2013).

3. Pollution et santé publique

Les conséquences de la pollution de l'air sont nombreuses et importantes, tant sur la santé que sur l'environnement. Les effets sur la santé humaine sont différents d'une personne à l'autre et peuvent être temporaires ou permanents. L'impact d'une exposition à la pollution va dépendre de nombreux paramètres physiques et physiologiques : durée d'exposition (longue / courte / chronique / aiguë), concentration des polluants dans l'air, âge de la personne exposée, état de santé, statut tabagique... Les conséquences pathologiques peuvent être des hospitalisations pour des causes cardiovasculaires et respiratoires, de l'asthme, des bronchopneumopathies chroniques obstructives (BPCO), des infarctus du myocarde ou encore des cancers (poumon, voies aériennes supérieures, vessie).

Le 17 octobre 2013, le CIRC a classé la pollution atmosphérique ainsi que les particules fines, comme cancérigène avéré pour l'Homme (classe I) (OMS, Communiqué de presse N°221, 17/10/2013). Mais déjà avant cela, la pollution atmosphérique était un véritable problème de santé publique. De nombreuses études ont mis en évidence qu'une exposition à la pollution pouvait être à l'origine de nombreuses pathologies (respiratoires et cardiovasculaires principalement) (Moolgavkar, 2000), entraînant des hospitalisations (Tao et al., 2014).

L'Agence Européenne de l'Environnement estime à 520 400 le nombre de décès prématurés causés par les particules pour le continent Européen sur l'année 2014 et 487 600 sur

l'Union Européenne (EU 28). Les PM_{2.5} causeraient à elles seules plus de 399 000 décès dont 34 880 en France (EEA 2017). La France est le 5^{ème} pays de l'Union Européenne le plus touché par la pollution de l'air ; ce qui fait de la pollution atmosphérique la 3^{ème} cause de mortalité en France derrière le tabac et l'alcool. L'OMS annonce environ 7 millions de décès en 2012 ayant pour cause la pollution de l'air, dont 1,3 millions de décès directement dus à la pollution urbaine (la moitié des décès suite à des pneumonies chez les enfants de moins de 5 ans). Récemment, une étude menée par Di et al. sur une cohorte de 60 millions de personnes aux Etats Unis a montré qu'une augmentation de la concentration en PM_{2.5} de 10µg/m³ était associée à une augmentation de la mortalité de 7,3% (Di et al., 2017). Une étude Européenne de grande ampleur (Aphekom) a permis de conclure sur les bénéfices tirés d'une diminution de la concentration en particules, qui permettrait d'éviter de nombreuses pathologies et hospitalisations.

Si les concentrations en PM_{2.5} recommandées par l'OMS (10µg/m³) étaient respectées, le gain en espérance de vie sur 30 ans serait alors de 9 mois pour la France et jusqu'à 22 mois au niveau mondial (Santé Publique France, 2016).

Jusque 2016, l'exposition chronique aux particules fines avait été estimée uniquement pour des agglomérations de plus de 100 000 habitants. Depuis, des évaluations ont été réalisées en prenant en compte la relation concentration-risque et ont permis d'étendre les estimations à tout le territoire français. La concentration annuelle en PM_{2.5} pour l'ensemble des communes varie de 1 à 22 µg/m³ (figure 4).

L'agence Européenne de l'Environnement estime à 520 400 le nombre de décès prématurés causés par les particules pour le continent Européen sur l'année 2014 et 487 600 sur l'Union Européenne (EU 28). Les PM_{2.5} causeraient à elles seules plus de 399 000 décès dont 34 880 en France (EEA 2017). La France est le 5^{ème} pays de l'Union Européenne le plus touché par la pollution de l'air ; ce qui fait de la pollution atmosphérique la 3^{ème} cause de mortalité en France derrière le tabac et l'alcool. L'OMS annonce environ 7 millions de décès en 2012 ayant pour cause la pollution de l'air, dont 1,3 millions de décès directement dus à la pollution urbaine (la moitié des décès suite à des pneumonies chez les enfants de moins de 5 ans). Récemment, une étude menée par Di et al. sur une cohorte de 60 millions de personnes aux Etats Unis a montré qu'une augmentation de la concentration en PM_{2.5} de 10µg/m³ était associée à une augmentation de la mortalité de 7,3% (Di et al., 2017). Une étude Européenne de grande ampleur (Aphekom) a permis de conclure sur les bénéfices tirés d'une diminution de la concentration en particules, qui permettrait d'éviter de nombreuses pathologies et hospitalisations.

Jusque 2016, l'exposition chronique aux particules fines avait été estimée uniquement pour des agglomérations de plus de 100 000 habitants. Depuis, des évaluations ont été réalisées en prenant en compte la relation concentration-risque et ont permis d'étendre les estimations à tout le territoire français. La concentration annuelle en PM_{2.5} pour l'ensemble des communes varie de 1 à 22 µg/m³ (figure 4).

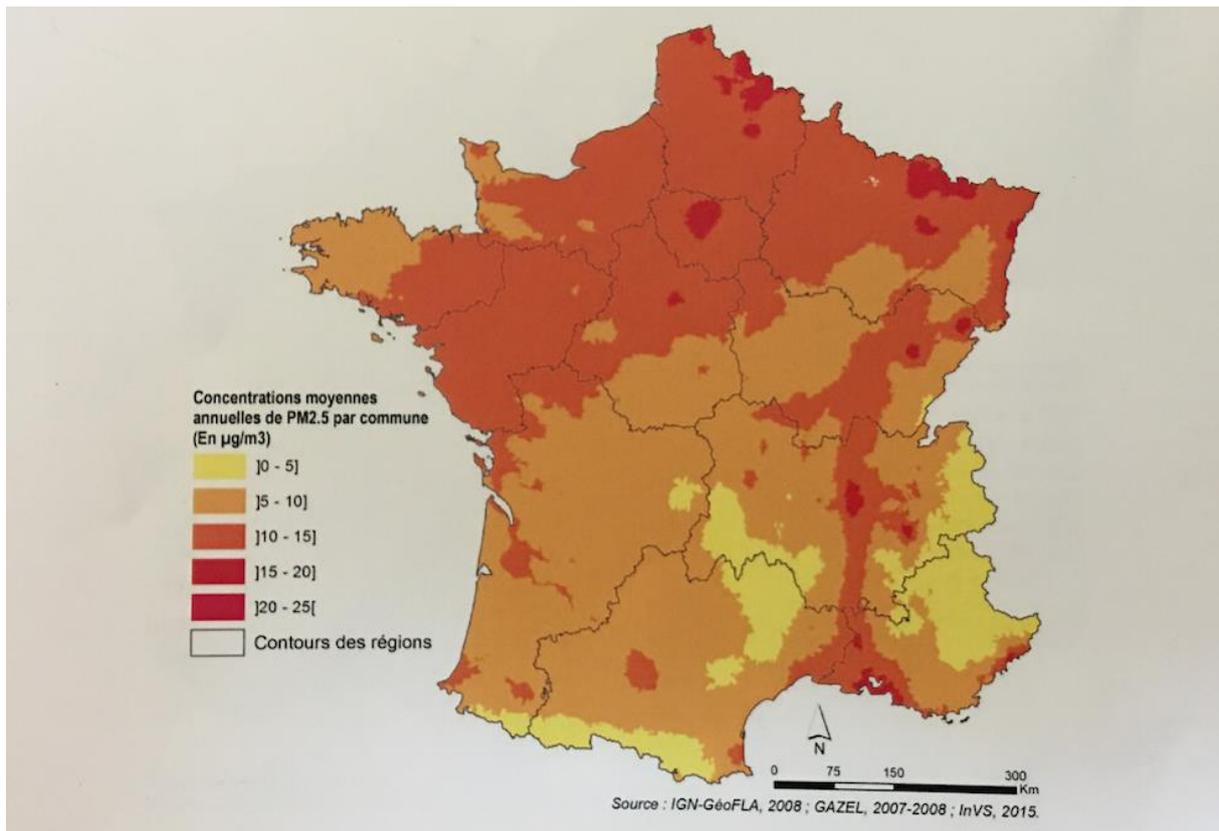


Figure 4 : Concentrations moyennes annuelles de PM_{2.5} en France métropolitaine (2007-2008)
(D'après Santé Publique France)

Sur la Région Hauts-de-France (Nord - Pas-de-Calais – Picardie au moment de l'étude), les concentrations moyennes annuelles en particules fines étaient comprises entre 11 et 17 µg/m³, ce qui est en dessous de la valeur limite annuelle de 25 µg/m³ en vigueur depuis 2015, mais au-dessus de la valeur cible de l'OMS de 10µg/m³. Ce sont dans les zones urbanisées et/ou industrielles, autour de villes comme Dunkerque, Lille, Valenciennes ou Lens, que les concentrations sont les plus élevées, avec des valeurs supérieures à 15µg/m³. Dans un scénario « sans pollution d'origine anthropique » (figure 5), avec des concentrations inférieures à 5 µg/m³, la population de la région pourrait gagner jusqu'à 16 mois d'espérance de vie sur 30 ans et 4 900 décès pourraient être ainsi évités chaque année.

En respectant l'objectif de qualité recommandé par l'OMS ($10\mu\text{g}/\text{m}^3$), 3 100 décès pourraient être évités rien que sur la région Hauts-de-France.

Cette concentration de $10\mu\text{g}/\text{m}^3$ serait une valeur à atteindre rapidement afin de protéger les populations exposées, car les seuils proposés par le Grenelle de l'Environnement, de $15\mu\text{g}/\text{m}^3$, ou la valeur cible recommandée par la directive Européenne de $20\mu\text{g}/\text{m}^3$ pour 2020, ne permettrait qu'un bénéfice sanitaire faible dans la région, de l'ordre d'une centaine de décès prématurés évités (Provost and Heyman, 2016).

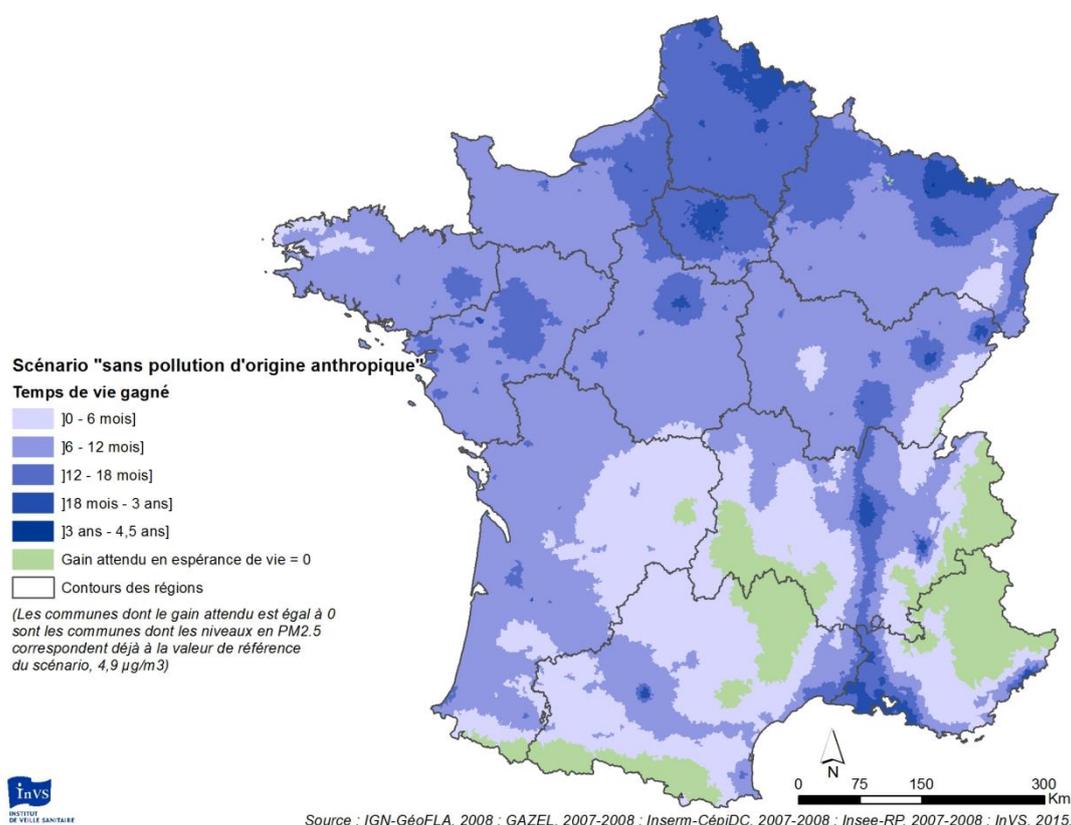


Figure 5 : Espérance de vie (en mois) gagnée à 30 ans dans un scénario « sans pollution d'origine anthropique » (2007-2008)
(D'après Santé Publique France)

Le premier organe touché par l'exposition à la pollution atmosphérique est le poumon (organe principal de l'appareil respiratoire), en contact direct avec l'air inspiré et les particules en suspension qu'il contient.

B. APPAREIL RESPIRATOIRE

1. Structure

L'appareil respiratoire est composé des organes qui assurent les échanges des gaz respiratoires (O_2 et CO_2) de l'air extérieur jusqu'aux alvéoles pulmonaires puis jusqu'au sang. Il représente une surface d'environ 80 m^2 , en contact avec les 15 m^3 d'air inspirés chaque jour par un individu adulte. L'importance de cette surface fait de l'appareil respiratoire la cible privilégiée des polluants présents dans l'air.

La structure de l'appareil respiratoire est présentée sur la figure 6 :

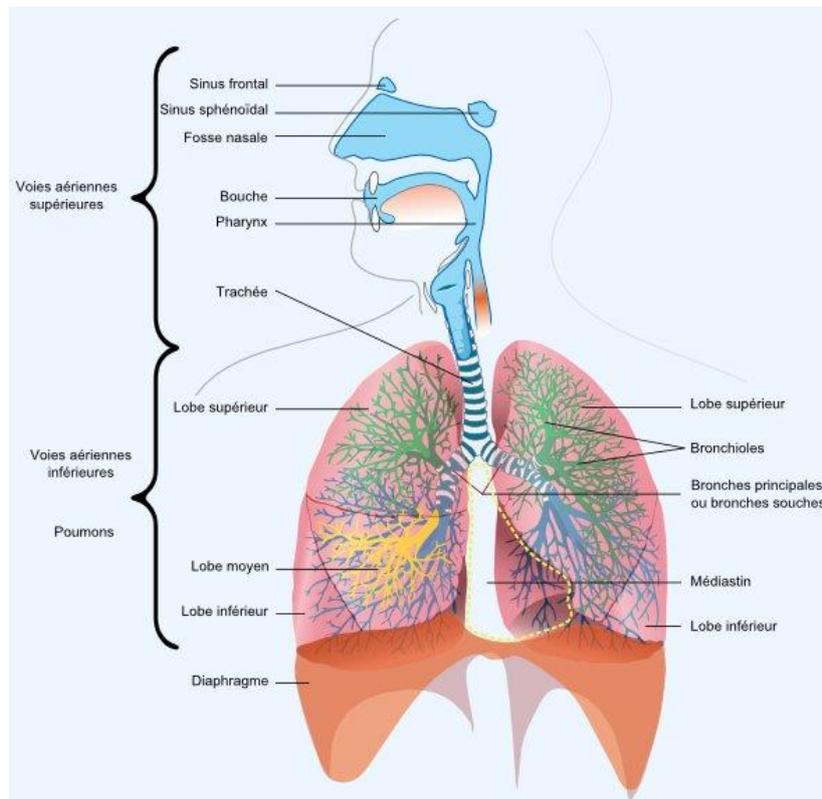


Figure 6 : Représentation schématique de l'appareil respiratoire humain

Le poids moyen des poumons est d'environ 850g chez l'homme et 750g chez la femme. Les deux poumons ne sont pas symétriques. En effet, la bronche souche gauche se divise en deux bronches lobaires, alors que la bronche souche droite se divise en trois bronches lobaires. Chaque bronche lobaire est associée à un lobe pulmonaire. Ainsi, le poumon droit est constitué des lobes supérieur, moyen et inférieur, séparés par deux scissures : la grande (ou oblique) et la petite (ou horizontale), alors que le poumon gauche ne comprend que les lobes supérieur et inférieur, séparés par la scissure oblique. Au total, on retrouve 23 divisions bronchiques pour atteindre les alvéoles.

Au niveau fonctionnel, l'appareil respiratoire peut être subdivisé en deux, d'un côté l'arbre bronchique, de la trachée aux bronchioles, assurant la conduction et le conditionnement

de l'air, et de l'autre le poumon périphérique, des bronchioles aux alvéoles, dont la fonction est d'assurer les échanges gazeux d'O₂ et de CO₂ entre les poumons et le sang.

2. Histologie

L'appareil respiratoire est constitué d'un ensemble de tissus qui diffèrent en fonction des régions afin de s'adapter aux différents diamètres des voies respiratoires mais aussi aux différentes fonctions. Il est constitué d'un ensemble de couches superposées de la façon suivante (figure 7) :

- une muqueuse constituée de trois structures, un épithélium, une lame basale et un chorion (composé de tissu conjonctif dans lequel circulent des nerfs et des vaisseaux);
- une sous muqueuse ;
- une musculuse ;
- une adventice .

La particularité des bronches est d'avoir en plus une couche de cartilage.

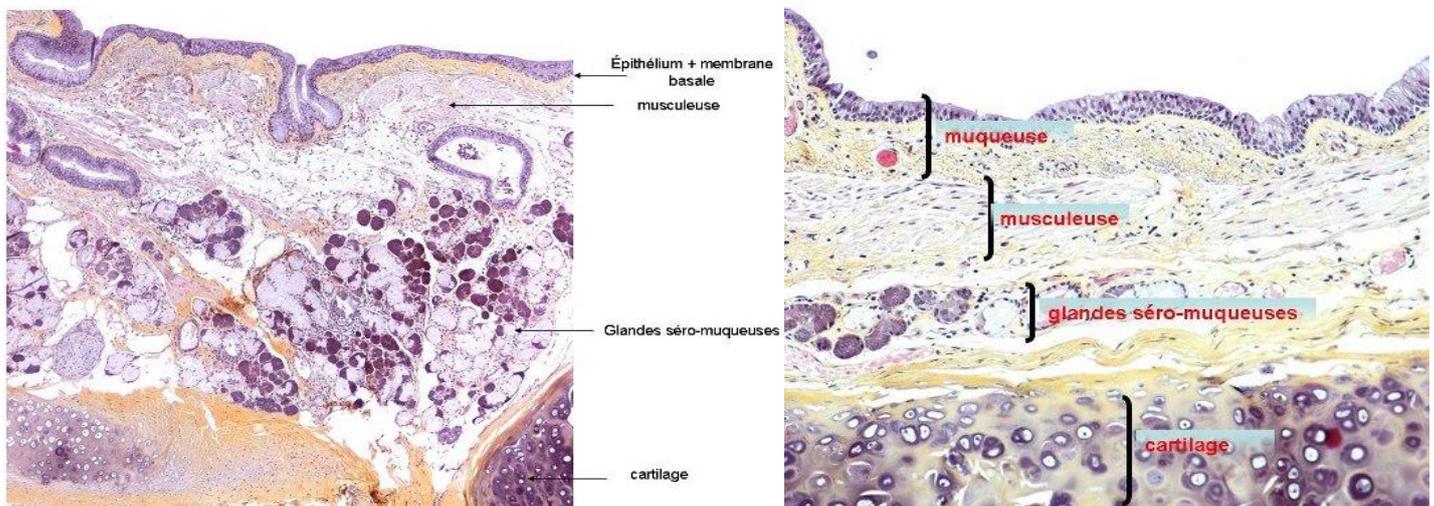


Figure 7 : Histologie des bronches : coupe transversale de tissu bronchique (www.respir.com)

L'épithélium de l'arbre bronchique est constitué de plusieurs types cellulaires (figure 8) :

- les cellules ciliées, les plus nombreuses dans l'épithélium, participant à la clairance mucociliaire. Chaque cellule possède entre 200 et 300 cils, localisés au niveau apical ;
- les cellules caliciformes, environ 1 cellule pour 5 cellules ciliées, contribuant à la formation du mucus. Le mucus permet l'emprisonnement des bactéries et des poussières contenues dans l'air inspiré. Il possède des propriétés antibactériennes

et est constitué d'eau et d'électrolytes (95%), de mucines (2%), de protéines (1%), de lipides (1%) et de sels inorganiques (1%). Le nombre de cellules caliciformes augmentent avec l'augmentation de pathogènes dans l'air inhalé ;

- les cellules neuroendocrines, environ 3 à 5% des cellules épithéliales, ayant la capacité de détecter des variations dans les teneurs en O₂ et CO₂.

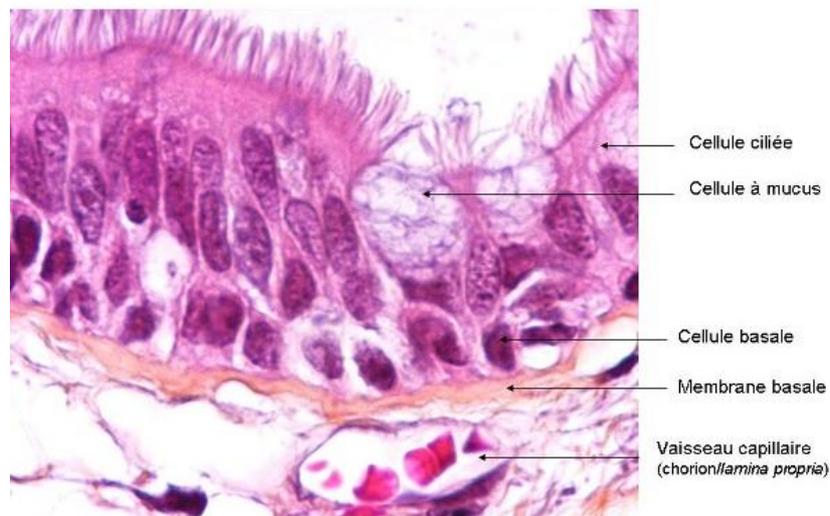


Figure 8 : Image en microscopie d'un épithélium de type respiratoire
(www.respir.com)

La muqueuse de l'arbre bronchique est constituée d'un épithélium pseudostratifié de type respiratoire, reposant sur une lame basale et du chorion conjonctif appelé *Lamina propria*. Entre le chorion et le cartilage s'insère une couche musculaire lisse, sous forme de spirale, permettant la contraction musculaire lors de l'inspiration et de l'expiration. La couche de cartilage assure la rigidité de l'arbre bronchique. Elle disparaît dans les bronchioles. La couche la plus externe est l'adventice, faite de tissu conjonctivo-adipeux, contenant les nerfs et les vaisseaux sanguins et lymphatiques.

Cet épithélium pseudostratifié devient unistratifié cylindrique puis cubique au niveau du poumon périphérique. Ce dernier est subdivisé en trois zones continues :

- une zone de conduction, les bronchioles terminales
- une zone de transition, les bronchioles respiratoires
- une zone d'échanges gazeux, les alvéoles

Avec les ramifications, l'épithélium se transforme progressivement en un épithélium cylindrique simple puis cubique au niveau des bronchioles. Le chorion s'est aminci et ne contient plus que quelques cellules musculaires lisses et des fibres de collagène. L'épithélium des bronchioles, des bronchioles terminales et des bronchioles respiratoires

est identique et renferme des cellules sécrétrices et riches en cytochrome P450, les cellules de Clara.

Les sacs alvéolaires sont reliés aux bronchioles respiratoires par des canaux alvéolaires, formés de fibres de collagènes et de fibres élastiques, recouverts par un épithélium cubique ou pavimenteux. Chaque sac alvéolaire comporte des alvéoles juxtaposées dépourvues de bourrelets alvéolaires. Leur nombre est estimé chez l'homme à 150 millions par poumon. La surface alvéolaire est évaluée à 80m². Les alvéoles sont constituées d'un épithélium pavimenteux, composé de pneumocytes. Elles sont séparées par les septa intra-alvéolaires, bordés de part et d'autre par un épithélium pavimenteux délimitant les alvéoles. Chaque septum possède un réseau de capillaires alvéolaires, entourés de cellules endothéliales. Les macrophages alvéolaires sont les principales cellules immunitaires retrouvées dans la lumière des alvéoles.

La plèvre se situe entre les poumons et la cage thoracique. Elle est composée d'une séreuse constituée de deux feuillets séparés par un espace dans lequel se trouve le liquide pleural, qui a pour rôle de favoriser le glissement entre les deux feuillets. Il abrite des cellules immunitaires comme les lymphocytes ou les macrophages.

Lors de l'inspiration, les PM_{2.5} contenues dans l'air vont pénétrer dans l'organisme par le système respiratoire et vont se déposer le long de l'arbre bronchique jusqu'aux alvéoles.

3. Déposition des PM_{2.5} le long de l'appareil respiratoire

Il s'agit d'un mécanisme complexe, dépendant des propriétés de l'aérosol comme la taille des particules, la morphométrie pulmonaire et la physiologie respiratoire.

La déposition des particules le long de l'appareil respiratoire est déterminée par différents paramètres, le diamètre aérodynamique équivalent étant le plus important, mais aussi l'anatomie de l'appareil respiratoire et le flux d'air inhalé. En effet, après inhalation, les particules les plus grosses seront retenues au niveau des voies aériennes supérieures. Plus la taille des particules diminue, plus ces dernières vont pénétrer en profondeur dans l'appareil respiratoire (figure 9). De par leur petite taille, les particules fines peuvent pénétrer jusqu'aux alvéoles pulmonaires.

Trois mécanismes physiques de déposition existent : la diffusion, la sédimentation et l'impaction. Ce sont majoritairement les particules avec le Dae le plus petit qui pénètrent par diffusion (Dae inférieur à 500nm). La sédimentation repose sur le fait que les

particules sont soumises à la gravité. Ce processus de déposition est important pour les particules ayant un Dae supérieur à 500nm. Enfin les particules se déposent par impaction. Ce processus repose sur l'inertie des particules, et va dépendre du diamètre des PM, de leur densité mais aussi de la vitesse du flux d'air. Ce mécanisme est dominant au niveau de la région trachéobronchiale, sauf pour les PM dont le Dae est inférieur à 0,1µm, qui, elles, vont pénétrer par diffusion.

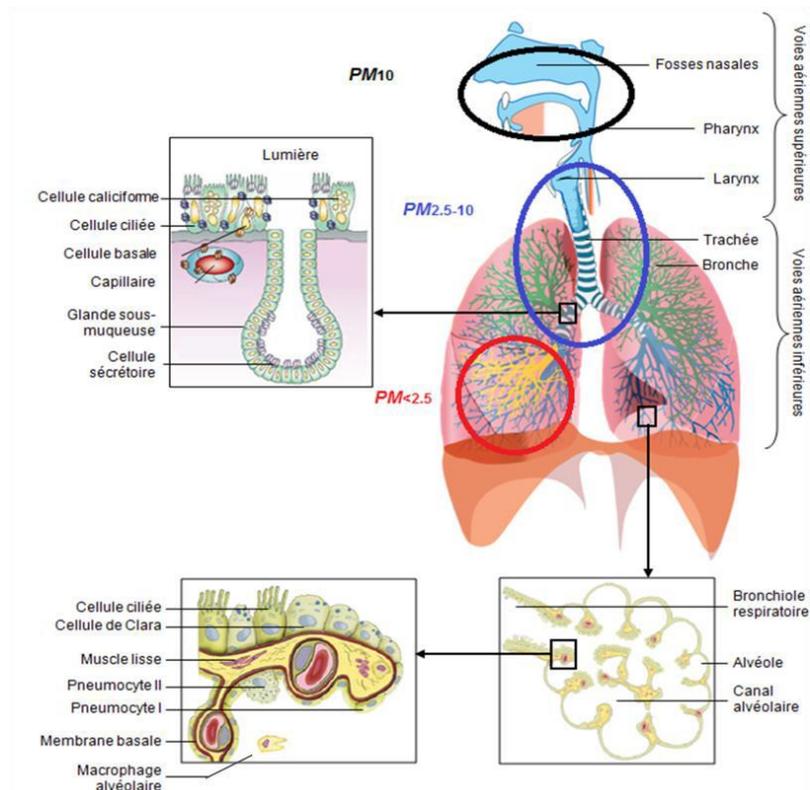


Figure 9 : Pénétration des particules atmosphériques le long de l'arbre respiratoire humain. En fonction de leur Dae, les particules vont se déposer à des endroits différents de l'appareil respiratoire : les plus grosses restent piégées dans les voies aériennes supérieures, les plus fines pénètrent jusqu'aux alvéoles pulmonaires.

Au niveau des voies aériennes supérieures vont se déposer les particules grossières. 95% des PM ayant un Dae supérieur à 10 µm vont être bloquées au niveau du nez. Les particules dont le Dae est compris entre 2,5 et 10 µm (PM_{2,5-10}) se déposent principalement au niveau de l'arbre trachéo-bronchique. Environ 20 % des PM_{0,1-2,5} sont capables de pénétrer jusqu'aux alvéoles, entraînant avec elles les composés adsorbés potentiellement toxiques. Enfin, les PM_{0,1} se répartissent tout le long de l'arbre respiratoire et adoptent un comportement de plus en plus proche de celui des gaz à mesure que leur diamètre diminue, conduisant à une augmentation du taux de déposition au niveau extra-thoracique (figure 10).

L'étude de ce mécanisme est d'autant plus complexe qu'il n'existe pas de modèle représentatif. Pour des raisons éthiques plus qu'évidentes, il n'y a pas de modèle humain et les modèles animaux représentent mal l'architecture de l'appareil respiratoire humain.

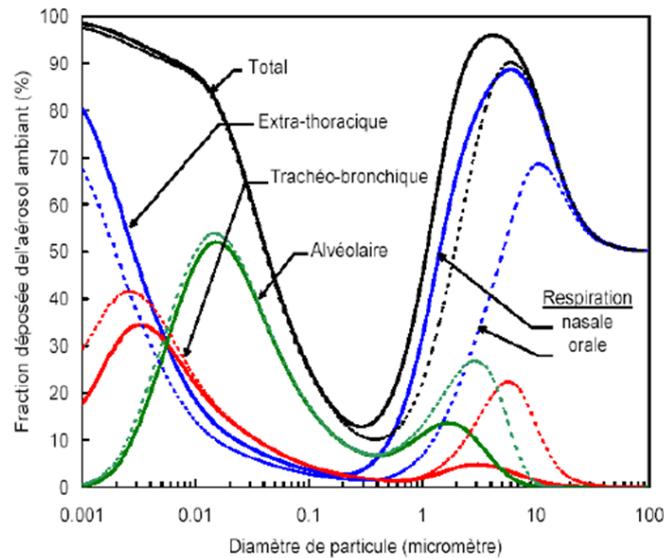


Figure 10 : Prédiction du dépôt total et régional des particules dans l'appareil respiratoire en fonction de la taille des particules
 Source IRSST 2006. Cette figure illustre le taux de déposition dans les différentes régions pulmonaires en fonction de la taille des particules

4. Rétention et clairance pulmonaire des particules

L'appareil respiratoire possède ses propres moyens de défense contre l'entrée de xénobiotiques tels que les particules fines. Le premier mécanisme mis en place est la toux. Au niveau de la région bronchiale, les cellules épithéliales possèdent des cils (environ 200 à 300 cils par cellules) (cf cellules ciliées chapitre B.2). Les cellules ont également la capacité de sécréter du mucus, qui représente une barrière physique qui en plus de posséder une substance antimicrobienne, protège l'épithélium, dilue les xénobiotiques, absorbe les gaz et capte les particules. L'action combinée des cils et du mucus est appelée clairance mucociliaire. Il existe un autre type de clairance, réalisée par les macrophages alvéolaires phagocytant les pathogènes, appelé clairance macrophagique.

Les mécanismes de clairance des particules représentent un aspect important des défenses pulmonaires permettant l'évacuation d'une partie des particules inhalées et par conséquent une diminution de l'absorption de ces dernières. Ils varient en fonction de la région pulmonaire, et permettent l'élimination des particules des voies respiratoires avec

une efficacité et une vitesse différente en fonction du lieu de déposition des particules. Il est à souligner que seuls les mécanismes de toux, éternuements et mouchage éliminent totalement les particules de l'organisme, alors que les mécanismes de clairance conduisent à rediriger les particules vers le système digestif, lymphatique ou encore le réseau vasculaire pulmonaire.

Les particules ultrafines sont plus difficilement éliminées par le mécanisme de clairance que les particules fines. En effet, il semblerait qu'elles soient plus difficilement phagocytées par les macrophages alvéolaires, ce qui entraîne une persistance des particules ultrafines au niveau alvéolaire et donc une interaction plus forte avec les cellules, d'où un impact toxicologique plus important de celles-ci (Oberdörster et al., 2005). Les macrophages jouent un rôle clef dans la réponse immunitaire pulmonaire, car ils sont directement exposés à l'air et donc aux particules atmosphériques ou aux différents polluants ou pathogènes contenus dans la fraction d'air inspiré. Ils sont également impliqués dans l'inflammation qui se manifeste dans des maladies pulmonaires comme les Broncho Pneumopathies Chroniques Obstructives (BPCO) ou encore l'asthme.

C. MACROPHAGES

Les macrophages font partie de la première ligne de défense de l'organisme face aux attaques des pathogènes et autres éléments étrangers, appelés xénobiotiques, permettant ainsi leur élimination. Longtemps considérés comme des cellules « éboueuses », les macrophages jouent dans la réponse immunitaire un rôle beaucoup plus complexe : phagocytose, présentation de l'antigène aux lymphocytes T, sécrétion de médiateurs de l'inflammation (chiomiokines, cytokines...) et régulation de la réponse immunitaire. Ces cellules jouent également un rôle prépondérant dans la régulation immunitaire, la réparation tissulaire et dans le maintien de l'homéostasie cellulaire.

En situation non-inflammatoire, la majorité des macrophages sont des macrophages dits résidents. Ces macrophages sont déjà différenciés et résident comme leur nom l'indique dans un tissu ou un organe particulier, permettant ainsi d'avoir des macrophages opérationnels dans les tissus ou organes les plus susceptibles d'être agressés. Les macrophages sont distribués dans tous les tissus et possèdent différentes fonctions influençant leur localisation. En fonction de cette localisation, ils portent différents noms :

- Cellules de Kupffer dans le foie
- Macrophages alvéolaires, interstitiels, dans le poumon
- Histiocytes ou spongiocytes dans le tissu conjonctif

- Microgliocytes dans le tissu nerveux
- LysoDC et lysoMac dans les plaques de Peyer
- Ostéoclastes dans le tissu osseux

Il n'existe pas de marqueurs spécifiques pour distinguer les cellules infiltrantes des cellules résidentes. Il est cependant intéressant de noter que les macrophages résidents seraient généralement anti-inflammatoires alors que les macrophages infiltrants auraient plus tendance à être pro-inflammatoires (Lichtnekert et al., 2013).

1. Origine des macrophages

Ces dernières années une révolution conceptuelle dans notre compréhension du développement des macrophages s'est opérée. Contrairement à l'hypothèse émise de longue date selon laquelle les macrophages dérivent uniquement des monocytes circulants (van Furth and Cohn, 1968), des études récentes ont décrit différents types de précurseurs macrophagiques produits de manière indépendante pendant le développement embryonnaire (van de Laar et al., 2016). Il a été montré que les macrophages résidant dans le tissu pulmonaire ont la capacité de s'auto-répliquer et de proliférer, et ont pour origine soit le sac vitellin extra-embryonnaire, soit le foie fœtal. Ces études ont mené à la conceptualisation de deux populations de macrophages distinctes : une population résidant dans le tissu et originaire de l'embryon ou du foie fœtal et une population, dérivée des monocytes, originaire des cellules souches hématopoïétiques et recrutée à partir du sang (Figure 11) (Yamasaki and Eeden, 2018).

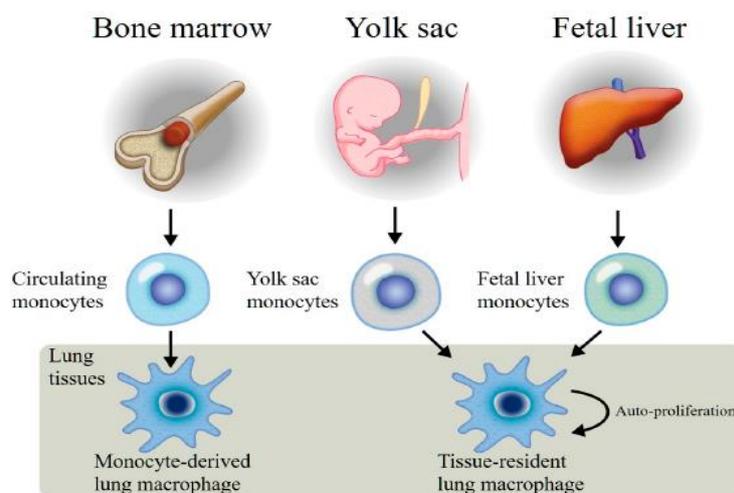


Figure 11 : Macrophages pulmonaires dérivés des monocytes provenant des cellules souches pluripotentes de la moelle osseuse et recrutés dans le tissu pulmonaire.

*Ces macrophages ont des fonctions de prolifération limitées. Les macrophages résidant dans le tissu pulmonaire proviennent soit du sac vitellin soit du foie fœtal, sont recrutés dans les poumons pendant les stades précoces de développement pulmonaire, et deviennent des macrophages pulmonaires résidents avec des fonctions d'auto-prolifération.
(D'après Yamasaki and Eeden, 2018)*

Les macrophages recrutés à partir des monocytes circulants ont donc pour origine les cellules souches hématopoïétiques (CSH) de la moelle osseuse. Ce processus de formation des cellules sanguines est appelé hématopoïèse. L'hématopoïèse représente l'ensemble des processus physiologiques assurant la production continue et régulée des cellules sanguines, appelées également éléments figurés du sang (figure 12). Cela permet la production quotidienne d'environ 10^{12} cellules sanguines.

Sous l'influence de différents facteurs, une CSH va s'engager dans la différenciation d'une lignée cellulaire. Les progéniteurs sont des cellules souches déjà engagées vers une voie de différenciation mais morphologiquement identiques aux CSH. Il existe 2 types de progéniteurs qui vont conduire à 2 lignées cellulaires différentes, le progéniteur lymphoïde et le progéniteur myéloïde.

Sous l'action de signaux exogènes, les progéniteurs vont se différencier en précurseurs qui après multiplication et maturation conduiront à des cellules sanguines matures et fonctionnelles qui passeront alors de la moelle osseuse au sang.

Les monocytes sont issus de la lignée myéloïde. Sous l'action de l'interleukine 3 (IL-3) et du GM-CSF (Granulocyte Macrophage – Colony Stimulating Factor), les CSH entrent en cycle et prolifèrent en cellules souches multipotentes, perdant leur caractère totipotent. Ces cellules souches multipotentes ou CFU-GEMM (Colony Forming Unit - Granulocytaire Erythrocytaire Mégacaryocytaire Monocytaire) sont également appelées progéniteurs myéloïdes.

Ces progéniteurs myéloïdes vont ensuite donner naissance à des monoblastes-promonocytes, immatures, qui vont poursuivre leur multiplication et leur maturation pour enfin donner des monocytes matures et fonctionnels. Ces monocytes circulants seront appelés sur le site d'une agression et se différencieront en macrophages en passant dans les tissus.

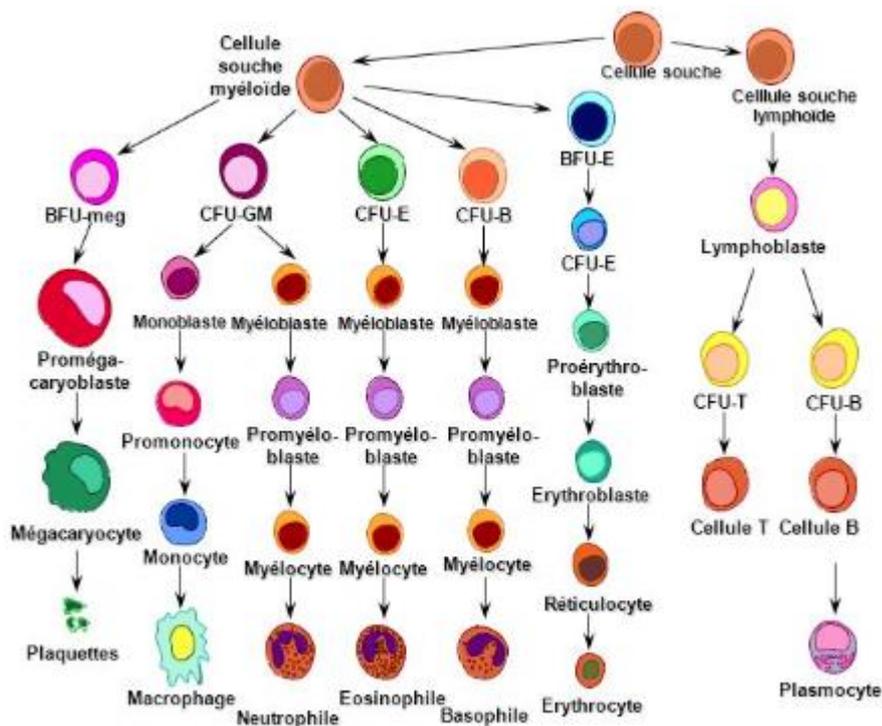


Figure 12 : Hématopoïèse
 Illustration schématique de la formation des éléments figurés du sang
 CFU : colony forming unit ; BFU : burst forming unit
<https://slideplayer.fr/slide/502480/>

2. Fonctions

Les macrophages pulmonaires sont essentiels à la régulation des réponses innées dans les poumons. Ils sont impliqués dans la défense cellulaire contre les xénobiotiques inhalés (i.e., irritants aériens, polluants, bactéries et virus), et permettent de garder les voies aériennes propres. Après phagocytose d'un élément étranger, celui-ci va être détruit sous l'action des enzymes lysosomiales et des radicaux libres de l'oxygène. Les macrophages peuvent ensuite présenter des fragments de cet élément étranger à leur surface, ce qui fait de ces cellules, avec les cellules dendritiques, des cellules liant l'immunité innée et l'immunité adaptative.

Les macrophages présentent à leur surface de nombreux marqueurs et notamment des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Ces molécules assurent la présentation d'un fragment du pathogène, ce qui active alors les lymphocytes T. Il existe 2 types de CMH, le CMH de classe I, activant les lymphocytes T CD8+ et le CMH de classe II, activant les lymphocytes T CD4+. Toutes les cellules possèdent du CMH de classe I, mais seules les cellules présentatrices d'antigènes professionnelles, comme les

macrophages, possèdent du CMH de classe II et ont la capacité de stimuler les lymphocytes T CD4+.

Après activation, les macrophages résidents génèrent et libèrent des médiateurs qui stimulent la moelle osseuse afin de libérer des monocytes. Ils augmentent leur recrutement dans le poumon où ils se différencient en macrophages alvéolaires, complétant alors l'action des macrophages pulmonaires résidents (Goto et al., 2004).

Ces monocytes circulants peuvent se différencier en trois sous-populations inflammatoires ou anti-inflammatoires, basées sur l'expression des marqueurs de surface CD14 et CD16. Les monocytes CD14⁺⁺CD16⁻ sont appelés classiques et sont les plus prévalents dans le sang. Les monocytes CD14⁺⁺CD16⁺ sont intermédiaires et contribuent de manière significative à l'athérosclérose. Les monocytes CD14⁺CD16⁺⁺ sont référencés en tant que « non-classiques » et ont une fonction de patrouille (Yang et al., 2014).

3. Polarisation

Une fois dans le poumon, les monocytes peuvent se différencier en Macrophages Alvéolaires (MA) localisés dans les espaces aériens des poumons (Fathi et al., 2001). Ces macrophages ont un niveau élevé de plasticité phénotypique et fonctionnelle pour s'adapter et répondre à une grande variété d'agressions environnementales et jouent un rôle clef dans l'inflammation.

En s'activant, les macrophages vont se polariser en macrophages de phénotype M1 ou M2. On peut distinguer 4 phases de l'inflammation (Murray and Wynn, 2011) :

- Recrutement des cellules immunitaires par le tissu ;
- Différenciation et activation in situ ;
- « Switch » en cellules suppressives ;
- Retour à l'homéostasie ou inflammation chronique.

Pendant ces différentes phases, les deux types de macrophages, M1 ou M2, seront présents, en plus ou moins grande quantité. Chaque phénotype présente des caractéristiques spécifiques, est activé par des facteurs différents et libère des médiateurs spécifiques (figure 13).

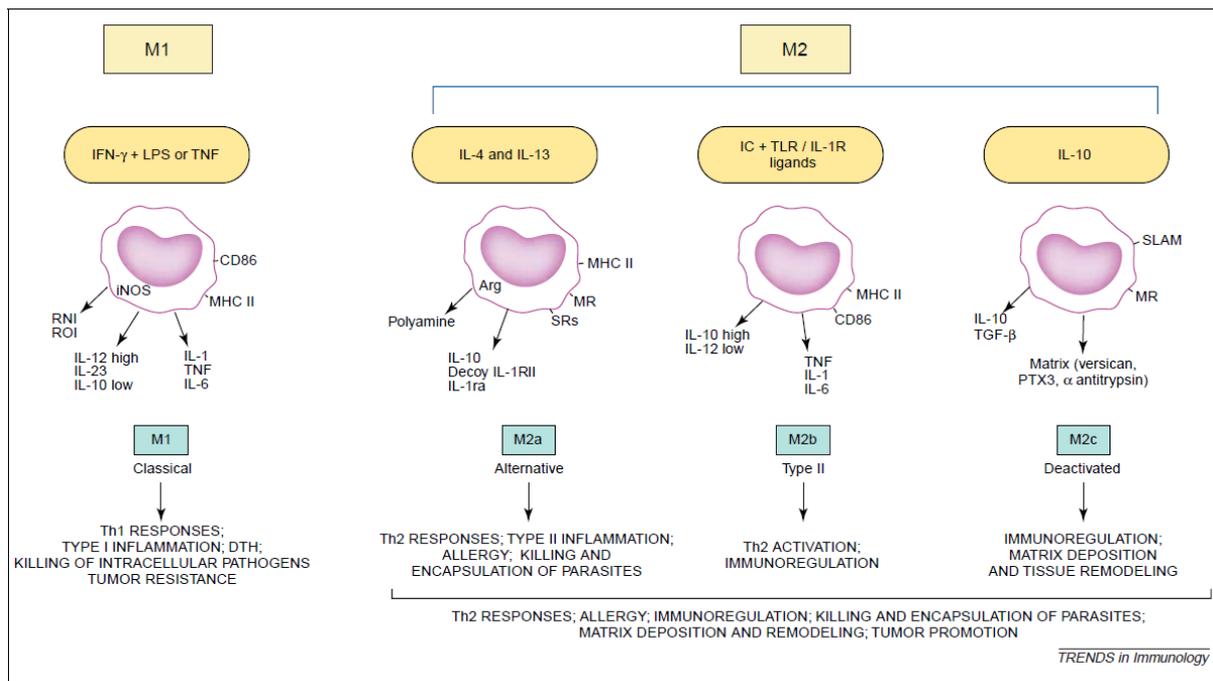


Figure 13 : Les différents types de polarisation des macrophages : inducteurs, caractéristiques et fonctions (D'après Mantovani et al., 2004)
 Les macrophages exposés au LPS et à l'IFN γ sont polarisés en M1. En fonction des inducteurs, IL4 et IL3, complexe immu ou IL10, il existe 3 types de macrophages M2 présentant des fonctions différentes :M2a, M2b et M2c

a) Polarisation M1

Il existe une balance entre les 2 types de polarisation. La polarisation M1 est la voie de polarisation classique. Elle est retrouvée dans un microenvironnement inflammatoire, sous l'action de cytokines comme l'IFN γ ou le TNF α , et son rôle est la défense de l'hôte.

La polarisation des macrophages en phénotype M1 résulte de l'activation de certains récepteurs spécifiques appelés récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (PRR), notamment les récepteurs de type Toll (TLR). Les PRR sont des récepteurs du système immunitaire inné, impliqués dans la reconnaissance des pathogènes. Ces PRR reconnaissent des motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMP) et aux dégâts cellulaires (DAMP) et cette reconnaissance va déclencher la phagocytose et/ou activer la mise en place de mécanismes effecteurs induisant une inflammation.

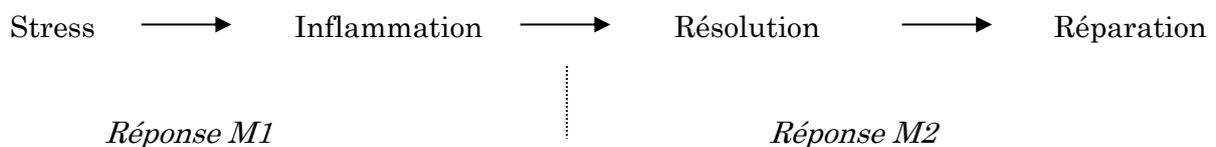
Il existe trois types de PRR. Les PRR solubles ou sécrétés, retrouvés dans les fluides, vont activer le complément et par conséquent la phagocytose en jouant le rôle d'opsonines. Les PRR membranaires, présents à la surface de cellules comme les macrophages, sont les plus nombreux. Ils vont soit activer la phagocytose (pour les récepteurs de type mannose (MMR : macrophages mannose receptor), scavengers ou les récepteurs aux lectines) ou

bien activer la réponse inflammatoire (dans le cas des récepteurs TLR, toll like receptor). Enfin les PRR cytoplasmiques ou PRR de signalisation vont permettre l'activation de cytokines proinflammatoires via le recrutement de caspases (dans le cas des récepteurs NLR) ou activer des voies de signalisation comme la voie NF- κ B ou encore la voie des MAP-Kinases.

La réponse inflammatoire est multiple. Les macrophages M1 expriment un haut niveau de cytokines proinflammatoires, produisent des espèces réactives de l'oxygène (ERO) et activent des réponses immunitaires spécifiques (Galli et al., 2011). Ces macrophages M1 ont donc la capacité de détruire le pathogène directement par phagocytose, de recruter des neutrophiles, d'induire l'inflammation, mais également de présenter l'antigène aux lymphocytes T qui prendront en charge le pathogène. Cette fonction de cellule présentatrice d'antigène est médiée par la libération de cytokines comme le TNF α , l'IL12 ou l'IL23. On observe alors la mise en place d'une « boucle d'auto activation » : les cellules T activées libèrent de l'INF γ qui à son tour activera les macrophages M1 et augmentera l'activité antimicrobienne.

b) Polarisation M2

Après la phase inflammatoire intervient la polarisation M2, dont le rôle est d'inhiber et de réguler la réponse M1. Cette réponse M2 participe également au phénomène de réparation tissulaire.



Il est indispensable qu'une fois le pathogène éliminé, l'inflammation s'arrête. Pour cela, les macrophages se polarisent en macrophages M2. Ce phénotype est caractérisé par la production de médiateurs anti-inflammatoires permettant la résolution de l'inflammation et le retour à l'homéostasie. Ces macrophages M2 jouent également un rôle dans la reconstruction des tissus, notamment en libérant des facteurs comme l'ornithine (Mills, 2015).

Les macrophages M2 sont également impliqués dans la défense contre les infections parasitaires. Ces cellules présentent une activité importante de phagocytose, expriment fortement le récepteur mannose et libèrent des chimiokines spécifiques, différentes de celles sécrétées par les macrophages M1.

Ce phénotype est induit par l'IL4 ou l'IL10, les glucocorticoïdes et les complexes immuns (Mueller et al., 2002; Stein et al., 1992).

Dans ce processus de polarisation de type M2 sont retrouvés plusieurs types de macrophages (M2a, M2b ou M2c), avec des fonctions et des caractéristiques différentes.

- la polarisation de type M2a est induite sous l'effet de l'IL4 et de l'IL13. Le rôle de ces macrophages est anti-inflammatoire. Ces cellules vont libérer différents facteurs conduisant à une diminution des cytokines proinflammatoires et des espèces réactives de l'azote tout en augmentant l'expression de récepteurs scavengers comme le récepteur mannose CD206 ;
- la polarisation de type M2b est stimulée notamment par la fixation des complexes immuns. Les fonctions des macrophages M2b sont contraires à celles des macrophages M1, avec une augmentation de l'IL10 et une diminution de l'IL12. Ce sont des macrophages qui vont cependant sécréter de l'IL6 ou de l'IL1 β et ne sont donc pas considérés comme anti-inflammatoires mais plutôt comme des immunorégulateurs ;
- la polarisation M2c caractérisée par des macrophages stimulés par l'IL10, le TGF β ou les glucocorticoïdes. Ceux-ci jouent un rôle majeur dans la durée et l'intensité de la réponse inflammatoire. L'IL10 sécrétée va inhiber la libération de TNF α , d'IL6 ou encore de l'IL12 mais va également diminuer la capacité des macrophages M1 à présenter l'antigène (Ehrchen et al., 2006). Ce sont des macrophages nécessaires au maintien de l'homéostasie (Edwards et al., 2006; Martinez et al., 2008). Ces macrophages M2c sont également appelés macrophages régulateurs (Mreg) (Galli et al., 2011).

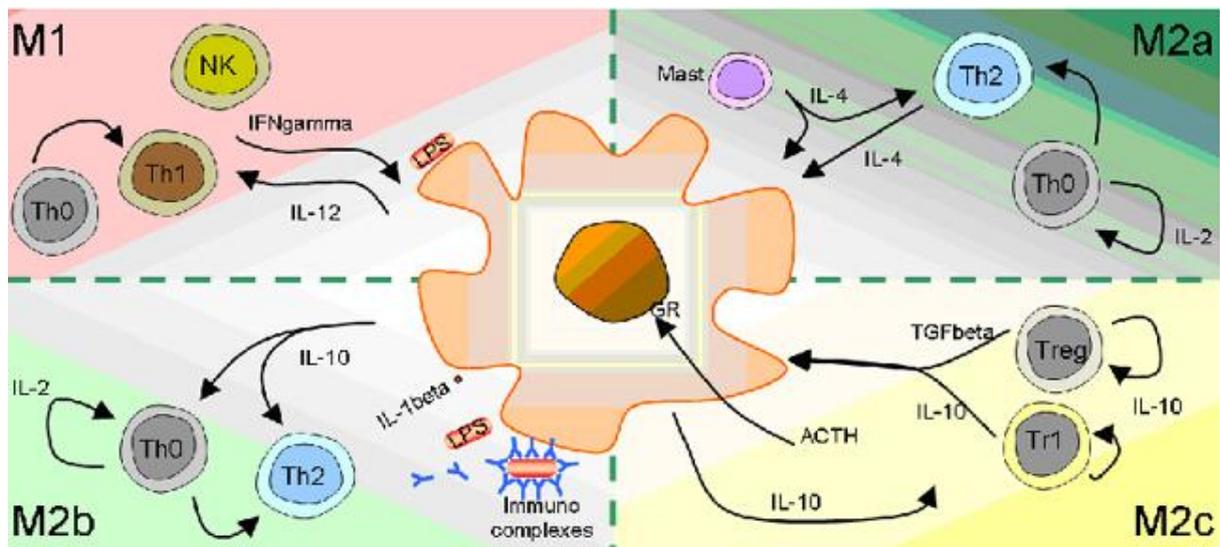


Figure 14 : Représentation schématique des différents types de polarisation des macrophages
(D'après Martinez et al., 2008)

Les macrophages ont la capacité de s'activer différemment sous l'influence de médiateurs spécifiques. La polarisation classique est la polarisation de type M1, médiée par le LPS et l'IFN γ ; l'IL4 et l'IL13 entraînent une polarisation alternative M2a ; la ligation des complexes immuns sur les macrophages induit une polarisation antagoniste à la polarisation M1 ; la polarisation M2c, entraînée par l'IL10, les glucocorticoïdes ou le TGF β , est impliquée dans l'arrêt de la phase inflammatoire

A l'état physiologique, après une agression de l'organisme, une chronologie dans la réponse immunitaire se met en place. Les macrophages se polarisent en M1 afin de lutter contre le pathogène puis celui-ci une fois détruit, une réponse anti-inflammatoire s'instaure. Dans le cas d'une inflammation chronique, cet équilibre est rompu. Les macrophages continuent de se polariser, soit en macrophages M1 ou en macrophages M2. Cette accumulation de macrophages polarisés est problématique et peut entraîner d'autres pathologies, les macrophages M2 ayant par exemple un potentiel pro-tumorigène. Une action prolongée de l'activité inflammatoire des macrophages MA est retrouvée dans certaines pathologies inflammatoires aiguës comme les pneumopathies d'origine bactérienne. Les macrophages M2 retrouvés dans les cas d'inflammation chronique vont entraîner un remodelage excessif des tissus, pouvant aller jusqu'à une fibrose tissulaire. Ces macrophages sont stimulés par le TGF β (figure 15).

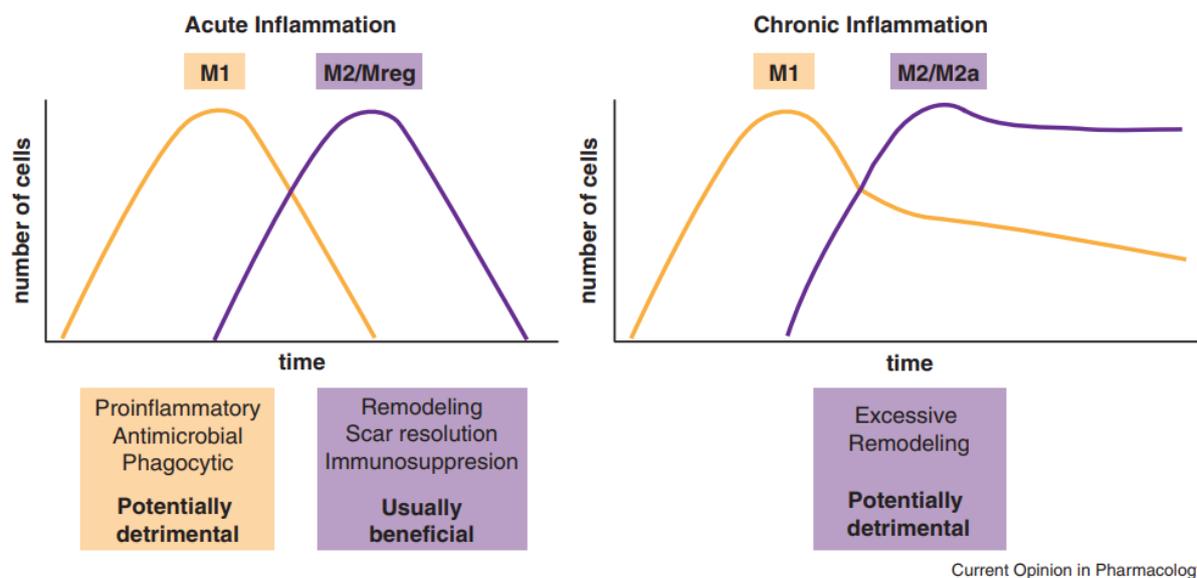


Figure 15 : Polarisation des macrophages en cas d'inflammation aiguë ou chronique
(D'après Lichtnekert et al., 2013)

La réponse inflammatoire présente une chronologie. Les macrophages se polarisent en M1 sous l'action de médiateurs spécifiques avec comme rôle la destruction du pathogène, puis la réponse inflammatoire doit être stoppée et les tissus réparés, il y a alors une intervention des macrophages de type M2. Dans le cas d'une inflammation chronique, cette balance est rompue et les macrophages M1 et M2 s'accumulent dans les tissus.

4. Macrophages et PM_{2.5}

Les réponses des macrophages pulmonaires aux PM peuvent varier en fonction de la nature des particules, plus spécifiquement en fonction de leur taille, de leur géométrie et de leurs caractéristiques chimiques. Les macrophages phagocytent facilement les plus petites particules (< 10µm) (van Eeden et al., 2001) mais coopèrent fréquemment collectivement et forment des cellules multinucléées géantes pour transformer les plus grandes (>10µm) (Anderson et al., 2008). En 2004, Goto et al. ont montré qu'une pénétration de PM dans le poumon stimule la moelle osseuse à la libération de monocytes dans la circulation, afin de contrôler et terminer la réponse inflammatoire dans le poumon (Goto et al., 2004).

De plus, il a été montré qu'une exposition directe de macrophages de souris aux PM_{2.5} augmente la polarisation M1 et diminue la polarisation M2 (Zhao et al., 2016a). Une exposition des macrophages aux PM_{2.5} induit également la libération de cytokines proinflammatoires comme l'IL6, l'IL8 ou encore le TNFα (Monn and Becker, 1999; Pozzi et al., 2003) et va induire une phosphorylation de NF-κB, une augmentation de la sécrétion de la protéine MCP-1 (monocyte chemotactic protein-1), un stress oxydant et une induction de HO-1 (He et al., 2017). En 2017, Ma et al. ont aussi montré que le niveau élevé de

production de cytokines inflammatoires par les lymphocytes T était largement dépendant de la présence de macrophages (Ma et al., 2017). Une étude de Sun et collaborateurs a mis en évidence que chez des souris atteintes de diabète, une exposition aux PM_{2.5} augmentait le nombre de macrophages dans la graisse viscérale, et que ces macrophages présentaient un profil de type M1, proinflammatoire caractérisé par une augmentation du TNF α et de l'IL6 ainsi qu'une diminution de la sécrétion de l'IL10 (Sun et al., 2009).

Par ailleurs, des études ont mis en évidence une corrélation entre stress oxydant, la sécrétion de certaines cytokines ou l'induction de gènes comme HMOX ou NQO1 dans les macrophages avec la composition des particules et notamment lorsque ces dernières contiennent du vanadium, du nickel ou encore des HAP (Hamad et al., 2016; Saint-Georges et al., 2008). De plus, une exposition à des particules d'échappement Diesel altère certains marqueurs et certaines fonctions de polarisation de macrophages humains à travers l'activation du récepteur AhR et de Nrf2, particulièrement en régulant les gènes cibles de Nrf2 : Hmox-1 dans les M1 et NQO-1 dans les M2 (Jaguin et al., 2015). Notre équipe a également mis en évidence que des PM_{2.5} de Dunkerque induisent l'expression de gènes codant pour des Enzymes de Métabolisation des Xénobiotiques (EMX) (Saint-Georges et al., 2008) et la formation d'adduits à l'ADN (Abbas et al., 2009, 2013) dans des cultures primaires de MA issus de Lavages Broncho-Alvéolaires (LBA). Enfin, en 2016, Zhao et al. ont montré qu'une exposition de macrophages isolés de lavages bronchoalvéolaires de souris aux PM_{2.5} augmentait la polarisation de type M1 via la production des ERO et en parallèle inhibait la réponse anti-inflammatoire (Zhao et al., 2016a).

D. TOXICITE DES PM_{2.5}

Les études actuelles montrent une relation entre exposition à la pollution, inflammation, stress oxydant, dommages à l'ADN (Risom et al., 2005) (Møller et al., 2014) et cancer (Møller et al., 2008)

Il semblerait que le stress oxydant soit le premier processus mis en œuvre (avant même l'inflammation) après exposition aux PM_{2.5}. Cependant, il est difficile de savoir si la génotoxicité est due au stress oxydant ou à l'inflammation (Møller et al., 2014).

Il existe également des mécanismes créant des lésions sur l'ADN qui sont des mécanismes non-oxydatifs, comme ceux générés par les HAP (Demetriou et al., 2012).

La durée de l'exposition présente une réelle importance et peut déterminer le type de pathologies en résultant. Les expositions longues vont augmenter le risque de cancers et

de maladies respiratoires et cardio-vasculaires alors que les expositions plus courtes auront plutôt tendance à aggraver des maladies comme l'asthme ou les bronchites (Sørensen et al., 2003).

1. Stress Oxydant

Il est maintenant connu qu'une exposition aux $PM_{2.5}$ peut conduire à la génération et la libération d'espèces réactives de l'oxygène (ERO). Ces ERO sont des dérivés oxygénés, rendus très réactifs par la présence d'électrons de valence non appariés. Les différentes espèces réactives de l'oxygène sont présentées dans le tableau 3 :

Tableau 3 : Espèces réactives de l'oxygène

Espèces réactives de l'oxygène (ERO)	
1O_2	Oxygène singulet
$O_2^{\cdot -}$	Anion superoxyde
H_2O_2	Peroxyde d'hydrogène
HO^{\cdot}	Radical hydroxyde
O_3	Ozone
ROO^{\cdot}	Radical peroxyde
RO^{\cdot}	Radical alkyle
HO_2^{\cdot}	Hyperoxyde

L'oxygène est indispensable pour tous les organismes aérobies. Cependant, cela est très contradictoire car il est à la fois nécessaire à la survie de l'organisme mais est aussi l'un des précurseurs des ERO.

La production des espèces réactives de l'oxygène est un phénomène très régulé, notamment grâce à de nombreuses enzymes comme la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT), la lactoperoxydase (LPO) ou encore la glutathion peroxydase (GPx). Il existe également des systèmes non enzymatiques de défense de l'organisme face à ces ERO, comme par exemple lors de l'oxydation du glutathion réduit (GSH) en glutathion oxydé (GSSG) ou encore par de petites molécules liposolubles comme les vitamines E, A ou C. Ce processus de régulation est appelé système antioxydant (figure 16).

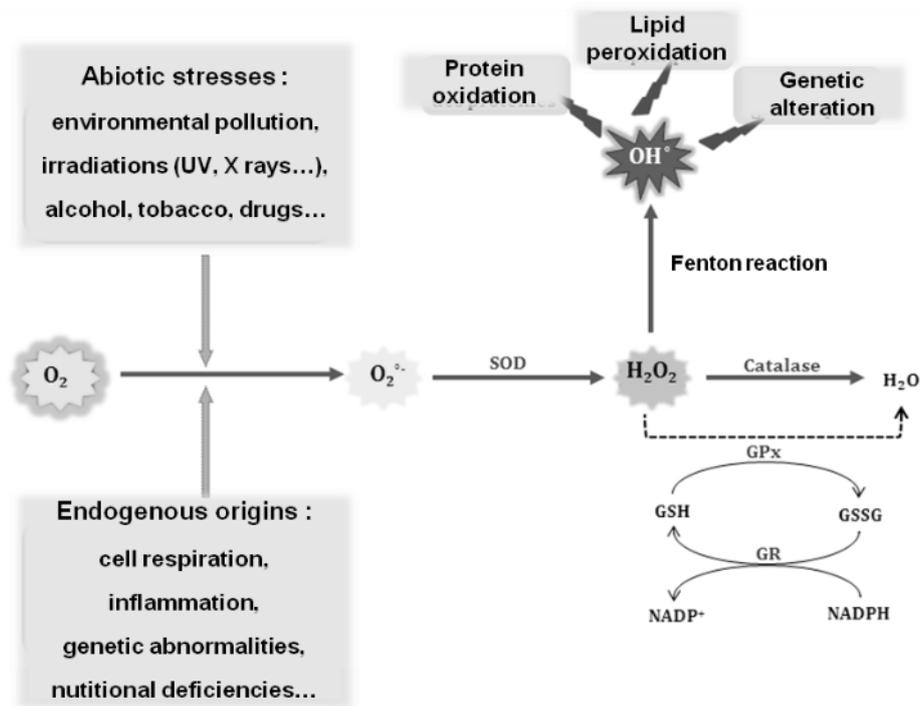


Figure 16 : Les espèces réactives de l'oxygène (ERO) et leur système simplifié de détoxification. (D'après Gualtieri et al., 2017)

Les ERO causent de nombreux dégâts cellulaires grâce à leur capacité à interagir et à dégrader les protéines, les lipides et l'ADN. Cependant à faible dose, elles jouent un rôle bénéfique pour l'organisme, interagissant dans des processus physiologiques comme l'apoptose (Gardes-Albert, M et al., 2003).

Les ERO sont continuellement générées et dégradées par l'organisme. Lorsque l'équilibre physiologique entre production de ERO et réponse antioxydante n'est plus respecté, les ERO s'accumulent et vont alors conduire à un état connu sous le nom de stress oxydant (Deng et al., 2013a; Dergham et al., 2012; Jin et al., 2018). Ce dernier peut contribuer à l'apparition de différentes pathologies, le plus souvent en lien avec l'inflammation (Rahman et al., 2006), comme par exemple la fibrose idiopathique pulmonaire (Fubini and Hubbard, 2003).

On retrouve du stress oxydant après une exposition aux $PM_{2.5}$ et le plus souvent il est associé à la présence de composés organiques, comme les HAP retrouvés à la surface des particules (Longhin et al., 2013) ou de métaux comme le fer, le cuivre ou encore le vanadium, générant des ERO via la réaction de Fenton (Janssen et al., 2014; Sawyer et al., 2010).

Une augmentation des ERO suite à l'exposition aux $PM_{2.5}$ peut conduire à une inflammation via l'induction de cytokines proinflammatoires comme le $TNF\alpha$ ou l' $IL1\beta$,

l'activation de facteurs de transcription comme NF- κ B ou par la surexpression de gènes proinflammatoires (Bargagli et al., 2009; Li et al., 2018) (figure 17).

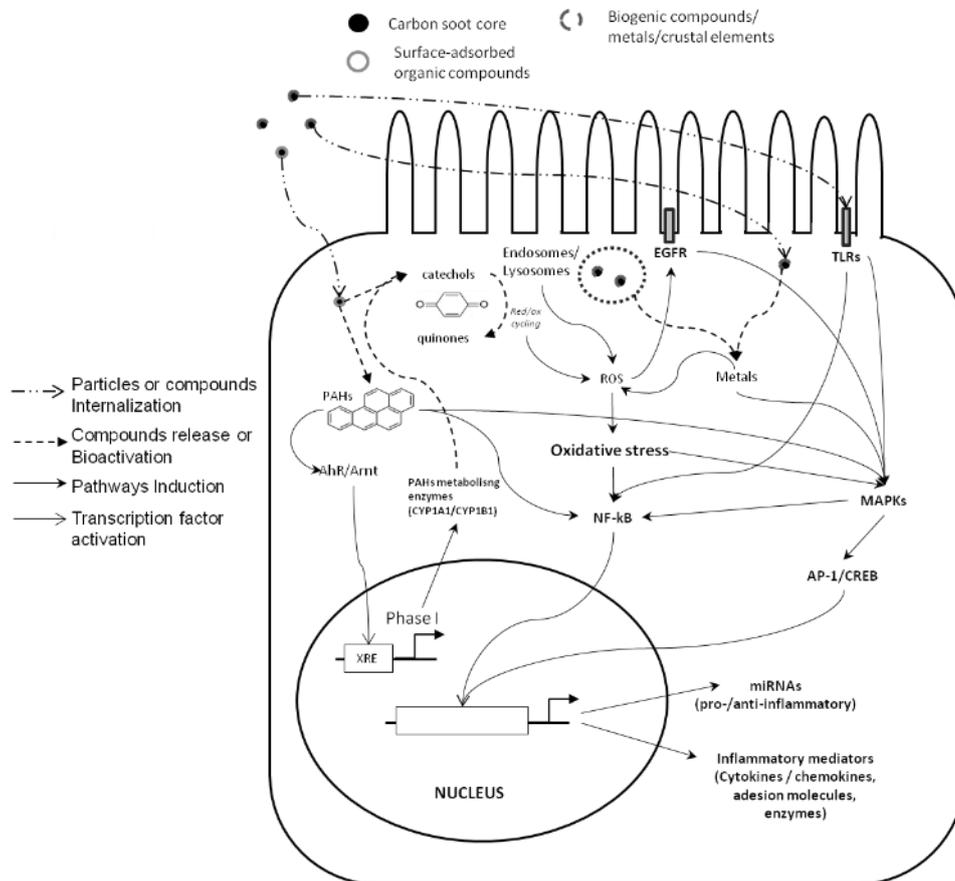


Figure 17 : Réponses inflammatoires mises en œuvre après exposition aux PM
D'après (Gualtieri et al., 2017)

Les PM vont activer différentes voies ciblant la réponse inflammatoire. Les particules ou les composés adsorbés à leur surface peuvent interagir avec les récepteurs membranaires et activer une cascade de signaux intracellulaires. Les HAP activent directement la translocation de NF- κ B ou la cascade des MAPK conduisant à la transcription de gènes de l'inflammation. Les métaux peuvent activer la cascade des MAPKs ou participer de façon indirecte à la formation de ERO. Les composés biogéniques adsorbés à la surface des particules peuvent se lier aux TLR et activer une signalisation en cascade résultant en la libération de médiateurs de l'inflammation. Des miARN peuvent également être transcrits en réponse aux PM et réguler alors une réponse inflammatoire.

2. Inflammation

L'inflammation est une réaction du système immunitaire suite à l'agression de l'organisme. C'est un processus nécessaire et généralement bénéfique pour l'organisme, visant à détruire le pathogène. Les causes d'une réaction inflammatoire sont multiples : infection (bactéries, virus, champignons), agression physique ou chimique de (blessures, brûlures, toxines...) ou peuvent même être endogènes (cancer).

L'inflammation peut être aiguë ou chronique. Une inflammation aiguë est une réaction immédiate à l'agression de l'organisme et de courte durée, la plupart du temps résolue après la destruction de l'agent infectieux ou du pathogène. L'inflammation chronique est une phase anormale de l'inflammation, car elle persiste dans le temps. Elle peut être due à la persistance du pathogène dans l'organisme, ce qui peut être le cas lors de l'exposition constante à des polluants ou encore provenir de pathologies comme les maladies auto-immunes, entraînant un état inflammatoire chronique.

De nombreuses études mettent en avant la relation entre inflammation et PM_{2.5}. Une exposition aux particules fines provoque une réaction pro-inflammatoire, entraînant une sécrétion plus importante de cytokines inflammatoires telles que le TNF α ou l'IL-6 (Manzano-León et al., 2016). L'exposition aux PM_{2.5} peut conduire également à la sécrétion d'IL1 β , une autre cytokine pro-inflammatoire. Dans une étude de Wang et collaborateurs, il est mis en avant que l'exposition aux PM_{2.5} entraînait une augmentation du nombre de cellules immunitaires (neutrophiles, lymphocytes et macrophages) et induire la sécrétion d'IL1 β via l'activation de l'inflammasome (Wang et al., 2017a).

Une exposition chronique aux PM_{2.5} peut modifier des marqueurs inflammatoires comme la protéine C réactive (CRP), directement impliquée dans le développement de maladies cardio-vasculaires (Ostro et al., 2014).

Elle peut aussi entraîner l'apparition de maladies inflammatoires chroniques. Par exemple, l'asthme est une pathologie inflammatoire chronique des bronches. Il a été montré que l'inflammation chronique tout comme la réponse immunitaire impliquée dans cette pathologie était en lien avec la composition chimique des PM_{2.5} (Wagner et al., 2012). On retrouve également une relation entre exposition aux PM_{2.5} et BPCO, notamment lors d'exposition de longue durée (Lakhdar et al., 2011; Rice et al., 2015). La BPCO est une maladie inflammatoire des poumons caractérisée par une limitation du flux d'air, et par des symptômes cliniques de type toux, crachats, et des difficultés respiratoires. L'inflammation chronique retrouvée dans cette maladie est notamment due à une augmentation significative du nombre de macrophages. Le rôle des différents phénotypes de macrophages (M1 versus M2) dans la BPCO n'est pas clair. Les expositions environnementales causant des BPCO produisent une agression soit aiguë soit chronique résultant en une réponse inflammatoire dans le poumon qui favorise à la fois les macrophages M1 et M2. Dans des conditions normales, les macrophages résidents sont principalement de type M2. Mais un stimulus inflammatoire, comme par exemple une exposition aux PM_{2.5}, peut mener à un switch des macrophages résidents de M2 à M1.

L'environnement dans le cas de la BPCO est tellement complexe que l'on peut retrouver simultanément quatre phénotypes distincts de macrophages : non-polarisés (M1 et M2 négatifs), M1, M2 et hybrides (M1 et M2 positifs) (Yamasaki and Eeden, 2018) (Figure 18).

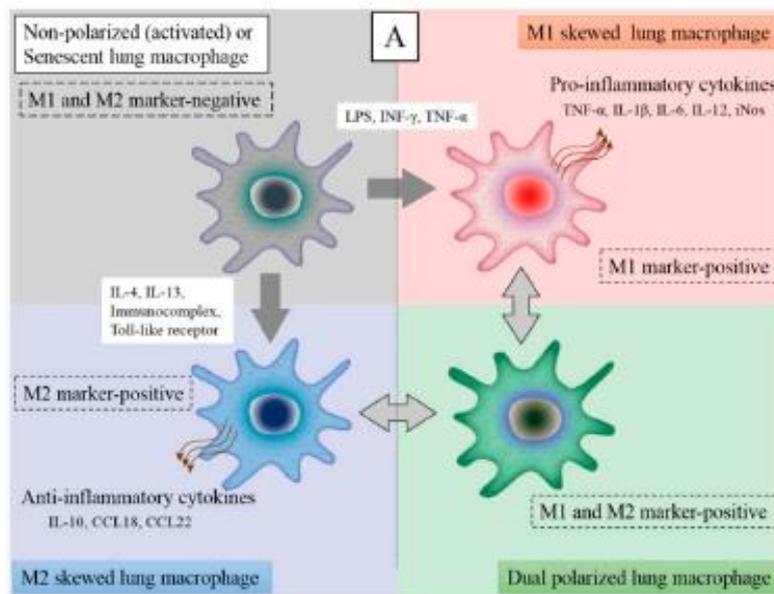


Figure 18 : Les patients atteints de BPCO ont au moins quatre types de macrophages dans leurs poumons. Les macrophages sénescents ou non-polarisés sont négatifs pour les marqueurs M1 et M2 et sécrètent de faibles niveaux de cytokines pro- et anti-inflammatoires (en haut à gauche). Après stimulation par des cytokines Th1 (LPS et/ou IFN γ), ces cellules deviennent polarisées majoritairement en M1 et sécrètent de hauts niveaux de cytokines pro-inflammatoires (en haut à droite). Mais si elles sont stimulées par des cytokines Th2, (IL-4 et/ou IL-13), ils deviennent polarisés en M2 et sécrètent de hauts niveaux de cytokines anti-inflammatoires (en bas à gauche). Les tissus de poumons de BPCO contiennent également une large population de macrophages doubles-positifs M1 et M2 (en haut à droite). (D'après Yamasaki and Eeden, 2018)

3. Apoptose

L'apoptose ou mort cellulaire programmée a été identifiée dans les années 70 (Kerr et al., 1972). C'est un processus physiologique par lequel les cellules programment leur autodestruction suite à la réception d'un stimulus spécifique, nécessaire dans bien des processus de l'organisme et présent dès l'embryogénèse, par exemple dans l'émergence des doigts.

Deux voies de signalisation régissent cette mort programmée : la voie extrinsèque ou voie des récepteurs de mort et la voie intrinsèque ou voie mitochondriale.

La voie extrinsèque est contrôlée par les récepteurs de mort et leurs ligands (FAS-FASL, TNFR1-TNF...). Elle est induite par du stress extracellulaire reçu et transmis par les récepteurs de mort. Après reconnaissance des ligands par leur récepteur, le complexe DISC (death inducing signal complex) va activer la procaspase 8 et par conséquent toutes les caspases en aval, provoquant alors la mort cellulaire par apoptose (figure 18).

La voie intrinsèque est dépendante de la mitochondrie, induite par des signaux intracellulaires durables, comme le stress oxydant, l'influx calcique cytosolique ou encore l'altération de l'ADN. Lorsque ce stress est trop important, une perméabilisation de la membrane mitochondriale externe (MMP) est observée conduisant à une libération dans le cytosol de molécules pro- et anti-apoptotiques comme le cytochrome C et à la formation de l'apoptosome (cytochrome C, pro-caspase 9, APAF1 (apoptotic protease-activating factor) et déoxyATP) menant à l'activation des caspases 3, 6 et 9, et à la mort cellulaire. La libération dans le cytosol de ces molécules pro- et anti-apoptotiques est régulée par les protéines de la famille Bcl-2. D'autres molécules sont libérées par la mitochondrie en même temps que le cytochrome C, comme SMAC/DIABLO (Second Mitochondrial Activator of Caspases/Direct-Inhibitor of Apoptosis-Binding Protein) ou AIF (apoptosis inducing factor) et mènent à la mort de la cellule indépendamment des caspases (Wang and Youle, 2009) (figure 19).

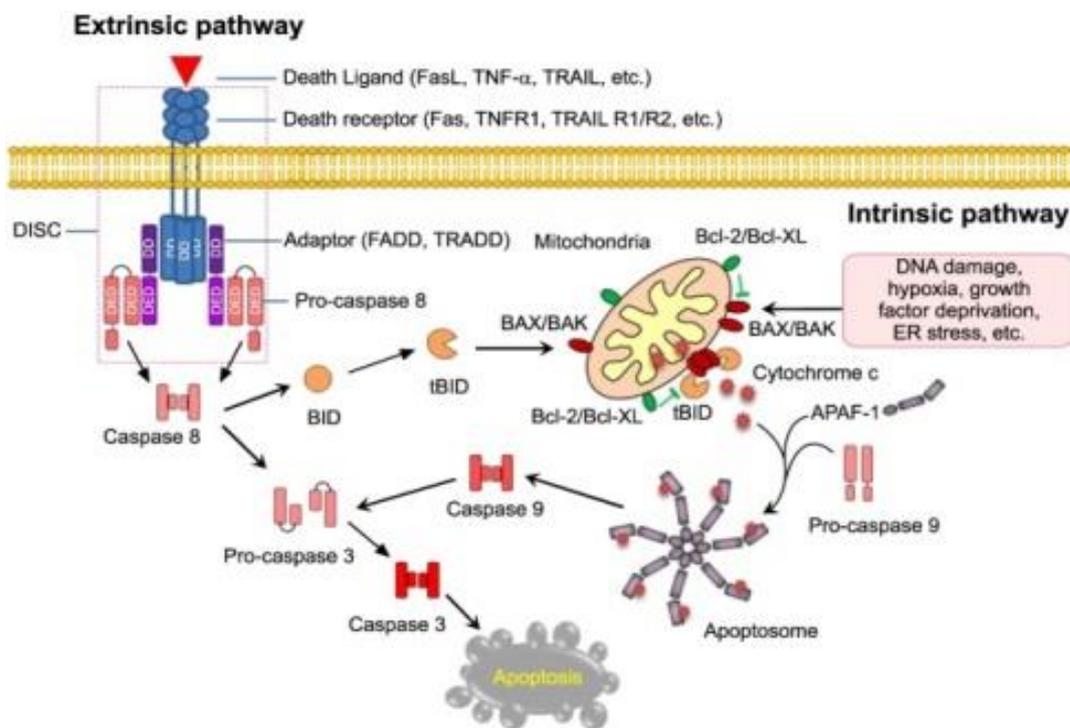


Figure 19 : Représentation schématique des processus d'apoptose
Schéma représentatif des différentes voies d'apoptose, dépendante ou non des récepteurs de mort, et mentionnant les différents acteurs ainsi que les différentes étapes du processus aboutissant à la mort cellulaire (Adapté de Sarvothaman et al., 2015).

Il est maintenant admis qu'une exposition aux PM_{2.5} entraîne l'apoptose des cellules exposées (Holian et al., 1998) et que la composition des particules est déterminante dans l'induction de la mort cellulaire des macrophages alvéolaires via les récepteurs scavengers

(Obot et al., 2002). Ainsi, de nombreux métaux présents dans les PM_{2.5} sont associés à l'apoptose. En effet, les PM_{2.5} peuvent entraîner la mort cellulaire à la fois via la voie intrinsèque et la voie extrinsèque. La mitochondrie, un des inducteurs de la voie intrinsèque, est une des cibles du stress oxydant induit après exposition aux particules fines (les altérations de la mitochondrie sont connues pour mener au stress oxydant), pouvant causer des dommages à l'ADN et mener à l'apoptose des cellules exposées (Upadhyay et al., 2003). Une étude de 2015 met en avant le fait que le nickel, le fer ou encore le vanadium peuvent conduire à l'apoptose des cellules exposées. L'exposition au vanadium entraîne la translocation du facteur de transcription HIF-1 α , régulateur de la réponse cellulaire à l'hypoxie (Visalli et al., 2015), et la surexpression de ce dernier, pouvant mener à un processus de cancérogénèse (Semenza, 2003).

4. Métabolisation des composants des PM_{2.5}

a) Généralités

La métabolisation est la transformation des produits qui pénètrent l'organisme, appelés xénobiotiques) en un ou plusieurs composés, dits métabolites, sous l'action de réactions chimiques se produisant dans une cellule.

L'organe principal impliqué dans la métabolisation des xénobiotiques est le foie, puis dans une moindre mesure, la peau, les reins, la muqueuse intestinale ou les poumons (Hodgson, E, 2004).

Dans une cellule, un xénobiotique est très rapidement pris en charge afin d'être biotransformé, ce qui constitue une première étape en vue de son élimination de l'organisme. Les xénobiotiques vont subir différentes modifications, permettant d'augmenter leur caractère hydrophile, ceci dans le but de les rendre moins actifs et plus facilement exportables hors de la cellule. Ce phénomène est appelé activation métabolique. Cette détoxification est rendue possible grâce à l'intervention d'enzymes de métabolisation des xénobiotiques (EMX). Le processus de métabolisation est divisé en trois phases : fonctionnalisation, conjugaison et élimination (figure 20).

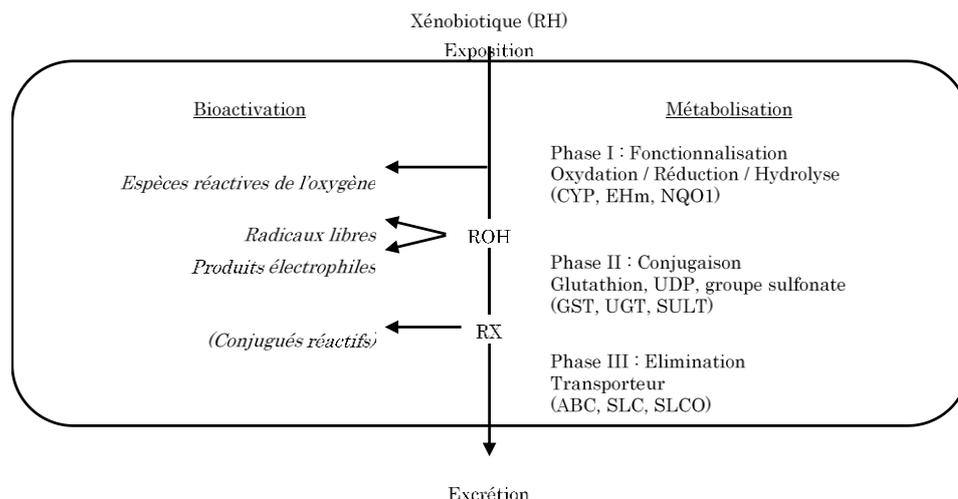


Figure 20 : Métabolisation et activation métabolique des xénobiotiques
CYP : Cytochrome P450; Ehm : Epoxyde Hydrolase microsomale; NQO1 : NAD(P)H-Quinone Oxydoréductase A; GST : Glutathion –S-transférase; UGT : UDP-GlucuronosylTransférase; SULT : SulfoTransférase; ABC : ATP-Binding Cassette; SLC : SoLute carrier; SLCO : SoLute Carrier Organic anion.
 (d'après Castell et al., 2005; Ding and Kaminsky, 2003; Xu et al., 2005)

○ *Phase I : fonctionnalisation*

Durant cette phase, un groupement fonctionnel polaire est ajouté sur le xénobiotique. Les réactions ayant lieu lors de cette phase de fonctionnalisation sont les suivantes : oxydation, réduction et hydrolyse.

Les réactions d'oxydation impliquent différentes enzymes comme les monooxygénases à cytochromes P450 (CYP). Les cytochromes sont des hémoprotéines retrouvées principalement dans la membrane du réticulum endoplasmique mais aussi dans la membrane interne des mitochondries. Ces protéines ont pour rôle de catalyser les réactions d'oxydation nécessitant de l'oxygène et du NADPH.

Il existe 4 familles de cytochromes (1 à 4), 6 sous familles (A à F) et 20 isoenzymes (1 à 20), chaque cytochrome ayant une fonctionnalité propre.

Les réactions d'hydrolyse font quant à elles appel à des estérases.

○ *Phase II : conjugaison*

La phase II est une phase de conjugaison durant laquelle les produits de la phase I subissent de nouveaux changements et sont conjugués avec un groupement polaire, comme le GSH, l'acide glucuronique ou encore un groupement sulfonate.

Les différentes réactions sont répertoriées dans le tableau 5 :

Tableau 4 : Principales réactions de la phase II de métabolisation
(Inserm 2001)

Enzymes	Réactions	Groupe transféré	Exemple de substrats
UDP-GlucuronosylTransférases (UGT)	Glucuro-conjugaison	Acide glucuronique	Hydroxylamines, arylamines
Sulfo-Transférases (ST)	Sulfo-conjugaison	Sulfate	Stéroïdes, phénols, amines, hydroxylamines
Méthyltransférases	Méthylation	Méthyle	Amines, catécholamines, imidazoles, thiols
Glutathion-STransférases (GST)	Conjugaison au glutathion	Glutathion	Epoxydes d'HAP, Arylamine
Acétyl-transférases	Acétylation	Acétyl	Arylamines, hydrazines
Glycine-transférases	Conjugaison à la glycine	Glycine	Acides carboxyliques aromatiques et aliphatiques

○ *Phase III : élimination*

Cette dernière phase consiste en une phase d'élimination des xénobiotiques de la cellule. Les produits de la phase II devenus hydrosolubles sont incapables de traverser la membrane plasmique. Ce sont alors les transporteurs de la phase III qui prennent ces produits en charge et permettent la sortie des xénobiotiques de la cellule et leur élimination.

b) Métabolisation des composés organiques des PM_{2.5}

Les PM_{2.5} portent des composés organiques comme les HAP, Les PCDD, les PCDF ou les PCB (cf chapitre I.A.2.b). Leur libération dans les cellules, ainsi que leur biodisponibilité cellulaire peuvent induire les enzymes de la phase I et de la phase II.

Les HAP comme les PCB sont des substrats mais aussi des inducteurs des enzymes de métabolisation. Ces molécules vont être transformées par l'organisme. Les PCDD/F sont résistants à la biotransformation et vont s'accumuler dans le foie et les tissus adipeux (Wessel, 2010), induisant alors l'expression de gènes codant pour des EMX.

Les métabolites formés après métabolisation sont pour la plupart neutralisés par conjugaison. Il arrive cependant que la quantité soit trop importante et que ces métabolites s'accumulent, notamment à cause du fait que les enzymes de la phase II soient moins inductibles que celles de la phase I. Les métabolites formés peuvent parfois être plus toxiques, comme les quinones, les époxydes ou encore les aldéhydes.

○ *Métabolisation des HAP*

Parmi les différents HAP, le benzo[a]pyrène (B[a]P) est le composé souvent pris comme modèle dans les études de métabolisation des HAP.

Une fois dans la cellule, le B[a]P se fixe avec l'Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR). Cette liaison entraîne la dissociation du complexe protéique AhR dans le cytoplasme et permet l'entrée dans le noyau de l'AhR. Une fois dans le noyau, l'AhR se lie avec l'Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator (ARNT), ce qui induit l'expression de gènes codant pour CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, CYP2S1, GST, UGT ou encore SULT1B1, via le Xenobiotic Response Element (XRE). Ce mécanisme est contrôlé par l'Aryl Hydrocarbon Receptor Repressor (AhRR). AhRR est le répresseur de AhR, il se fixe sur l'ARNT, ce qui entraîne une compétition avec l'AhR pour la fixation sur les régions XRE (Mimura and Fujii-Kuriyama, 2003).

Les enzymes GST, SULT1B1 et UGT sont impliquées dans la détoxification des métabolites générés (Bui et al., 2009; Castell et al., 2005; Shimada, 2006; Teubner et al., 2002).

Les métabolites électrophiles des HAP ont également la capacité d'activer des éléments de réponse aux antioxydants (ARE, Antioxidant Responsive Element), situés dans les régions promotrices des gènes des enzymes de phase II. Ces enzymes font partie des gènes régulés par l'AhR et sont en lien direct avec d'autres gènes, dépendant de l'activation du Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (NFE2L2 ou NRF2). Le contact avec les HAP entraîne la dissociation du complexe Nrf2/Keap1. Nrf2 transloque dans le noyau et se fixe à des protéines Maf sur l'ARE, induisant alors l'expression de gènes codant pour les enzymes de phase II comme NQO1, GST ou UGT (Miao et al., 2005) (figure 21).

Il existe trois voies de biotransformation des HAP :

- La voie des diol-époxydes, dépendante des CYP450 qui entraîne la formation d'époxydes instables hydrolysés en diol ;
- La voie des o-quinones, catalysée par des dihydrodiols déshydrogénases, formant des catéchols qui après deux oxydations successives forment des quinones ;
- La voie du radical cation, encore appelée voie du carbocation, catalysée par des peroxydases dépendantes du CYP450, entraînant la formation d'un radical cation activé.

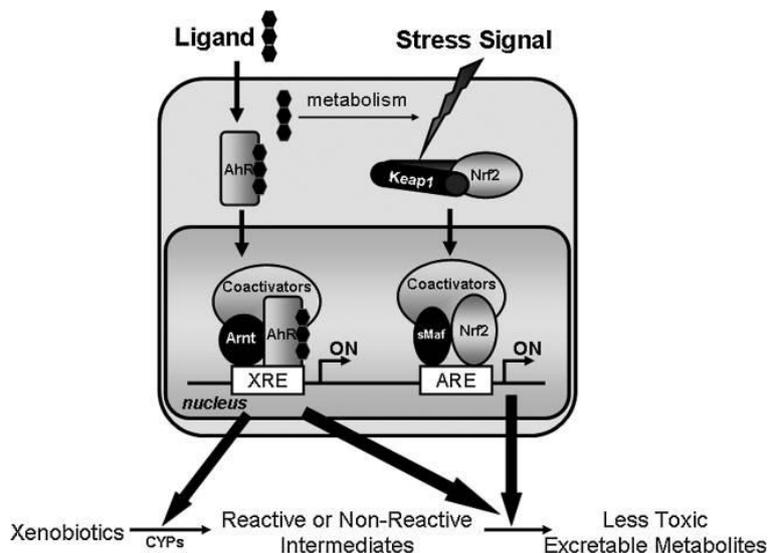


Figure 21 : Régulation du métabolisme des xénobiotiques par l’AhR et NRF2

*Les xénobiotiques sont métabolisés par les cytochromes P450 (CYP) en intermédiaires qui peuvent être plus ou moins réactifs. Les intermédiaires réactifs peuvent être métabolisés par des enzymes cytoprotectrices en des produits moins toxiques et souvent facilement excrétables. Quand il est activé par un ligand, l’AhR dans le cytoplasme se complexe avec ARNT, transloque dans le noyau et induit la transcription des CYP en se liant aux Eléments de Réponse aux Xénobiotiques (XRE). NRF2 lié à KEAP1 dans le cytoplasme transloque dans le noyau quand la voie de transduction est activée par des stress électrophiliques ou de radicaux libres exogènes ou endogènes, et se lie aux Eléments de Réponse aux Antioxydants (ARE) pour induire la transcription de gènes cytoprotecteurs.
(D’après Wakabayashi et al., 2010)*

○ Métabolisation des PCB

La biotransformation des PCB mène à la formation de quinones toxiques ou d’époxydes ayant la capacité de réagir avec les acides nucléiques ou les protéines, formant alors des adduits à l’ADN.

La métabolisation des PCB est réalisée par l’intermédiaire des CYP450, notamment des familles 1A et 2B. Plus les PCB possèdent de chlores, plus le taux de métabolisation diminue, entraînant alors une accumulation dans les tissus (Mills et al., 1985).

Il est maintenant bien connu qu’une exposition à la pollution atmosphérique et aux particules fines est néfaste pour la santé humaine et que cette exposition peut entraîner l’apparition de cancers broncho-pulmonaires. En pénétrant en profondeur dans les poumons et en se déposant dans les alvéoles, les PM_{2.5} vont provoquer un stress oxydant, une inflammation importante et la libération de médiateurs de l’inflammation par les cellules immunitaires résidentes ou infiltrantes. Mais les cellules peuvent également libérer d’autres médiateurs, comme les vésicules extracellulaires (EV).

E. VESICULES EXTRACELLULAIRES

A l'origine, les Vésicules Extracellulaires (EV) étaient considérées comme des fragments de cellules mortes. Au cours de ces vingt dernières années, elles ont été identifiées comme des médiateurs de la communication cellulaire (Raposo et al., 1996; Zitvogel et al., 1998). Ce sont des petites vésicules libérées par les cellules (normales et pathologiques) de façon spontanée mais également sous l'effet d'un stimulus comme par exemple un stress chimique ou physique incluant le stress oxydant (Ratajczak et al., 2006). Elles sont libérées dans le milieu extracellulaire et en conséquence sont retrouvées dans les fluides humains (sang, urine, lavages broncho-alvéolaires). Après libération des EV dans l'espace extracellulaire, ces dernières vont agir sur une cellule cible et en modifier le phénotype et le comportement. L'action des EV sur leur cellule cible sera différente en fonction du type d'EV, mais aussi en fonction de leur contenu.

A l'heure actuelle, plusieurs types d'EV ont été mis en évidence, en fonction de l'origine de formation des vésicules dans la cellule :

- les exosomes (les plus petites avec une taille variant de 30 à 150nm) ayant comme origine la voie endosomale de la cellule ;
- les ectosomes ou microvésicules (mesurant de 100 à 1 000nm) provenant du bourgeonnement de la membrane plasmique de la cellule d'origine
- les corps apoptotiques (de taille bien plus importante, de 1 à 5µm) (figure 22). Nous parlerons dans cette partie uniquement des exosomes et des ectosomes.

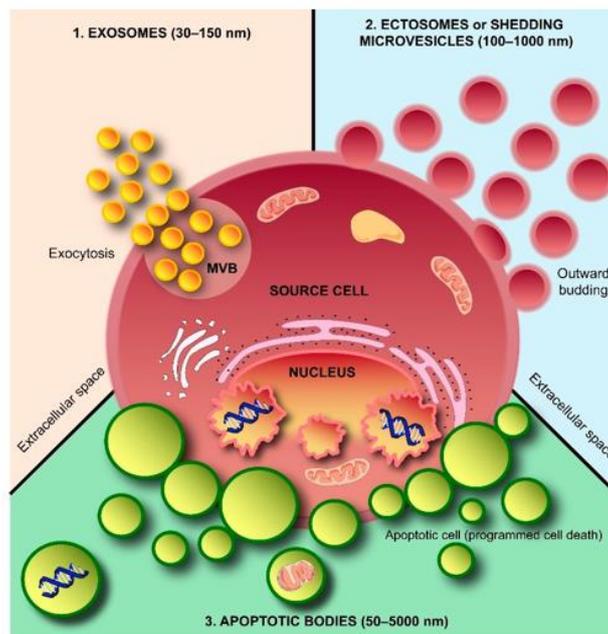


Figure 22 : Vésicules extracellulaires (EV) et mode de libération par la cellule d'origine
Représentation schématique des différents types d'EV: exosomes, microvésicules et corps apoptotiques, qualifiés en fonction de leur origine cellulaire. (D'après Kalra et al., 2016)

1. Biogénèse

Les exosomes et les ectosomes sont classés en fonction de leur origine et de la façon dont la cellule va les sécréter (figure 23).

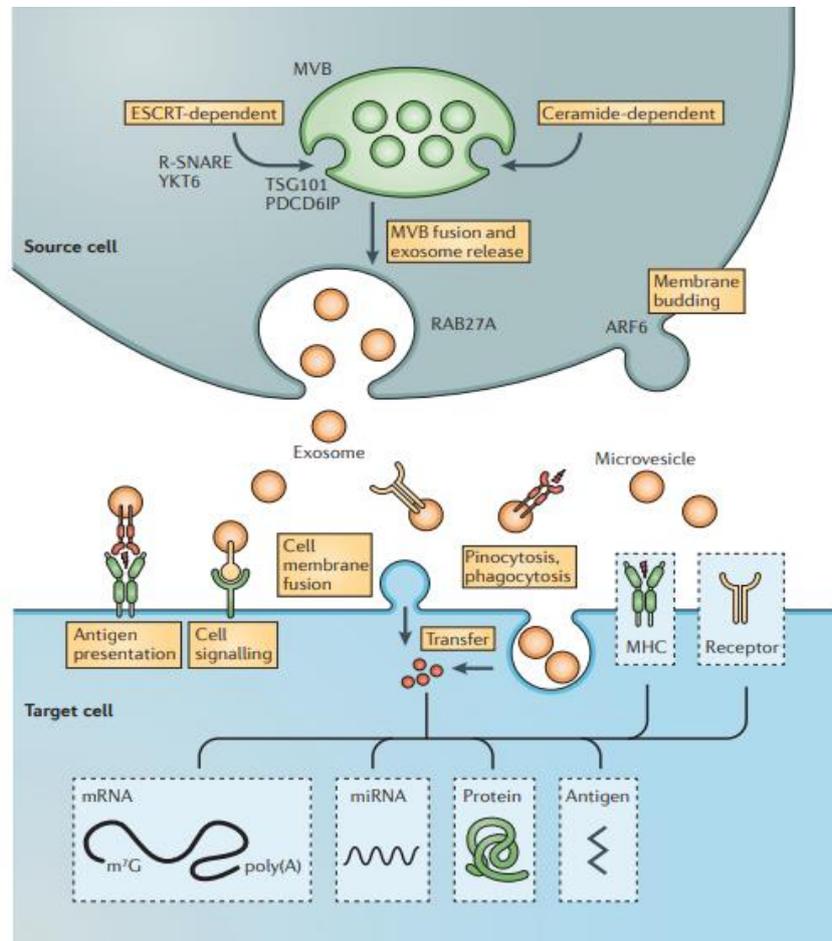


Figure 23 : Représentation schématique de la libération des Vésicules Extracellulaire (EV) et du transfert de leur matériel biologique à la cellule cible

Le mode de formation des EV détermine le type d'EV (exosomes, microvésicules). Une fois libérées par la cellule, les EV vont interagir avec une cellule cible et en modifier le phénotype après transfert du matériel contenu dans les vésicules (acides nucléiques, protéines...)

(D'après Andaloussi et al., 2013)

a) Biogénèse des exosomes

Les exosomes sont formés dans la voie endosomale. Les corps multivésiculaires (*Multivesicular bodies*, MVB) encore appelés *Multivesicular Endosome* (MVE) sont formés dans les endosomes précoces puis libérés dans le cytoplasme de la cellule. Ces MVB contiennent des vésicules intraluminales (ILV) qui seront libérées dans l'espace extracellulaire sous forme d'exosomes (figure 24).

Différents types de MVB coexistent dans une même cellule. Ces vésicules sont formées par bourgeonnement interne de la membrane externe des endosomes, via deux mécanismes, l'un faisant appel à un complexe protéique, l'*Endosomal Sorting Complex Required for Transport* ou ESCRT, l'autre mécanisme étant ESCRT indépendant.

Les MVB peuvent fusionner avec les lysosomes et leur contenu sera alors dégradé ou recyclé. Ils peuvent également fusionner avec la membrane plasmique et les ILV contenues dans les MVB seront libérées dans l'espace extracellulaire sous forme d'exosomes. Il semblerait que le niveau de cholestérol contenu dans les MVB régule le devenir de ces vésicules. Un taux important de cholestérol entraîne une fusion avec la membrane plasmique et une libération d'exosomes. Dans le cas contraire, un faible taux de cholestérol conduira à la fusion avec les lysosomes et à la dégradation des vésicules (Möbius et al., 2002).

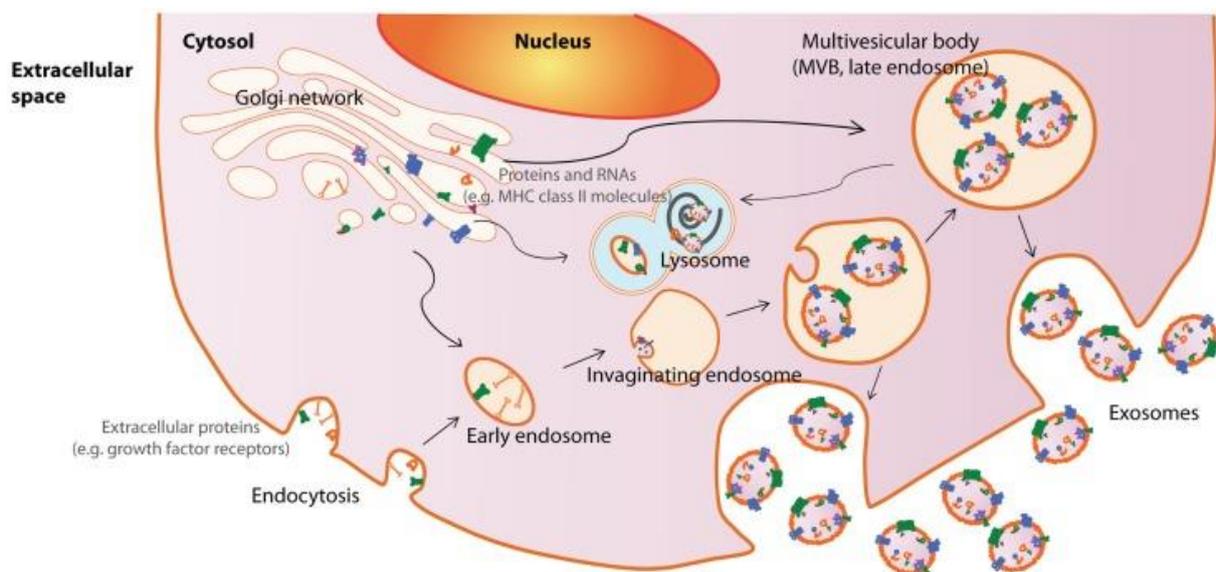


Figure 24 : Représentation schématique de la biogénèse des exosomes

Les EV sont libérées par la cellule après que les MVB fusionnent avec la membrane plasmique. Les MVB sont formés par invagination de la membrane des endosomes tardifs et possèdent donc des protéines et des ARN, comme du CMH de classe II, des protéines Rab ou encore des protéines de transport.
(d'après Zhang et al., 2014)

- *Biogénèse ESCRT-dépendante*

ESCRT est un complexe regroupant une trentaine de protéines assemblées en quatre complexes (ESCRT-0, -I, -II, -III). Ces complexes sont eux-mêmes associés à d'autres protéines comme la protéine *Vacuolar Protein Sorting-associated Protein 4A* (VPS4), la protéine *Vacuolar Protein Sorting-associated Protein VTA1* (VTA1) ou encore la protéine *ALG2-interacting Protein X* (ALIX).

ESCRT-0 a pour fonction la reconnaissance et la séquestration des protéines transmembranaires ubiquitinées, tandis que les 3 autres complexes sont responsables de la déformation de la membrane des endosomes (ESCRT-I et ESCRT-II) et de la scission de la vésicule (ESCRT-III).

ESCRT-0 est composé de deux protéines : la protéine *hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate* (HRS) et la protéine *Signal Transducing Adaptator Molecule* (STAM). HRS reconnaît les protéines ubiquitinées et s'associe avec STAM pour recruter ESCRT-I, via la protéine TSG101.

ESCRT-I recrute à son tour ESCRT-II et III via la protéine ALIX.

La dissociation et le recyclage de la machinerie ESCRT requiert l'interaction avec la protéine VPS4.

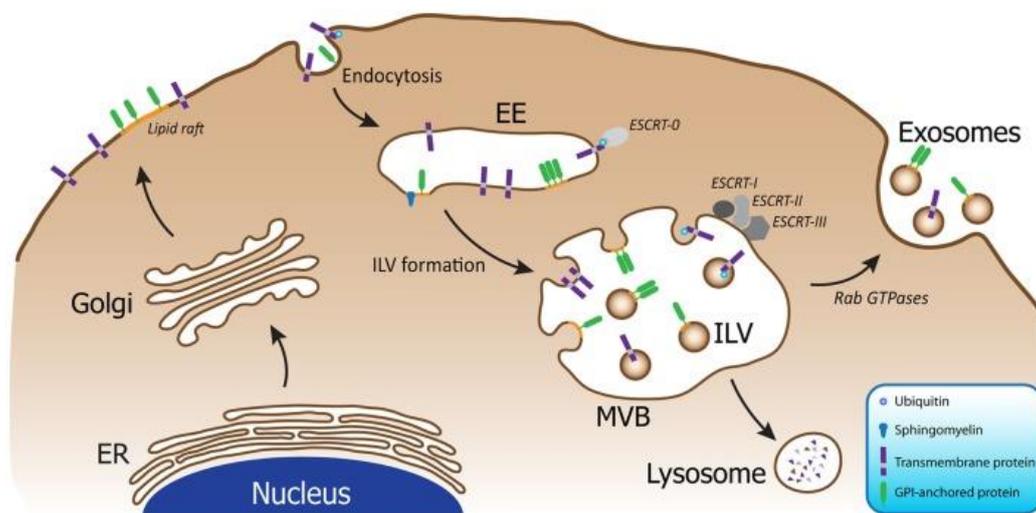


Figure 25 : Biogénèse ESCRT-dépendante

La machinerie ESCRT facilite l'internalisation dans les MVB. Les MVB peuvent ensuite soit fusionner avec les lysosomes et le contenu sera dégradé, soit fusionner avec la membrane plasmique de la cellule, résultant en la libération des exosomes.

(D'après Bellingham et al., 2012)

○ *Biogénèse ESCRT-indépendante*

La voie de biogénèse alternative à celle ESCRT-dépendante est appelée voie « *syndecan-syntenin-ALIX* ». Plusieurs acteurs régulent cette voie de biogénèse : des protéoglycanes à héparanes sulfates, l'*ADP-ribosylation factor 6* (ARF6), la phospholipase D2 (PLD2), l'héparanase et la *syntenin-1* (Baietti et al, 2012). La formation des ILV est facilitée par l'interaction *syntenin-ALIX*.

La tétraspanine CD63 s'accumule dans les ILV en l'absence de la machinerie ESCRT et des lipides, comme les céramides, permettent le bourgeonnement de la membrane plasmique.

Il semblerait que CD63 soit surtout impliqué dans la formation de petites ILV (<40nm) (Edgar, 2016) (figure 26).

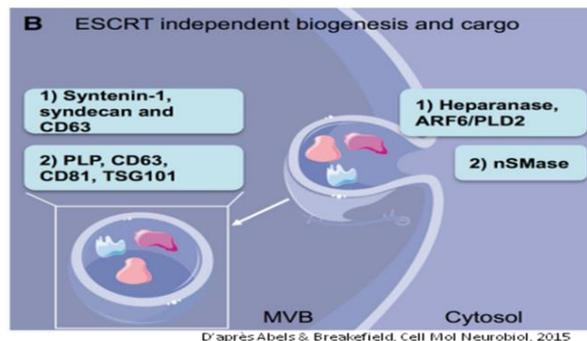


Figure 26 : Représentation schématique de la voie de biogénèse ESCRT-indépendante
La biogénèse ESCRT-indépendante est contrôlée par plusieurs protéines : l'héparanase associée à ARF6 et PLD2 et nSMase, par laquelle les exosomes sont enrichies en protéolipoprotéine PLP, CD63, CD81 et TSG101.

(D'après Abels and Breakefield, 2016)

b) Biogénèse des ectosomes

Les ectosomes sont libérés par bourgeonnement de la membrane plasmique de la cellule d'origine. Le mécanisme est moins connu que celui mis en place pour les exosomes. Plusieurs facteurs comme l'*ADP-ribosylation factor 6* (ARF6) et certains composés de l'ESCRT comme ALIX et TSG101 (mais aucun composé de l'ESCRT-0) sont nécessaires au bourgeonnement de la membrane plasmique. Il semblerait que la libération des ectosomes ne soit pas spontanée mais induite par un stimulus extracellulaire, entraînant alors une augmentation du calcium intracellulaire et un remodelage du cytosquelette provoquant un bourgeonnement de la membrane plasmique et une encapsulation des composés cellulaires et membranaires (Cocucci and Meldolesi, 2015).

2. Composition

Les EV agissent sur une cellule cible et en modifient le phénotype et le comportement grâce aux composés biologiques qu'elles contiennent (protéines, lipides, acides nucléiques notamment des miARN). En 2017, le site www.exocarta.org recensait 9 769 protéines, 3 408 ARNm, 2 833 miARN et 1 116 lipides potentiellement présents dans ou à la surface

des EV. La composition des EV va dépendre des composés de la cellule d'origine (figure 27).

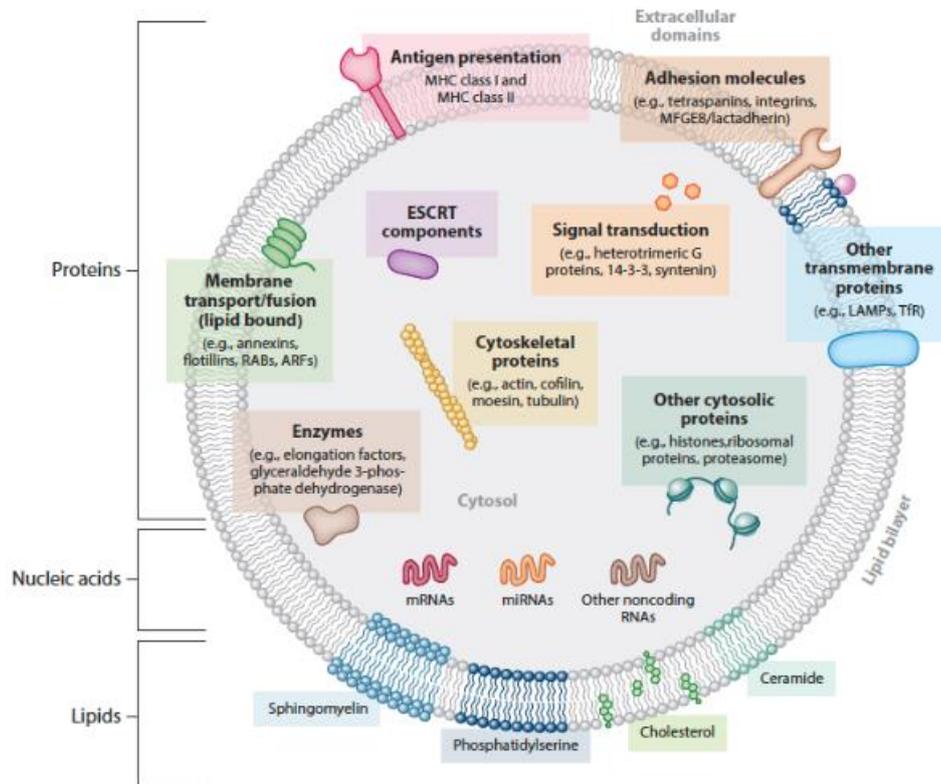


Figure 27 : Organisation générale des Vésicules Extracellulaires (EV) : représentation schématique des composants protéiques, lipidiques et des acides nucléiques

Abbreviations : ARF – ADP Ribosylation Factor, ESCRT – Endosomal Sorting Complex Required for Transport, LAMP – Lysosomal Associated Membrane Protein, MHC – Major Histocompatibility Complex, RAB – Ras-related protein in Brain, MFGE – Milk Fat Globule-epidermal Growth Factor (Factor VIII). (D'après Colombo et al., 2014)

a) Protéines

Les EV contiennent une grande quantité de protéines, dont de nombreuses protéines de surface. Ces protéines ont des fonctions spécifiques : biogénèse des EV, présentation de l'antigène, transport des EV ou encore ancrage avec les cellules cibles. Différents types de protéines sont retrouvés dans les EV, en fonction de leur origine (endosomale ou bourgeonnement de la membrane plasmique), mais également en fonction du phénotype de la cellule cible ou du message à véhiculer via les EV. Plusieurs familles de protéines sont retrouvées dans les EV en quantité variable : tétraspanines, intégrines, immunoglobulines, protéines de choc thermique (Hsp 60, Hsp70, Hsp 90), protéines du complexe ESCRT (TSG101 ou Alix), protéines du cytosquelette (actine, tubuline, cofiline, profiline) ou enzymes métaboliques (asparaginase comme Asrg11 ou encore des enzymes de métabolisation des xénobiotiques comme CYP2E1) (Iraci et al., 2017; Kumar et al.,

2017). La composition en protéines des EV est extrêmement variable. Par exemple, la protéine EGFR est présente dans plus de 80% des EV provenant de cellules cancéreuses du poumon (NSCLC) mais quasiment absente dans les EV de patients souffrant d'inflammation chronique des voies respiratoires (<2%) (Huang et al., 2013).

Les tétraspanines (CD9, CD63, CD81, CD82, CD53 CD37) sont des protéines composées de 4 domaines transmembranaires, retrouvées à la surface des exosomes.

Ces protéines comme les intégrines sont impliquées dans la liaison et l'internalisation des EV avec leurs cellules cibles.

b) Lipides

Les EV sont composées de lipides tels que des sphingomyelines, des phosphatidylsérines, des phosphatidylcholines, des phosphatidyléthanolamine, des gangliosides GM3, des phosphatidylinositols du cholestérol, des céramides ou encore des acides gras saturés. Les lipides contenus dans les EV ont différentes fonctions : i) ils contribuent à la stabilité et au maintien de la rigidité des EV (sphingomyéline et cholestérol par exemple), ii) ils sont impliqués dans la fusion intracellulaire des EV avec leur cellule cible ou encore iii) ils participent au processus de libération des EV par bourgeonnement (Laulagnier et al., 2004; Wubbolts et al., 2003; Yoon et al., 2014). Tout comme pour les protéines, la composition en lipides varie en fonction des EV, de leur cellule d'origine et du phénotype de cette dernière.

c) Acides nucléiques

De très nombreux facteurs peuvent influencer ou modifier la composition des EV : la composition et le phénotype des cellules cibles, une modification de l'environnement extracellulaire (hypoxie, inflammation), l'état physiologique de la cellule d'origine, son stade de sécrétion, mais aussi des paramètres « extérieurs » comme une exposition à des polluants.

L'une des avancées majeures de la recherche sur les EV fut la découverte de matériel génétique à l'intérieur de ces dernières (Valadi et al., 2007). Tout d'abord, les ARNm (avec un taux très bas voir quasi-indétectable de 18S et 28S) ainsi que les miARN furent mis en évidence. Puis il a été montré que les EV comportaient également de nombreux autres petits ARN non codants comme les longs ARN non-codants (lncRNA) ou les ARN

ribosomiques (rRNA) ou encore de l'ADN simple et double brin (Raposo and Stoorvogel, 2013a; Yoon et al., 2014).

Les miARN présents dans les EV vont être internalisés dans la cellule cible où ils réguleront plusieurs ARNm. Cette partie sera décrite plus en détail dans la partie F.6 de ce chapitre: miARN et EV.

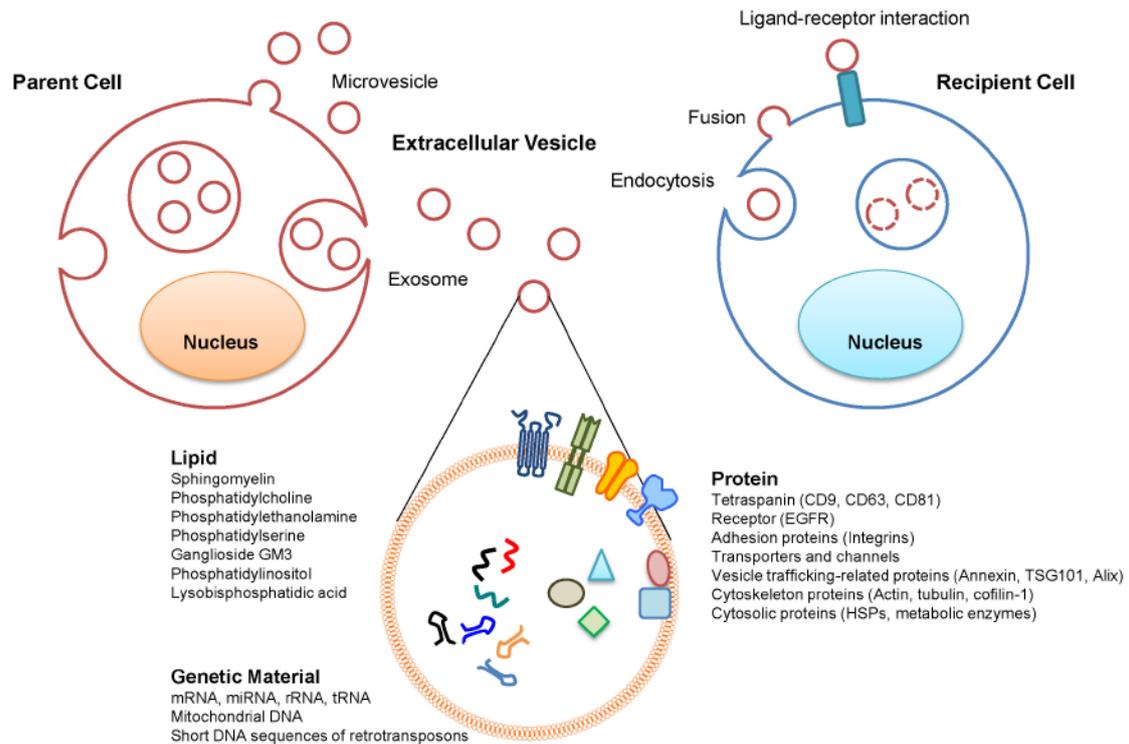


Figure 28 : Représentation schématique des différents composés des EV : lipides, acides nucléiques et protéines.
(D'après Yoon et al., 2014).

3. Interactions avec les cellules cibles

Les EV sont des médiateurs de la communication cellulaire. Après libération dans le milieu extracellulaire, elles agissent sur leur cellule cible et en modifient le phénotype et le comportement, grâce notamment à leur composition biologique.

La liaison et l'internalisation des EV à leur cellule cible peut se faire de plusieurs façons, dépendant notamment du type cellulaire de la cible, des ligands retrouvés à la surface des EV et de leur cible mais aussi de leur taille (figure 29). Il semblerait que les EV les plus larges induisent un processus de phagocytose alors que les plus petites EV seraient internalisées via d'autres mécanismes (endocytose, macropinocytose...). En fonction du type de cellules cibles, le processus d'ancrage et d'internalisation va différer. Les EV seront internalisées par phagocytose dans les macrophages (Barrès et al., 2010; Feng et al., 2010),

par endocytose médiée par des récepteurs spécifiques dans les cellules dendritiques (Morelli et al., 2004), par macropinocytose dans les cellules gliales (Fitzner et al., 2011), par phagocytose médiée par la dynamine et par endocytose médiée par la clathrine dans les cellules nerveuses (Frühbeis et al., 2013) ou encore par macropinocytose dans les cellules épithéliales alvéolaires (Mulcahy et al., 2014). L'internalisation des EV peut également se faire par simple fusion avec la membrane plasmique de la cellule cible (Raposo and Stoorvogel, 2013b).

Parfois, la liaison seule de l'EV à la cellule cible suffit à induire un changement physiologique, par exemple lors de la présentation de l'antigène par les EV lors de l'activation des cellules B (Segura et al., 2007).

Un complexe tétraspanines-intégrines semble nécessaire à l'efficacité de la liaison exosome-cible. L'environnement cellulaire joue également un rôle dans cette liaison. En effet, un environnement pro-inflammatoire entraîne une augmentation de l'expression des récepteurs impliqués dans l'adhésion EV-cellule cible (Kahlert and Kalluri, 2013). Un pH acide favorise par exemple la fusion entre les EV et les cellules tumorales (Logozzi et al., 2018).

Ce n'est pas tant le type d'EV qui va déterminer la liaison avec la cellule cible, mais plus l'état physiologique de cette dernière ainsi que les protéines et/ou lipides retrouvés à la surface des EV. Par exemple, des tétraspanines comme CD9 ou CD81, vont participer à la phagocytose des EV dans les cellules cibles (Takeda et al., 2003). Le cholestérol, une activité Na^+/H^+ ou encore les phosphatidylsérines faciliteraient la liaison et l'internalisation des EV par macropinocytose ou phagocytose alors que les protéines SNAREs et Rab seraient plus particulièrement impliquées dans la fusion directe des EV avec la membrane plasmique des cellules cibles (Doherty and McMahon, 2009; Mulcahy et al., 2014).

Une fois internalisées, elles transfèrent leur contenu biologique dans le cytoplasme où elles seront alors dégradées et leur contenu utilisé par la cellule cible.

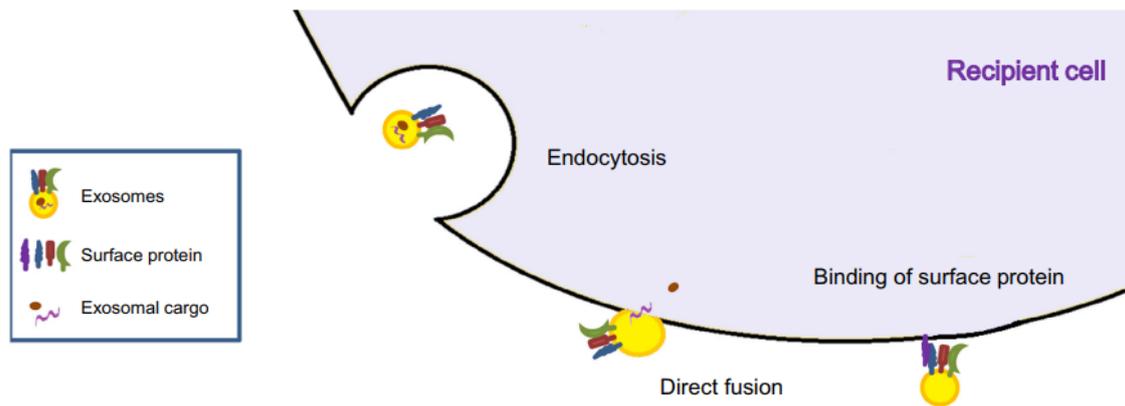


Figure 29 : Représentation schématique des différentes liaisons entre les exosomes et leur cellule cible
Exosomal cargo : contenu des exosomes ; Recipient cell : cellule cible ; Endocytosis : endocytose ; Binding of surface protein : liaison à la surface de la cellule cible par des récepteurs spécifiques ; Direct fusion : liaison directe et fusion de la membrane des exosomes avec la membrane de la cellule cible.
 (D'après Tang and Wong, 2015)

4. Biomarqueurs

La différence de composition entre les EV issues de cellules dites saines et celles issues de cellules pathologiques en fait de très bon candidats comme biomarqueurs de ces pathologies. En effet, les EV libérées par des cellules cancéreuses par exemple, portent les antigènes tumoraux spécifiques du cancer en question. Les EV sont depuis une dizaine d'années utilisées comme biomarqueurs de diagnostic et de pronostic dans les cancers mais également comme indicateurs de réponse au traitement (Corcoran et al., 2014). Les miARN présents dans les EV sont également utilisés comme piste thérapeutique en oncologie (Besse et al., 2016), notamment dans les cancers du sein (He et al., 2018), de la prostate (Bhagirath et al., 2018) ou du poumon (Kanaoka et al., 2018).

Les EV sont également utilisées comme biomarqueurs dans les pathologies respiratoires (non cancéreuses) (Levänen et al., 2013; Qazi et al., 2010), cardiovasculaires, chroniques. Les EV présentent donc un intérêt tant pour leur potentiel de biomarqueurs que comme vecteurs thérapeutiques, notamment dans les médecines personnalisées (Zhang et al., 2016).

5. Effets

Les effets des EV diffèrent grandement en fonction de leur cellule d'origine. Elles sont impliquées dans de nombreux processus physiologiques, de par leur rôle dans la communication cellulaire. Elles agissent comme messagers moléculaires de façon

autocrine ou paracrine. Les EV dont la cellule d'origine présente un état physiologique sain participent au bon fonctionnement cellulaire, alors que celles issues de tumeurs peuvent contribuer par exemple au maintien de l'environnement immunosuppresseur, nécessaire au développement des cellules cancéreuses. Les EV peuvent également contribuer au développement de maladies auto-immunes (Sáenz-Cuesta et al., 2014), infectieuses (Coakley et al., 2015) ou inflammatoires (Buzas et al., 2014).

En 1996, Raposo et al. ont mis en évidence que les EV libérées par les lymphocytes B portaient sur leur surface du CMH de classe II, et qu'elles avaient donc la capacité d'activer les lymphocytes T (Raposo et al., 1996).

Les EV présentes dans le fluide bronchoalvéolaire portent des molécules impliquées dans la tolérance ou peuvent au contraire induire la sécrétion de cytokines proinflammatoires, comme par exemple chez les patients asthmatiques ou atteints de sarcoïdose. (Qazi et al., 2010). Les exosomes issus de cellules immunitaires portent sur leur surface du CMH de classe II (complexe majeur d'histocompatibilité), ce qui leur confère la possibilité de présenter l'antigène et d'activer les lymphocytes T (comme le feraient des cellules présentatrices d'antigène) (Raposo et al., 1996). Les exosomes dérivés des cellules dendritiques sont spécialisés dans l'activation de lymphocytes T et participent alors à la réponse antitumorale (Zitvogel et al., 1998). Les ectosomes ont la capacité de moduler la réponse immunitaire. Ainsi une étude a mis en évidence que les ectosomes libérés par les polynucléaires neutrophiles jouaient un rôle dans la maturation des cellules dendritiques, limitant de cette façon la réponse inflammatoire (Turbica et al., 2015).

Les EV libérées par les cellules tumorales peuvent également être impliquées dans le développement local de la tumeur (Bobrie et al., 2012), à la dissémination métastatique (Luga et al., 2012a; Peinado et al., 2012a), au maintien d'un environnement immunosuppresseur en inhibant, par exemple, l'expression du CMH de classe II (Poutsika et al., 1985; Singh et al., 2014). Récemment, en 2015, il a été montré que les EV libérées par les cellules tumorales contiennent des protéines inhibitrices d'apoptose (IAP), confirmant à nouveau leur rôle dans la progression de la tumeur (Valenzuela et al., 2015). En 2008, une étude a mis en avant que les tumeurs gliales présentaient une mutation EGFRvIII et que la protéine mutée était internalisée dans les EV puis transférée dans les cellules cancéreuses mutées sur les récepteurs EGFRvIII (Al-Nedawi et al., 2008). En visant les cellules progénitrices de la moelle osseuse, les EV participent à la dissémination métastatique en permettant la migration vers les futures niches métastatiques (Peinado et al., 2012b). De plus, les EV augmentent la mobilité des cellules tumorales en interagissant avec les fibroblastes à proximité (Luga et al., 2012b), sont pro-angiogénique

(Al-Nedawi et al., 2009) et portent également des métalloprotéinases aidant à la migration des cellules tumorales dans les tissus (You et al., 2015).

Outre leur rôle dans le développement et la migration des cellules cancéreuses et des métastases, les EV contribuent au développement d'autres pathologies. Des études ont mis en évidence que les EV de patients atteints de maladies neurodégénératives contribuaient à la progression de ces pathologies (Fevrier et al., 2004; Rajendran et al., 2006; Saman et al., 2012).

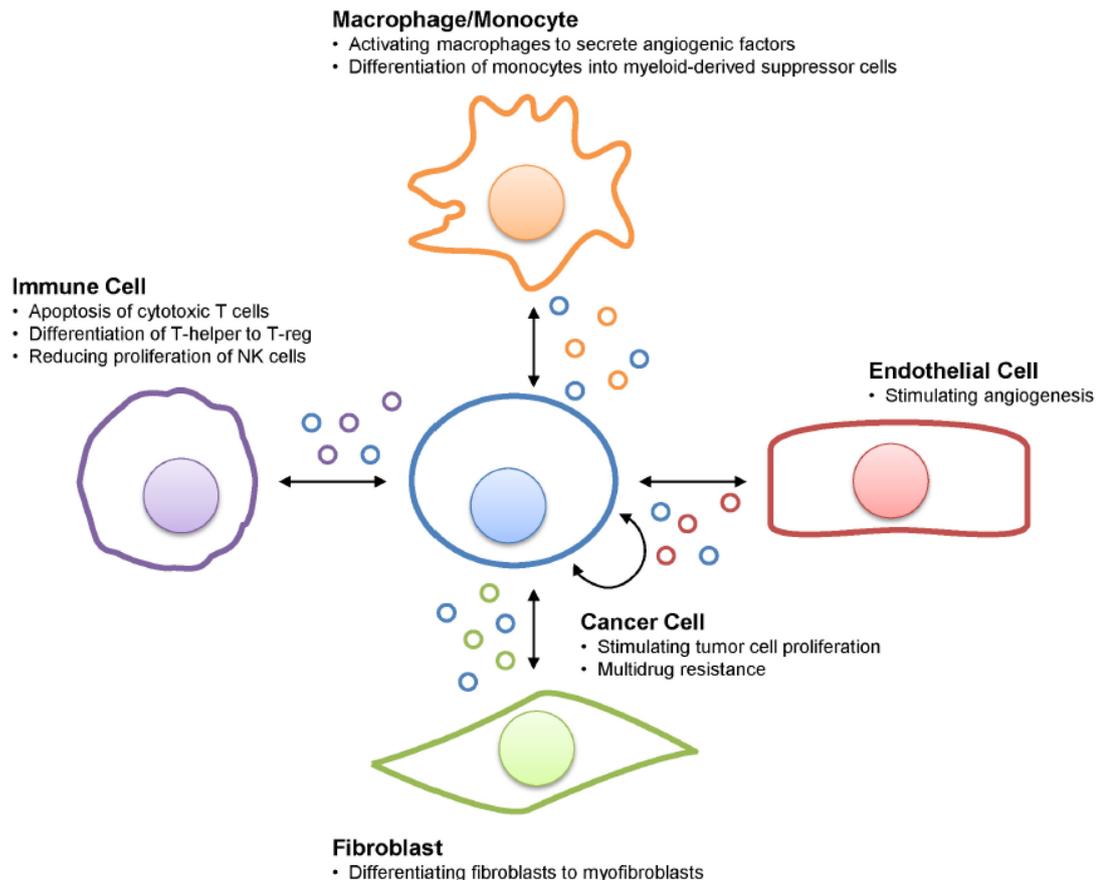


Figure 30 : Fonctions des EV dans un microenvironnement tumoral
Plusieurs types cellulaires se côtoient : cellules cancéreuses, cellules immunitaires, cellules endothéliales, fibroblastes ou encore macrophages. Ces cellules cancéreuses libèrent chacune des EV favorisant la progression tumorale par leurs différentes actions (promotion de l'angiogénèse, apoptose des cellules T, stimulation de l'angiogénèse ou encore de la prolifération des cellules cancéreuses).
(D'après Yoon et al., 2014)

6. EV et PM_{2.5}

La production d'EV est modulée par des stimuli pro-inflammatoires et oxydants. Il est maintenant bien connu qu'elles sont impliquées dans l'apparition de maladies comme le cancer du poumon et les maladies pulmonaires chroniques, consécutives à des expositions respiratoires (Figure 31) (Benedikter et al., 2018).

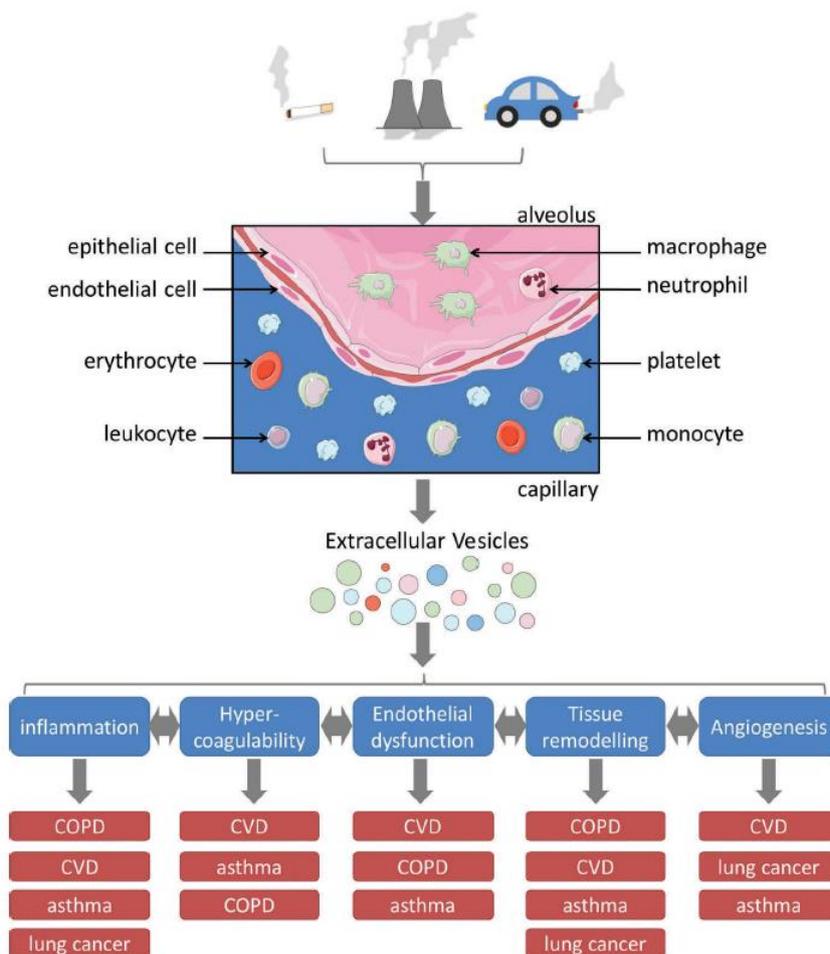


Figure 31 : Représentation schématique de la manière dont les EV induites par des expositions respiratoires peuvent contribuer à la pathogenèse des maladies chroniques

*Les toxiques respiratoires comme les PM_{2.5} proviennent de la fumée de cigarette, ainsi que de sources professionnelles ou environnementales. Après inhalation, les PM_{2.5} viennent en contact avec plusieurs types cellulaires dans les poumons incluant les cellules épithéliales, endothéliales, les macrophages alvéolaires, les monocytes et les cellules circulant dans le sang. L'exposition aux toxiques entraîne une augmentation et une altération de la composition des EV provenant des différentes sources cellulaires. Ces EV peuvent soit rester dans la lumière des poumons ou être disséminées dans la circulation sanguine. Aussi bien localement sur le site d'exposition, qu'au niveau systémique, elles provoquent l'inflammation, une hypercoagulation, une dysfonction endothéliale, un remodelage tissulaire et l'angiogenèse, tous étant interconnectés et chacun pouvant influencer l'autre. En provoquant ces processus biologiques, les EV peuvent contribuer au lien mécanistique entre les expositions respiratoires et les pathologies associées comme la BPCO(COPD), l'asthme, les maladies cardiovasculaires (CVD) ou le cancer du poumon.
(D'après Benedikter et al., 2018)*

Jusqu'à aujourd'hui, peu d'études existent sur les EV et les PM_{2.5} et la plupart des travaux portent sur le contenu en miARN des EV et l'impact qu'une exposition aux particules peut avoir sur leur niveau d'expression.

L'exposition des cellules pulmonaires aux PM_{2.5} induit une libération d'EV, représentant un nouveau moyen de communication cellulaire (Al-Nedawi et al., 2009). Les EV jouent un rôle très important à la fois en tant que messagers cellulaires mais peuvent aussi être impliquées dans les processus physiologiques et pathologiques. Au niveau du système respiratoire mais aussi du microenvironnement pulmonaire, les EV présentent un intérêt majeur dans la communication cellulaire et le maintien de l'homéostasie comme dans le développement de pathologies. Les EV libérées par les cellules cancéreuses pulmonaires peuvent agir comme des facteurs pro-tumorigéniques, pouvant contribuer à la progression du cancer (Frydrychowicz et al., 2014).

Dans le contexte d'une exposition aux PM_{2.5}, des miARN comme miR-19b, miR-223, miR-93 ou encore let-7a voient leur niveau augmenter après exposition de courte et de longue durée aux PM_{2.5} (Rodosthenous et al., 2016). L'expression des miARN des EV de A549 est modifiée après exposition. Des études sur des travailleurs exposés aux particules fines montrent une modification importante des niveaux de plusieurs miARN dont miR-128 et miR-302c dans les EV isolées à partir du sérum (Bollati et al., 2014).

Liu et collaborateurs en 2015 ont également montré qu'une exposition de macrophages aux PM_{2.5} entraînait une libération plus importante de glutaminase via les EV, et que cette augmentation de la glutaminase présentait une toxicité importante sur le système nerveux central (Liu et al., 2015).

Les PM_{2.5} induisent de façon dépendante de la dose et du temps une augmentation rapide de la libération d'EV par les cellules endothéliales et mononucléaires, confirmant le rôle des EV dans la modification du processus de coagulation en lien avec une exposition à la pollution de l'air (Emmrechts et al., 2012).

F. miARN

1. Définition

Parmi les molécules contenues dans les EV, les miARN présentent un intérêt particulier, du fait qu'ils peuvent à la fois être utilisés comme biomarqueurs mais aussi comme molécules fonctionnelles capables de moduler le phénotype de la cellule cible. Ces miARN ont pour fonction la régulation post-transcriptionnelle des gènes (He and Hannon, 2004).

Leur appariement à une séquence complémentaire de l'ARNm du gène cible entraîne la répression traductionnelle ou la dégradation de cet ARNm.

Le premier miARN mis en évidence fut Lin-28, un gène du nématode *C.elegans*, codant pour un ARN d'environ 21 nucléotides, et dont l'invalidation affectait de façon très importante le développement du ver (Lee et al., 1993).

D'abord pensé comme un phénomène propre à *C.elegans*, de nombreux miARN ont ensuite été caractérisés, tant dans les végétaux que chez les animaux et les êtres humains. On estime aujourd'hui qu'il en existe au moins 2 500 chez l'Homme.

A partir des années 2000, ces miARN sont reconnus comme une classe bien particulière de régulateurs biologiques, avec des fonctions propres, conservées en fonction des espèces et intervenant dans la plupart des processus physiologiques (Lagos-Quintana et al., 2001). En plus de leur capacité à réguler de façon négative (inhibition de l'expression d'un gène par blocage de la traduction ou destruction de l'ARNm cible) l'expression de leur ARN cible, quelques études ont mis en évidence la capacité de certains miARN à réguler de façon positive (activation transcriptionnelle et traductionnelle des gènes cibles) l'expression de certaine cible. Cependant ce processus est assez rare.

Enfin, il est important de noter qu'un seul miARN peut réguler l'expression de centaines de gènes impliqués dans différentes voies de signalisation, mais aussi qu'un seul ARNm peut être régulé par plusieurs miARN (Lewis et al., 2005).

2. Biogénèse

La biogénèse de ces petits ARN est un processus complexe qui se déroule en plusieurs étapes (figure 32). Deux enzymes de la famille des RNases III interviennent dans ce processus : Drosha et Dicer.

La majorité des gènes codant pour des miARN sont transcrits par l'ARN polymérase II qui produit un transcrit primaire, d'environ 100 nucléotides, ayant une structure en épingle à cheveux, appelé pri-miARN (Lee et al., 2004). Drosha convertit dans le noyau le pri-miARN en une structure en épingle à cheveux irrégulière, d'environ 70 nucléotides, appelé pré-miARN. Drosha ayant une faible activité enzymatique, elle coopère avec un facteur reconnaissant la structure de l'ARN double brin, DGCR8 (Seitz and Zamore, 2006). Le pré-miARN obtenu est transporté dans le cytoplasme par l'exportine 5, puis est pris en charge par Dicer qui façonne un intermédiaire de maturation dont un seul des deux brins formera le miARN mature. Celui-ci s'associe ensuite avec des protéines pour former le complexe RISC/miRNP. Ce complexe s'apparie avec des ARNm via le miARN.

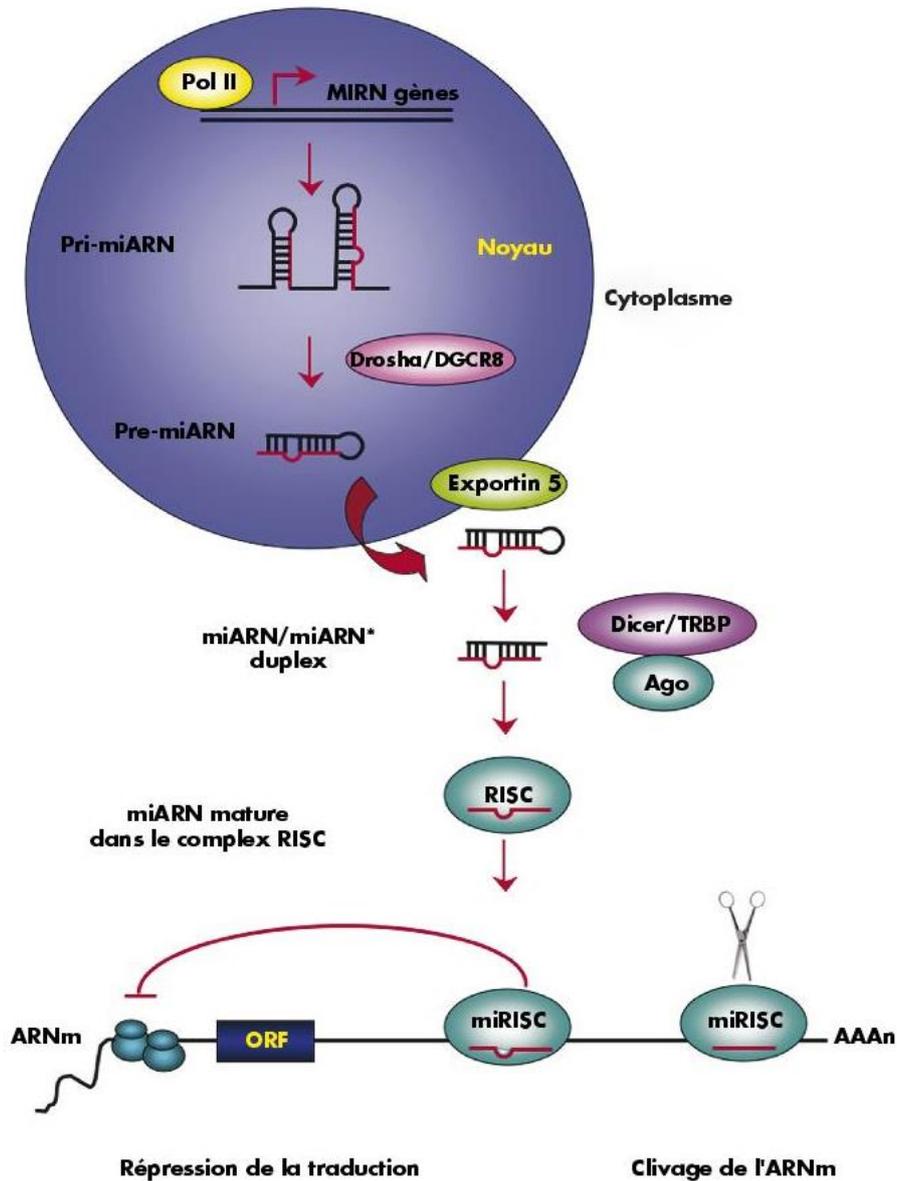


Figure 32 : Biogénèse des miARN : de la transcription des gènes des miARN sous forme de Pri-miARN aux miARN matures et fonctionnels
, RNA Pol III : ARN polymerase II, , TRBP : human immunodeficiency virus Transactivating Response RNA Binding, Ago 2 : protéine Argonaute 2, RISC : RNA Induced Silencing Complex, ORF : Open Reading Frame

3. Régulation post-transcriptionnelle

Les protéines Argonaute (Ago) sont les composés catalytiques du complexe RISC, participant au phénomène de « silencing » des gènes. Guidé par les protéines argonaute, le miARN mature va s'apparier à la région 3'UTR (Untranslated Regions) de l'ARNm cible. Cette partie 3'UTR est une région non traduite de l'ARNm, ce qui pourrait expliquer le fait qu'un même miARN puisse réguler plusieurs ARNm. La répression post-

transcriptionnelle est rendue possible par la présence des protéines Ago 1-4 (Pillai et al., 2004).

Plusieurs appariements sont possibles. Si la complémentarité entre la séquence du miARN et la séquence de l'ARNm est totale, l'ARNm sera déadénylé puis dégradé (Peters and Meister, 2007; Petersen et al., 2006). Dans le cas d'une complémentarité « non parfaite », la réponse observée sera une inhibition traductionnelle.

4. miARN et pathologies

De nombreuses études ont mis en évidence une relation entre l'expression aberrante des miARN et de nombreuses pathologies (inflammatoires, neurodégénératives ou cancéreuses). Les miARN étant des régulateurs de l'expression génique, une modification de leur niveau entraînera une modification dans l'expression de leurs gènes cibles.

Ce phénomène est retrouvé dans les maladies respiratoires, comme chez les patients asthmatiques où miR-200b et let-7c sont fortement diminués par rapport à des sujets sains (Levänen et al., 2013) ou encore chez les patients atteints de BPCO (Salimian et al., 2018).

Depuis plusieurs années, les recherches ont mis en évidence l'implication des miARN dans le développement des cancers. En fonction de leur rôle dans la maladie, les miARN peuvent être distingués en OncomiR ou en miARN suppresseur de tumeurs. La famille des let-7 est une famille de miARN fortement impliquée dans les cancers, entre autres du sein, des ovaires, de la prostate ou encore du poumon (Busch et al., 2016; Kim et al., 2014). Cette famille de miARN est une famille dite suppresseur de tumeur et est retrouvée fortement diminuée chez les patients atteints de cancers. Ces miARN ont pour cible des oncogène comme Ras, c-Myc ou encore BCL-XL (Yang, 2015). miR-21 à l'inverse est un oncomiR impliqué dans la promotion et la prolifération cellulaire et inhibant le mécanisme d'apoptose en ciblant la protéine PDC4 (programmed cell death 4). Ce miARN est retrouvé surexprimé dans des cancers comme celui du sein (Han et al., 2016), du poumon (Abd-El-Fattah et al., 2013) ou encore dans les lymphomes des cellules B (Li et al., 2015a).

Le fait que pour une maladie plusieurs familles de miARN soient modifiées ou encore qu'une même famille de miARN se trouve modifiée dans plusieurs cancers rend l'étude des miARN très complexe. Si l'on prend l'exemple du cancer du poumon, miRcancer Database recense plusieurs centaines de miARN dont l'expression est aberrante.

5. miARN et EV

Les miARN peuvent être circulants à l'état libre dans les fluides biologiques ou bien encapsulés dans des vésicules comme les EV. Le fait qu'ils soient ou non encapsulés ne modifie pas leurs fonctions. Les miARN retrouvés dans les EV sont directement internalisés dans les cellules lors de l'interaction EV – Cellule Cible (figure 33).

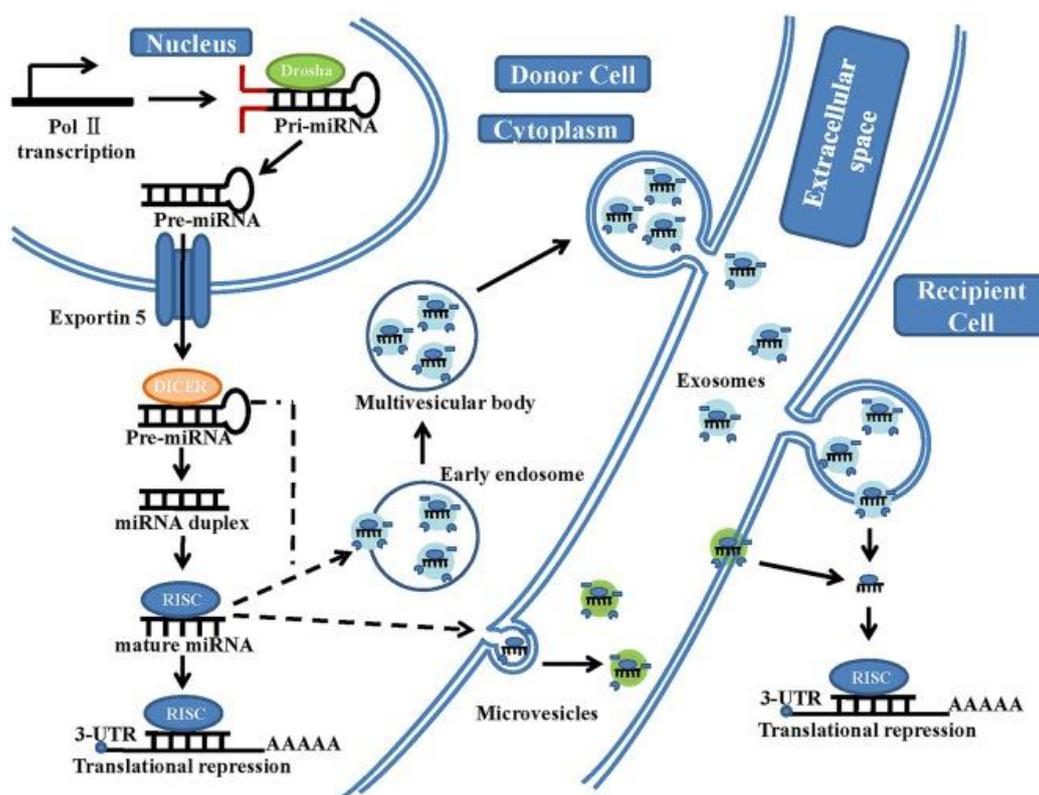


Figure 33 : Illustration schématique de la biogénèse des miARN, leur encapsulation dans les EV et leur internalisation dans les cellules cibles.
(D'après Chen et al., 2017)

Les miARN produits par la cellule d'origine sont internalisés dans les EV via les MVB puis transférés dans la cellule cible avec leur capacité fonctionnelle intacte. Ce transfert des miARN via les EV altère les activités biologiques de la cellule cibles et influence le microenvironnement cellulaire (Huang-Doran et al., 2017; Nana-Sinkam et al., 2017). Une étude récente a mise en évidence que les cellules endothéliales avaient la capacité de transférer miR-191, miR126 ou encore miR-125a dans les macrophages via les EV (Serban et al., 2016).

Un grand nombre de miARN est internalisé dans les EV, cependant tous les miARN présents dans la cellule d'origine n'y sont pas retrouvés. Cette spécificité dans l'internalisation permet de véhiculer un message particulier (Nolte-'t Hoen et al., 2012) et

peut être due à certains composants du complexe RISC comme la protéine AGO, contribuant au chargement des miARN dans les MVB (Gibbings et al., 2009). La ribonucléoprotéine hnRNPA2B1 est également impliquée dans cette sélection. hnRNPA2B1 est sumoylée dans les EV et reconnaît des motifs spécifiques des miARN. La sumoylation de hnRNPA2B1 permet ainsi la liaison avec ces derniers et leur internalisation dans les EV (Villarroya-Beltri et al., 2013). L'Annexin A2 (ANXA2) participe également au chargement des miARN dans les EV ; en effet, une étude de 2015 montre qu'après extinction de la protéine ANXA2, la quantité de miARN dans les EV est très faible (Hagiwara et al., 2014).

La modification des niveaux de miARN dans les EV est impliquée dans de nombreux processus biologiques et pathologiques, comme dans l'initiation cancéreuse, le processus métastatique et la résistance aux traitements. Le contenu et la quantité de miARN dans les EV sont associés au stade de la maladie et à la régulation du phénotype malin (Melo et al., 2014). Ces miARN encapsulés jouent un rôle prépondérant dans la tumorigénèse et dans l'apparition des métastases. Ainsi miR-122, en régulant le métabolisme du glucose participe à la métastase des cancers du sein par la formation de niches pré-métastatiques (Fong et al., 2015). Certains miARN, comme miR-96, participent à la prolifération, à la migration et à la résistance aux traitements dans les cancers du poumon (Wu et al., 2016). Les miARN des EV font partie des facteurs conduisant à la résistance aux traitements anti-cancéreux.

La composition des miARN des EV est différente en fonction des pathologies, ce qui fait de ces miARN encapsulés de bons candidats en tant que biomarqueurs.

6. miARN et PM_{2.5}

L'exposition aux polluants atmosphériques, parmi lesquels la fumée de cigarette ou encore les PM_{2.5}, peut conduire à des altérations du profil en miARN des cellules pulmonaires. De plus, ces modifications dues à l'exposition aux PM_{2.5} peuvent contribuer à l'apparition de maladies comme des inflammations pulmonaires, des pathologies comme les BPCO et l'asthme ou des cancers.

Une étude réalisée par Bollati et al en 2010 a permis d'évaluer les niveaux d'expression de 3 miARN, miR-21, miR-146a et miR-222 dans les leucocytes du sang périphérique d'ouvriers exposés aux particules. Cette exposition a conduit à l'augmentation des niveaux de miR-21 et miR-222 dans le sang des patients (Bollati et al., 2010).

Une étude récente de Yang et al en 2017 montre qu'une exposition aux $PM_{2.5}$ peut entraîner une transition épithelio-mésenchymateuse, via la voie de signalisation SMAD1, conduisant à un cancer des poumons, et cela notamment par la modification du niveau de miR-32 (Yang et al., 2017).

La famille des let-7 est également modifiée après exposition aux particules fines (Rodosthenous et al., 2016). Dans le poumon, ces miARN ciblent prioritairement HMGA2, protéine dont la réexpression dans les tissus adultes est fréquemment associée à des cancers (Meyer et al., 2007).

L'exposition aux $PM_{2.5}$ conduit à une inflammation importante et entraîne la modification de miARN comme miR-21, miR-17, miR-146a (Chen et al., 2018). miR-4516 voit son niveau d'expression fortement augmenté après exposition aux $PM_{2.5}$, ce qui entraîne alors une autophagie des cellules exposées (HBE (cellules épithéliales bronchiques) et A549 (cellules pulmonaires cancéreuses)) (Li et al., 2016a).

Les études montrent qu'après exposition aux $PM_{2.5}$, les miARN sont à la fois des régulateurs et des biomarqueurs d'exposition aux particules fines pouvant induire une inflammation pulmonaires ou des cancers (Bollati et al., 2010, 2014).

G. PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS

La pollution atmosphérique est un problème majeur de santé publique. L'Agence Européenne de l'Environnement (AEE) annonce 520 400 décès prématurés dans les 41 pays du continent Européen pour l'année 2014. La revue médicale, The Lancet, fait quant à elle part de presque 9 millions de décès à l'échelle mondiale pour l'année 2015 en ajoutant la pollution de l'eau et des sols (environ 2 millions), soit environ 3 fois plus que les morts combinées dues au SIDA, à la tuberculose et au paludisme. En France, la pollution aux particules fines ($PM_{2.5}$) est responsable d'environ 48 000 décès prématurés pour l'année 2016.

L'appareil respiratoire présente une surface d'échange entre l'air inspiré et l'organisme et est de ce fait directement impacté par la pollution de l'air. Les particules les plus fines ont la capacité de pénétrer en profondeur dans l'appareil respiratoire, se déposant au niveau des alvéoles pulmonaires. Les particules ainsi que leurs composés se retrouvent en contact direct avec les cellules immunitaires résidentes, mais également à proximité immédiate des capillaires sanguins et peuvent ensuite pénétrer la circulation sanguine. La composition chimique des particules atmosphériques est un des facteurs de toxicité, cependant plus complexe à aborder. En effet, la composition de ces particules est

extrêmement variable et va dépendre de beaucoup de paramètres, comme les sources d'émissions, les saisons, les conditions météorologiques... La durée de l'exposition entre également en jeu dans l'apparition des différentes pathologies induites en réponse à la pollution de l'air.

La présence de particules fines dans les voies respiratoires peut entraîner une forte réaction inflammatoire dans le poumon et stimuler la libération de différents types de médiateurs par les cellules immunitaires résidentes ou infiltrantes. Ces cellules, et en particulier les monocytes / macrophages, peuvent produire et sécréter plusieurs facteurs, parmi lesquels des molécules solubles circulantes et des Vésicules Extracellulaires (EV) qui peuvent potentiellement modifier le phénotype des cellules environnantes, comme les cellules épithéliales pulmonaires. Elles sont générées par tout type de cellules et sécrétées dans l'espace extracellulaire où elles échangent avec leurs cellules cibles des protéines, des lipides et des acides nucléiques. Dans ce sens, les EVs représentent des messagers biologiques auprès de cellules environnantes.

Dans ce contexte, cette thèse vise à répondre aux questions suivantes :

- Quels sont les constituants chimiques et les sources de particules $PM_{2.5}$ dans un environnement à forte densité de population ? Quelle est la variation saisonnière de la composition des $PM_{2.5}$ observée au cours d'une année ?
- L'exposition aux $PM_{2.5}$ a-t-elle un impact sur la réponse immunitaire et en particulier modifie-t-elle la polarisation des macrophages ?
- Les cellules exposées libèrent-elles des marqueurs particuliers, comme les EV, pouvant servir de messagers d'effets à l'exposition aux $PM_{2.5}$.
- Quelle est la nature du message transmis par les EV, libérées suite à l'exposition aux $PM_{2.5}$, aux cellules épithéliales pulmonaires ?

Afin de répondre à ces questions, nous avons mis en place une stratégie scientifique présentée en figure 34.

Dans un premier temps, les $PM_{2.5}$ ont été échantillonnées sur une durée de 12 mois, par impaction en cascade. Une partie de ces particules a été soumise à une caractérisation physico-chimique permettant de déterminer la composition de nos échantillons, mais aussi d'identifier les sources et d'étudier la variabilité saisonnière sur la composition des $PM_{2.5}$. Dans un deuxième temps, des macrophages primaires ont été exposés aux $PM_{2.5}$. Les effets de cette exposition ont été mesurés : mesure de l'expression de gènes et de protéines impliqués dans l'inflammation, le stress oxydant et la polarisation. En parallèle, les EV

libérées ont été caractérisées afin de mettre en évidence une différence potentielle entre les EV libérées par Les cellules exposées ou non.

La troisième partie du travail a été de mesurer les effets des EV libérées en réponse à l'exposition aux PM_{2.5} sur des cellules épithéliales pulmonaires humaines afin d'étudier les messages potentiels délivrés par les EV, libérées en réponse à l'exposition aux PM_{2.5}, à leurs cellules cibles.

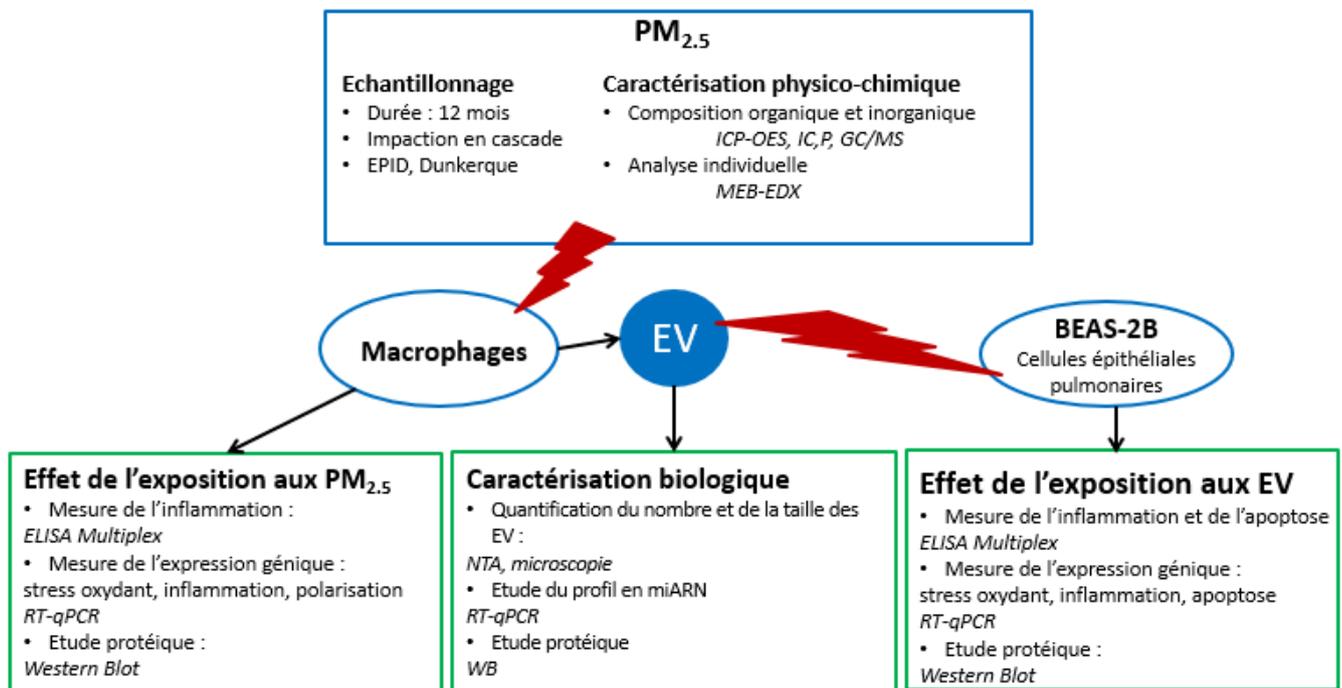


Figure 34 : Problématique et objectifs de la thèse

Après échantillonnage des particules, ces dernières ont été soumises à une caractérisation physico-chimique afin de déterminer la composition de nos échantillons, d'identifier les sources et d'étudier la variabilité saisonnière. Une partie des PM_{2.5} a été utilisée pour les études biologiques. Dans un premier temps, des macrophages primaires ont été isolés puis exposés aux particules, les effets de cette exposition (mesure de l'inflammation, réponse au stress oxydant, polarisation des macrophages) ont été mesurés. En parallèle, les EV libérées en réponse ont été caractérisées pour observer une potentielle différence sur le profil des EV libérées. Dans un dernier temps, des cellules épithéliales ont été exposées aux EV et les effets de cette exposition ont été mesurés. Le symbole ⚡ représente l'exposition.

CHAPITRE 2 :

Matériels et Méthodes

II. MATERIELS ET METHODES

A. ECHANTILLONNAGE DES PM_{2,5}

La campagne de prélèvement des PM_{2,5} s'est déroulée dans l'agglomération de Dunkerque, ville sous influence industrielle, située dans le nord de la France (figure 35).

Ce site d'étude présente la particularité d'être à proximité de nombreuses sources d'émission :

- Industries diverses : métallurgie, sidérurgie, raffinerie, cimenterie, synthèse organique...
- Trafic routier important : proximité directe de 2 autoroutes, A16 et A25, 75km de Lille et une vingtaine de kilomètres de la frontière Belge
- Activités urbaines et domestiques : 5^{ème} ville la plus peuplée du Nord, l'agglomération de Dunkerque compte environ 210 000 habitants (au 1^{er} janvier 2016)
- Activité portuaire : le Port de Dunkerque est le 3^{ème} port français. Il se distingue notamment pour l'importation des minerais et de charbon, de fruits en conteneurs et pour le fret ferroviaire.
- Trafic maritime : Le Détroit du Pas-de-Calais reliant la Manche et la Mer du Nord est un des plus fréquentés au monde avec 700-800 navires par jour empruntant cet espace (Données Préfecture Manche Mer du Nord).

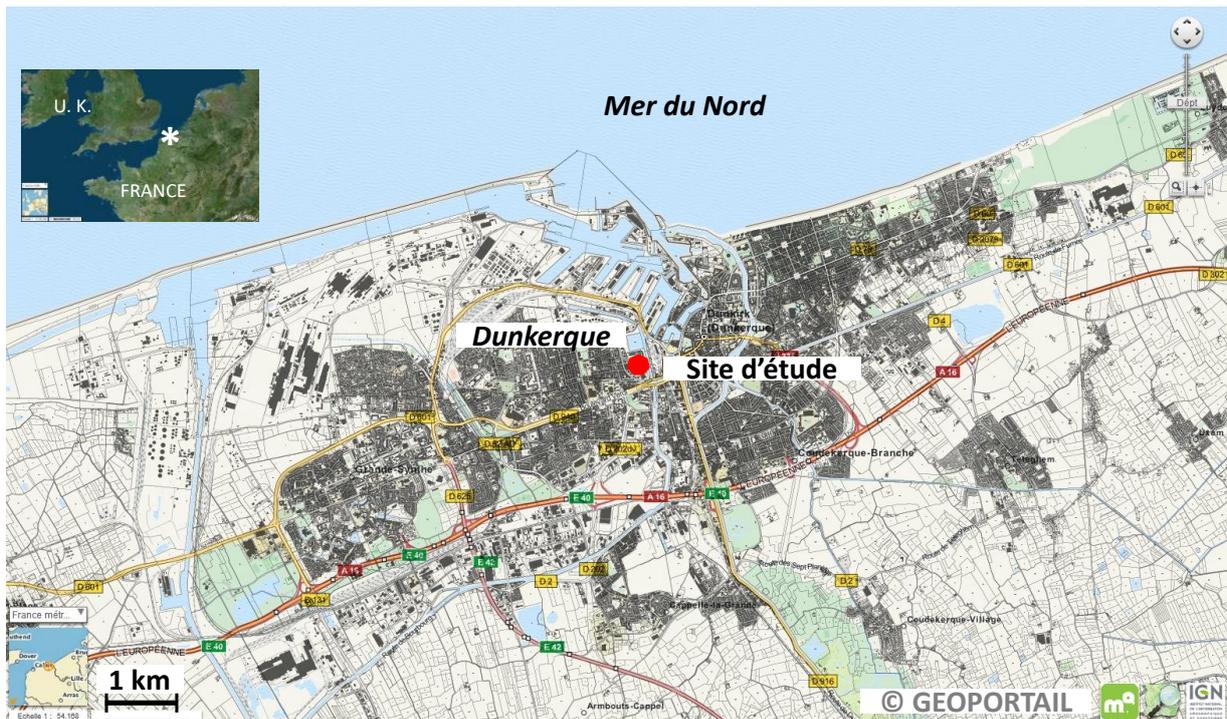


Figure 35 : Localisation du site d'étude dans l'agglomération de Dunkerque
(modifié de www.geoportail.fr)

Les $PM_{2,5}$ ont été échantillonnées à l'aide d'un impacteur à cascades (Staplex® 235, TFIA, $68 \text{ m}^3/\text{h}$) (figure 36A). L'impacteur est relié à une pompe d'aspiration à haut débit, asservie aux conditions météorologiques (la pompe s'arrête en cas de pluie).

Cette technique de prélèvement permet la séparation des particules en fonction de leur diamètre aérodynamique. L'impacteur est constitué de plusieurs plaques d'impaction (figure 36B), munies de fentes dont la largeur diminue en fonction des étages. Le diamètre des fentes impose une vitesse du flux d'air, alors que le débit d'air reste constant au global. Cette technique est basée sur un principe physique, l'inertie des particules dans un flux d'air (figure 36C) : les particules ayant une inertie supérieure à une certaine valeur limite ne restent pas dans le flux d'air aspiré par l'impacteur. D'un étage à l'autre, la vitesse du flux d'air croît entraînant l'impaction sur les plaques de particules de plus en plus petites. Les particules de taille comprise entre $0,3$ et $2,5 \mu\text{m}$ ($PM_{0,3-2,5}$) ont été recueillies directement sur les plaques d'impaction, tandis que les particules les plus fines $PM_{0,3}$ ont été retenues sur un filtre d'arrêt en fibre de quartz.

En parallèle, les données comme la direction et la force du vent, la température, la pluviométrie... ont été enregistrées.

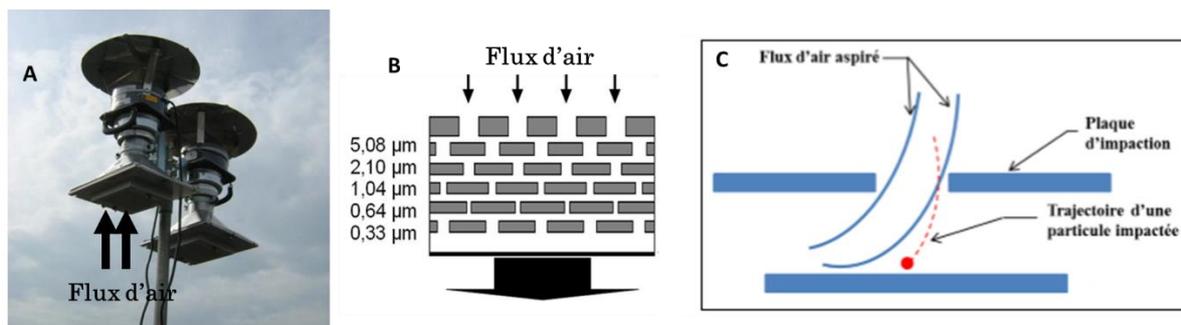


Figure 36 : Impaction en cascade

A : photo d'un impacteur en cascade Staplex® 235, TFIA ; B : schéma des différentes plaques d'impaction ; C : Principe de l'impaction en cascade

L'échantillonnage des particules a été réalisé sur une période d'un an, du 19 mars 2014 au 18 mars 2015. Cette durée de prélèvement conséquente assure l'obtention d'un échantillon représentatif de l'exposition moyenne d'un individu au cours de l'année, intégrant à la fois des épisodes de pollution ou de plus faibles concentrations ainsi que la contribution moyenne des différentes sources de particules.

Deux impacteurs de type Sierra 235 (Sierra Anderson, Smyrna) ont été utilisés en parallèle. Avant chaque prélèvement, les plaques d'impaction sont nettoyées au détergent de laboratoire, rincées plusieurs fois à l'eau déminéralisée puis à l'eau ultrapure, et enfin séchées avant d'être scellées dans un sachet hermétique jusqu'à leur utilisation sur le site de prélèvement. Le remplacement des plaques d'impaction a été réalisé toutes les deux semaines.

Une fois les plaques d'impaction récupérées, les particules sont séchées à température ambiante sous une hotte à flux laminaire puis recueillies à l'aide d'un pinceau. Les particules sont ensuite conservées dans des tubes à -20°C jusqu'à utilisation.

Durant notre période d'échantillonnage, 4,3g de PM_{2.5} ont été prélevés au total. Afin d'étudier la composition annuelle, mais aussi la variabilité saisonnière, 5 échantillons moyens de particules ont été constitués en rassemblant les échantillons prélevés sur des périodes de 2 semaines :

- 1 échantillon annuel : 19 mars 2014 au 18 mars 2015
- 1 échantillon pour la période du printemps : 19 mars au 21 juin 2014
- 1 échantillon pour la période d'été : 21 juin au 26 septembre 2014
- 1 échantillon pour la période d'automne : 27 septembre au 17 décembre 2014
- 1 échantillon pour la période d'hiver : 18 décembre 2014 au 18 mars 2015

B. CARACTERISATION PHYSICO-CHIMIQUE DES PM_{2.5}

La caractérisation physico-chimique des particules a été réalisée par le Centre Commun de Mesures (CCM) de l'ULCO et par notre équipe Chimie et Toxicologie des Emissions Atmosphériques (CTEA) de l'UCEIV.

Les particules fines ont été soumises à différentes analyses physiques afin d'obtenir des informations quant à la granulométrie ou à la surface spécifique mais aussi chimiques, afin d'obtenir la composition des échantillons en éléments majeurs et traces, ions hydrosolubles ou encore hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), paraffines et dioxines/furanes.

1. Caractéristiques physiques des PM_{2.5}

a) *Granulométrie*

De manière à vérifier le bon déroulement de l'échantillonnage, en particulier au niveau du prélèvement sélectif de PM_{0,3-2,5}, la distribution en taille des particules a été mesurée par granulométrie laser sur l'échantillon moyen annuel (figure 37). Les données montrent que 98,0% des particules présentent un diamètre < 1 µm et 99,8% d'entre elles ont un diamètre < 2,5 µm, ce qui est conforme aux attentes de la méthodologie d'échantillonnage mise en œuvre.

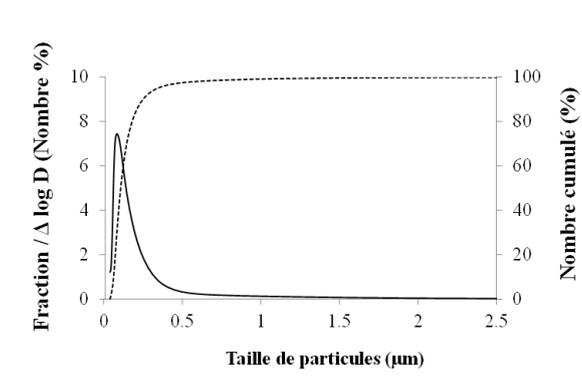


Figure 37 : Distribution en taille de l'échantillon moyen annuel de PM_{0,3-2,5} collecté à Dunkerque entre mars 2014 et mars 2015

b) *Surface spécifique*

L'aire spécifique, qui est un indicateur de la capacité d'adsorption des particules, a été mesurée sur l'échantillon annuel par la méthode BET (procédés utilisant l'adsorption

physique de gaz à basse température, mis au point par Brunauer, Emmet et Teller), basée sur la physisorption de l'azote à basse température (77K).

A la suite d'un prétraitement visant à sécher les particules, la valeur d'aire spécifique des $PM_{0,3-2,5}$ atteint $2 \text{ m}^2/\text{g}$. Cette valeur peut apparaître faible, néanmoins il a été montré dans un travail antérieur mené au laboratoire que les composés organiques fortement liés sur la surface des particules fines occupaient des sites d'adsorption. De ce fait, il est nécessaire de procéder à un traitement de désorption à haute température pour libérer ces sites, et suite à cela, nous avons pu montrer que les $PM_{2,5}$ pouvaient atteindre une aire de $50 \text{ m}^2/\text{g}$. La présence de noir de carbone en forte proportion dans les PM est également un paramètre qui tend à accroître leur valeur d'aire spécifique (Billet et al., 2007).

2. Caractéristiques chimiques des $PM_{2,5}$

a) Teneurs en éléments majeurs et traces métalliques

Une minéralisation acide de l'échantillon a été réalisée sur une prise d'essai de 30 mg de particules afin de déterminer la teneur totale en éléments métalliques. La solution obtenue a été analysée par spectrométrie d'émission atomique ICP-OES (modèle icap 6300 DUO, ThermoFisher Scientific). Le principe de l'ICP-OES utilise la capacité des éléments à émettre un rayonnement lorsqu'ils sont excités. L'échantillon liquide est nébulisé puis dirigé dans une torche plasma sous la forme de très fines gouttelettes. Ce plasma est à une température d'environ 8000°C , ce qui permet d'atomiser et d'exciter les espèces présentes en solution. Lorsqu'elles sont dans un état excité, celles-ci émettent un rayonnement afin de retourner dans un état stable. Les longueurs d'onde émises sont caractéristiques des espèces présentes et la quantité de rayonnement est proportionnelle à la concentration. Les éléments que nous avons analysés avec l'ICP-OES sont : Al, As, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni, P, Pb, Sn, Sr, Ti, V et Zn.

b) Teneur en ions hydrosolubles

Une extraction des ions hydrosolubles de l'échantillon a été réalisée sur une prise d'essai de 30 mg de particules pour 15 mL d'eau ultrapure. L'extrait obtenu a été filtré et analysé par chromatographie ionique (modèle ICS 5000, ThermoElectron). Cette technique est basée sur les différences d'affinité des espèces recherchées pour la phase stationnaire

contenue dans la colonne chromatographique qui permet de les séparer. Ces analyses ont permis les teneurs en ions Cl^- , NO_3^- , SO_4^{2-} , Na^+ , NH_4^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+}

c) Analyse des dioxines, furanes et polychlorobiphényles

Les analyses de dioxines (PCDD), furanes (PCDF) et polychlorobiphényles (PCB) ont été réalisées par les laboratoires Micropolluants Technologies SA, en utilisant un chromatographe Agilent Technologies 7890A, équipé d'une colonne capillaire DB5MS et couplé à un spectromètre de masse à haute résolution Agilent Technologies P800.

Les concentrations en PCB, dioxines et furanes dans les divers compartiments de l'environnement sont en général exprimées en équivalent toxique (I-TEQ : International Toxic Equivalent) défini par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS). Pour un mélange donné, le calcul en équivalent toxique (TEQ) consiste à multiplier la concentration de chaque molécule par son facteur d'équivalent toxique (TEF) puis à sommer l'ensemble des contributions.

d) Mesure de la teneur en hydrocarbures aromatiques polycycliques et en alcanes linéaires (n-alcanes)

Après extraction Soxhlet des PF au dichlorométhane, puis concentration de l'extrait sous flux d'azote et analyse par GC-MS (model 1200 TQ, Varian, USA), nous avons recherché les teneurs en HAP et n-alcanes dans l'échantillon moyen annuel et les échantillons saisonniers. Les concentrations pour les 16 HAP prioritaires listés par l'United States Environmental Protection Agency (USEPA) ont été mesurées : naphthalène, acénaphthylène, acénaphtène, fluorène, phénanthrène, anthracène, fluoranthène, pyrène, benz[a]anthracène, chrysène, benzo[b]fluoranthène, benzo[k]fluoranthène, benzo[a]pyrène, indéno[1,2,3,c,d]pyrène, dibenz[a,h]anthracène, benzo[g,h,i]pérylène. Concernant les n-alcanes, l'analyse a porté sur la quantification des alcanes allant de C_{11} à C_{39} .

e) Analyse par diffraction des rayons X (DRX)

Le diffractogramme de rayons X a été enregistré sur un diffractomètre BRUKER D8 Advance utilisant la radiation $\text{Cu K}\alpha$ ($\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$), en considérant l'échantillon de $\text{PM}_{2.5}$ à l'état de poudre à la température ambiante. L'enregistrement a été effectué sur une gamme de 2θ allant de 10° à 70° par pas de $0,02^\circ$ et un temps d'acquisition de 10s par pas.

L'identification des phases observées a été réalisée à partir de la base de données JCPDS (Joint Committee in Powder Diffraction Standards).

f) Analyse par microscopie électronique à balayage couplée à la microanalyse X (MEB-EDX)

L'échantillon PM_{0,3-2,5} a été examiné en microscopie électronique à balayage, nous permettant d'obtenir la taille des différents types de particules, leur morphologie, leur degré d'agglomération, de même que leur composition individuelle. Pour cela, environ 1mg de particules a été mis en suspension dans de l'hexane, un solvant inerte, suivi d'un traitement aux ultrasons pendant 5 minutes. Puis la solution est déposée sur une membrane de polycarbonate (Nucléopore). La membrane est ensuite fixée puis l'échantillon est métallisé pour le rendre conducteur et placé dans la chambre du microscope (LEO 438 VP) qui est muni d'un détecteur X Gresham.

C. CULTURE CELLULAIRE

1. Isolement et culture cellulaire des monocytes / macrophages

Les monocytes primaires ont été récupérés à partir de poches de sang de 6 donneurs anonymes, dans le cadre d'une convention avec l'Etablissement Français du Sang (EFS), Lille. Chaque poche possédait un volume de sang compris entre 480 et 500 mL.

Le sang a été dilué (1 :1) avec du tampon phosphate salin (PBS) supplémenté de 2% de sérum fœtal bovin (FBS (Gibco® FBS, ThermoFisher Scientific)), réparti dans des tubes lymphoprep™ (Alere Technologies AS) puis centrifugé à 800g pendant 30 minutes. Le principe de ces tubes est de permettre une séparation simple des différents éléments figurés du sang. Pour cela, le sang est mélangé avec un composé qui agrège les érythrocytes et permet ainsi leur sédimentation au fond du tube. Les cellules mononuclées sanguines périphériques (PBMC) peuvent ainsi être récupérées plus facilement dans la partie supérieure du tube. Ces cellules sont ensuite diluées dans du PBS (1 :1) et enfin centrifugées à 200g pendant 10 minutes. Les culots ont ensuite été repris dans du milieu de culture (Gibco® RPMI 1640, ThermoFisher Scientific) supplémenté de 10% de FBS, 2,5% d'Hépès et 1% d'antibiotique (pénicilline et streptomycine).

A ce stade, les cellules ont été comptées puis mises dans des flasques Corning® T75 pendant 2 heures afin de laisser adhérer les monocytes, à raison de 200 000 à 270 000

monocytes/cm² dans des flasques de culture de 75cm² (T75), des boîtes de culture de 10 cm de diamètre ou des plaques 6 puits.

Après adhérence, les monocytes ont été lavés, puis incubées 36 heures dans du RPMI supplémenté de 10% de FBS déplété en EV (Exosome-depleted FBS, Biowest), 2,5% d'Hépès et 1% d'antibiotique, contenant 50ng/mL de Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF). Le GM-CSF est plutôt produit dans les contextes pro-inflammatoires comme une exposition aux PM, permettant leur maintien en culture, mais durant un temps trop court pour entraîner une polarisation, afin de mimer les macrophages infiltrants (Lacey et al., 2012). De plus, ce facteur de croissance permet la polarisation à la fois vers un phénotype M1 ou M2, en fonction du microenvironnement (Verreck et al., 2006).

2. Exposition des macrophages aux PM_{2.5}

Après 36h de culture, les surnageants ont été enlevés et remplacés par du milieu RPMI supplémenté de 10% de FBS déplété en EV, 2,5% d'Hépès et 1% d'antibiotique, dans lequel nous avons au préalable ajouté les PM_{2.5}.

La concentration en PM_{2.5} choisie après optimisation du protocole (annexe II) a été celle de 12,5 µg/mL. Les particules après récupération sur les plaques d'impaction se trouvent sous forme solide. Nous les avons introduites dans le milieu de culture, puis homogénéisées par ultrasons avant de les appliquer aux cellules.

Par poche de sang, nous avons obtenu 1 T75 dite témoin, non exposée aux PM_{2.5} et 1 T75 dont les monocytes ont été exposés à 12,5µg de PM_{2.5} par mL de surnageant.

L'exposition a été réalisée pendant 48h, puis les surnageants ainsi que les cellules ont été récupérés. 2mL de surnageant par T75 ont été gardés pour d'autres analyses. Le reste des surnageants a été groupé par condition pour l'isolement des EV.

3. Cytométrie en flux

L'analyse phénotypique des cellules macrophagiques a été réalisée par cytométrie en flux. Les cellules ont été incubées 30 minutes dans du PBS contenant 10% de sérum autologue avec 5 µL des anticorps indiqués dans le tableau 5. Les contrôles isotypiques ont été réalisés en parallèle. Les cellules ont ensuite été analysées à l'aide du cytomètre Attune (Thermo Fisher Scientific) en utilisant le logiciel Kaluza (Beckman Coulter). Les résultats

sont exprimés en Moyenne d'Intensité de Fluorescence (MIF) calculée de la manière suivante : MIF (anticorps d'intérêt) – MIF (anticorps contrôle).

Tableau 5 : Noms et références des anticorps utilisés en cytométrie en flux.

Cible	Fluorochrome	Référence	Fournisseur
CD14	Brilliant Violet 421	BLE301830	Ozyme
Mouse IgG2a, kappa Isotype control	Brilliant Violet 421	BLE400260	Ozyme
CD16	PE/Cy5	BLE302009	Ozyme
Mouse IgG1, kappa Isotype control	PE	BLE400112	Ozyme
CD206 (MMR)	Alexa Fluor 488	BLE321114	Ozyme
Mouse IgG1 Isotype control	Alexa Fluor 488	MG120	Thermo Fisher
CD86	PerCP/Cy5.5	BLE305420	Ozyme
Mouse IgG1 Isotype control	PerCP	IC002C	R&D

4. Culture des BEAS-2B et exposition aux EV

Les BEAS-2B ont étéensemencées dans des plaques 6 puits Cell-Bind® (Corning®) à raison de 190 000 cellules / puits dans du milieu LHC9 (ThermoFisher Scientific) à 37°C sous 5% de CO₂ et maintenues en culture pendant 24h. Les BEAS-2B ont alors été exposées pendant 48h à 50µl d'EV de macrophages primaires exposés ou non aux PM_{2.5}, préalablement diluées au 8^{ème} dans du PBS. Le nombre de cellules exposées ainsi que le nombre d'EV utilisées pour cette exposition sont récapitulés dans le tableau 6.

2 types de contrôles ont été réalisés :

- BEAS-2B non exposées aux EV + 50µl de PBS
- BEAS-2B non exposées aux EV + 50µl de particules à une concentration de 12,5 µg/mL de PM_{2.5}.

Chaque condition d'exposition a été réalisée en triplicats de culture.

Tableau 6 : Nombre de cellules exposées et nombre d'EV utilisées pour l'exposition des BEAS-2B aux EV de macrophages primaires

	Beas-2B + EV de macrophages non exposées	Beas-2B + EV de macrophages exposés aux PM _{2.5}
Nombre d'EV dans 50 µl	7,17 x 10 ¹⁰ EV	17,83 x 10 ¹⁰ EV
Nombre de cellules exposées	350 000 cellules	350 000 cellules

5. Test de cytotoxicité

La cytotoxicité de l'échantillon a été évaluée en mesurant l'activité de l'enzyme lactate déshydrogénase dans le surnageant de culture. Celle-ci reflète la perte de l'intégrité membranaire. Cette analyse repose sur le fait que les cellules mortes ou ayant subi des dommages laisseront s'échapper des enzymes normalement présentes dans le cytoplasme. La mesure de la LDH transcrit la proportion de cellules ayant subi une lyse.

L'analyse a été réalisée sur les THP1, les macrophages primaires et les BEAS-2B après le temps d'exposition imparti. Des cellules exposées aux Triton-X100 2% (v/v) ont servi de témoin positif avec 100% de mortalité.

Le dosage a été réalisé au moyen du kit Cytotoxicity Detection LDH (Roche Diagnostis). 100µl du surnageant ont été transférés dans une plaque 96 puits puis 100 µl de réactif ont été ajoutés. Après 30 minutes d'incubation à 37°C, l'absorbance des échantillons a été ensuite déterminée à 490nm et 600nm grâce au lecteur Multiskan™ GO Microplate spectrophotometer (ThermoFisher Scientific).

D. VESICULES EXTRACELLULAIRES

1. Isolement des EV

Les EV ont été isolées à partir des surnageants de culture des macrophages. Les surnageants ont été soumis à des centrifugations différentielles, 300g pendant 10 minutes, 2 500g pendant 10 minutes et 16 500g pendant 30 minutes, filtrés à 220nm puis ultracentrifugés 2 fois à 110 000g pendant 70 minutes. Le culot de vésicules a ensuite été repris dans 180µl de PBS et stocké à -80°C.

2. Quantification des EV

Les EV ont été quantifiées par suivi individuel de particules, appelé Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) au moyen d'un analyseur Nanosight® NS300 (Malvern). Les mesures sont répétées 5 fois en considérant une durée d'analyse de 180 secondes lors de chaque mesure. Cette analyse apporte des informations quant à la taille des EV mais permet également de quantifier le nombre d'EV dans nos échantillons.

Cette technique est basée sur la diffusion de la lumière émise par un rayonnement laser lorsqu'il traverse une suspension de particules et sur le principe du mouvement Brownien.

Les particules diffusent la lumière qui est captée à l'aide d'une caméra. Les informations sont traitées informatiquement afin de nous donner le diamètre et la quantité des particules.

3. Dosage des EV par la méthode Bradford

Les protéines des EV ont été dosées en utilisant la méthode de dosage colorimétrique Bradford, permettant le dosage de protéines par l'utilisation du bleu de Coomassie.

50µl d'échantillon dilué au 1/50 sont ajoutés à 250µl de réactif de Bradford. Le mélange est ensuite incubé 2 minutes à l'obscurité à température ambiante.

L'absorbance des standards et des échantillons a été ensuite déterminée à 595nm grâce au lecteur Multiskan™ GO Microplate spectrophotometer (ThermoFisher Scientific).

E. ELISA MULTIPLEX

La sécrétion de protéines dans les surnageants de culture a été mesurée avec les kits « Human Cytokine / Chemiokine Magnetic Bead Panel » et « Human CD8+ T Cell Magnetic Bead Panel – Immunology Multiplex Assay » (Milliplex Map, Merck Millipore).

16 analytes ont été quantifiés (IFN γ , TNF α , IL1 β , IL2, IL4, IL6, IL8, IL10, IL12, IL13, IL15, MIP-1a, MIP-1d, sFas, sFasL et EGF).

Chaque puits a été lavé pendant 10 minutes avec 200µl de « wash buffer », puis 25µl d'échantillons, de standards ou de contrôles ont été déposés dans les puits correspondants, dans lesquels 25µl de réactif et 25µl de billes magnétiques ont préalablement été déposés. L'incubation s'est faite à 4°C sous agitation pendant une nuit.

Après lavage des puits, 25µl de billes de détection ont été déposées et incubées pendant 1h. 25µl de Streptavidine-Phycoerythrine ont ensuite été ajoutés et incubés pendant 30 minutes. 150µl de « drive fluid » ont été ajoutés après lavage des puits. La plaque a ensuite été analysée à l'aide d'un Luminex® 200™, HTS, FLEXMAP 3D®.

F. Mesure de l'expression génique

La RT-qPCR est réalisée en plusieurs étapes permettant dans un premier temps d'extraire les acides nucléiques des cellules et des EV, de rétrotranscrire l'ARNm ou les miARN en ADNc puis d'amplifier et de quantifier cet ADNc.

1. Expression génique des monocytes primaires et des BEAS-2B

a) *Extraction des ARN*

L'extraction des ARNm a été réalisée au moyen du kit Nucleospin® miARN (Macherey Nagel) permettant l'obtention de deux fractions, l'une contenant les grands ARN (de taille supérieure à 200nm) et l'autre contenant les petits ARN (de taille inférieure à 200nm). C'est dans cette dernière que se trouvent les miARN.

b) *Quantification des ARNm*

La rétrotranscription (RT) a été réalisée avec le kit « High-Capacity cDNA Reverse Transcription » (Applied Biosystem®, ThermoFisher Scientific)

200 ng d'ARNm ont été ajoutés au mélange réactionnel, composé de RT Buffer, de dNTP, de primers d'hexamères aléatoires et de l'enzyme (reverse transcriptase). La RT a été réalisée selon le programme suivant : 60 minutes à 37°C pour la rétrotranscription et 5 minutes à 95°C pour l'inactivation.

1µl de produits de RT a été déposé par puits dans des microplaques 96 puits auquel ont été ajoutés le mélange réactionnel comprenant le Taqman® Fast Universal PCR Mix, l'amorce spécifique du gène testé et de l'eau ultrapure. La qPCR a été réalisée en utilisant le thermocycleur 7500 Fast Real Time PCR system (Life Technologies, ThermoFisher Scientific) en mode Fast, selon le programme suivant : 2 minutes à 50°C puis 20 secondes à 95°C (activation de l'enzyme Taq polymérase), suivi de 40 cycles d'amplification comprenant 3 secondes à 95°C (dénaturation) puis 30 secondes à 60°C (hybridation, élongation et collecte des données).

Les mesures d'expression génique ont été réalisées par réaction en chaîne par polymérase en temps réel (qPCR), au moyen du 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, ThermoFisher Scientific). Les modifications dans l'expression génique ont été calculées par la méthode du $2^{-\Delta\Delta C_t}$ et normalisées sur l'expression du 18S (Référence Taqman ThermoFisher Scientific Hs99999901_s1).

Plusieurs gènes de référence ont été testés (18S, RPL37A, ACTB, Cyclofiline B, B2M). Il a été choisi de travailler avec le couple RPL37/ACTB pour la quantification de l'expression génique des THP1 et avec le 18S pour celle des macrophages.

Les gènes testés par qPCR sont référencés dans le tableau 7 :

Tableau 7 : Primers utilisés en qPCR (Référence Taqman®)

Gène	Référence	Fonction	Gène	Référence	Fonction
18S	Hs99999901_s1	Référence	CAT	Hs00156308_m1	Stress
IL1 β	Hs01555410_m1	Inflammation	SOD2	Hs00167309_m1	oxydant
IL6	Hs00985639_m1		PTEN	Hs02621230_s1	Cancer, apoptose
IL8	Hs00174109_m1		VEGFA	Hs00900055_m1	
IL10	Hs00961622_m1		BAX	Hs99999001_m1	
IL12	Hs01011518_m1		BCL-2	Hs04986394_s1	
TNF α	Hs01113624_g1		BCL-XL	Hs00236329_m1	
TGF β	HS00820148_g1		PD-1	Hs01550088_m1	
NRF2	Hs00975961_g1		PDL-1	Hs00204257_m1	
CYP1A1	Hs01054796_g1	Stress oxydant, Métabolisation des Xénobiotiques	CD16	Hs04334165_m1	Polarisation (monocytes primaires)
CYP1B1	Hs02382916_s1		CD206	Hs00267207_m1	
NQO1	Hs01045993_g1		iNOS	Hs01075529_m1	

c) *Quantification des miARN*

La technologie diffère entre ARNm et miARN au moment de la rétrotranscription en ADNc. Il existe deux technologies Taqman® pour l'étude des niveaux des miARN. La différence réside dans la rétrotranscription des miARN en ADNc. La première, que nous appellerons « spécifique », consiste à réaliser des RT avec des primers spécifiques, propres à chaque miARN. Il n'y a pas beaucoup de différences dans le protocole par rapport aux ARNm. Le kit est le même que celui utilisé pour la RT des ARNm. La différence réside dans l'utilisation de ces primers spécifiques et non de primers d'hexamères aléatoires. La deuxième technique consiste à réaliser une miRT dite « universelle », différente de celle des ARNm et miARN dits « spécifiques », mais avec l'utilisation de primers universels pour tous les miARN. Pour ces travaux, nous avons utilisé les deux technologies, mais principalement celle dite « spécifique ».

o *RT-qPCR miARN « spécifique »*

Cette technologie a été utilisée pour les analyses portant sur les miARN des EV, pour les miARN des BEAS-2B exposées aux EV et pour les miARN de référence.

120 ng de miARN ont été ajoutés au mélange réactionnel, composé de RT Buffer, de dNTPs, de primers spécifiques et de l'enzyme (reverse transcriptase). La RT a été réalisée selon le programme suivant : 60 minutes à 37°C pour la rétrotranscription et 5 minutes à 95°C pour l'inactivation.

2µl de produits de RT ont été déposés par puits dans des microplaques 96 puits auxquels ont été ajoutés le mélange réactionnel comprenant le Taqman® Fast Universal PCR Mix, l'amorce spécifique du gène testé et de l'eau ultrapure. La qPCR a été réalisée en utilisant le thermocycleur 7500 Fast Real Time PCR system (Life Technologies, ThermoFisher Scientific) en mode Fast, selon le programme suivant : 10 minutes à 95°C (activation de l'enzyme Taq polymérase), puis 40 cycles d'amplification comprenant 15 secondes à 95°C (dénaturation) puis 60 secondes à 60°C (hybridation, élongation et collecte des données).

Les miARN analysés avec cette technologie sont répertoriés dans le tableau suivant (tableau 8) :

Tableau 8 : Liste et références des primers spécifiques (RT + qPCR) Taqman®

miARN	Référence	miARN	Référence
RNU48	001006	hsa-miR197-5p	000497
RU6B	002098	hsa-miR221-5p	000524
hsa-miR16-5p	000391	hsa-miR223-5p	002098
hsa-miR21-5p	000397	hsa-miR331-5p	000545
hsa-miR26a-5p	000405	hsa-miR378-5p	002243
hsa-miR26b-5p	000407	hsa-miR629-5p	002436
hsa-miR30a-5p	000416	hsa-let7e-5p	002406
hsa-miR128a-5p	002216	hsa-let7g-5p	002282

○ *RT-qPCR miARN « universelle »*

Cette technologie a été utilisée pour les analyses portant sur les miARN des macrophages exposés aux PM_{2.5}.

Cette miRT est réalisée en utilisant le kit Taqman® Advanced miRNA cDNA Synthesis kit (ThermoFisher Scientific)

Contrairement à la technologie dite « spécifique », la RT dite « universelle » nécessite plusieurs étapes. :

- 1) Ajout de la queue poly(A)

Tout d'abord 10 ng de miARN pour les monocytes primaires ont été ajoutés au mélange réactionnel, composé de poly(A) Buffer, d'ATP, d'une enzyme (poly(A) enzyme) et d'eau ultra pure. Cette étape d'ajout de queue poly(A) a été réalisée selon le programme suivant : 47 minutes à 37°C pour la polyadénylation et 5 minutes à 95°C pour l'inactivation.

- 2) Ligation.

Dans le mix précédent est ajouté un nouveau mélange réactionnel composé de deux enzymes (DNA ligase B et RNA ligase), de polyéthylène glycol à 50%, de « ligation adaptor » et d'eau ultrapure. Cette étape de ligation a été réalisée pendant 60 minutes à 16°C.

- 3) Rétrotranscription

A nouveau dans le mélange précédent est ajoutée une solution réactionnelle, constituée de RT Buffer, de dNTP, de primers universels, de l'enzyme et d'eau ultrapure. La RT est réalisée selon le programme suivant : 15 minutes à 42°C pour la rétrotranscription et 5 minutes à 85°C pour l'inactivation de la réaction.

- 4) Amplification des miARN

5µl de produit de RT sont ajoutés au mélange réactionnel comprenant du « miR-Amp Master mix et des primers ». Le programme a été le suivant : 5 minutes à 95°C suivi par 14 cycles d'amplification (3 secondes à 95°C et 30 secondes à 60°C) pour terminer par 10 minutes à 99°C.

Une fois ces différentes étapes accomplies, 2,5µl sont déposés par puits dans des plaques 96 puits auxquels ont été ajoutés le mélange réactionnel comprenant le Taqman® Fast Universal PCR Mix, l'amorce spécifique du gène testé et de l'eau ultrapure. La qPCR a été réalisée en utilisant le thermocycleur 7500 Fast Real Time PCR system (Life Technologies, ThermoFisher Scientific) en mode Fast, selon le programme suivant : 20 secondes à 95°C (activation de l'enzyme Taq polymérase), suivi de 40 cycles d'amplification comprenant 3 secondes à 95°C (dénaturation) puis 30 secondes à 60°C (hybridation, élongation et collecte des données).

Les miARN analysés par cette technique sont répertoriés dans le tableau ci-dessous (tableau 9).

Tableau 9 : Liste et références des primers universels (qPCR) Taqman®

miARN	Référence	miARN	Référence
hsa-miR16-5p	477860_mir	hsa-miR146a-5p	478399-mir
hsa-miR19a-5p	478750-mir	hsa-miR155-5p	477927-mir
hsa-miR21-5p	477975-mir	hsa-miR193b-5p	478742-mir
hsa-miR26b-5p	478418-mir	hsa-miR200c-5p	478754-mir
hsa-miR27a-5p	477998-mir	hsa-miR222-5p	478779-mir
hsa-miR29a-5p	478002-mir	hsa-miR223-3p	477983-mir
hsa-miR29b.1-5p	478794-mir	hsa-let7a-5p	478575-mir
hsa-miR125a-3p	477883-mir	hsa-let7g-5p	478580-mir
hsa-miR128-3p	477892-mir		

2. Quantification des miARN des vésicules extracellulaires

L'extraction des miARN a été réalisée au moyen du kit « Total Exosome RNA and Protein Isolation Kit » (Life Invitrogen, ThermoFisher Scientific). La RT a été réalisée à partir du kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, ThermoFisher Scientific).

La technologie Taqman® utilisée a été celle dite « spécifique ». Les miARN testés sont répertoriés dans le tableau 8.

Il n'existe pas de miARN de référence connu dans les EV. Une matrice de corrélation a été réalisée afin de déterminer le meilleur candidat pour devenir le miARN de référence entre tous les miARN testés. Les analyses statistiques ont permis de déterminer hsa-miR-16-5p comme miARN de référence pour les échantillons d'EV.

3. Microscopie électronique

Les EV reprises dans du PBS ont été déposées sur des grilles de cuivre 300 mesh à revêtement formvar pendant 10 minutes, rincées trois fois avec de l'eau et contrastées avec 2% d'acide phosphotungstique pendant 10 secondes. Les images ont été obtenues par microscopie électronique à transmission avec un microscope électronique JEOL 7100F (JEOL Ltd, Japon).

G. WESTERN BLOT

Dans un premier temps, les protéines des culots cellulaires ont été extraites au moyen du M-PER™ Mammalian Protein Extraction Reagent (Thermo Scientific, Thermo Fisher Scientific SAS, Illkirch, France).

Pour cela, les protéines sont culotées par centrifugation pendant 10 minutes à 2500g et le surnageant est enlevé. 1mL de M-PER Reagent est ajouté pour 100mg de lysat cellulaire. Après 10 minutes sous agitation, les échantillons sont à nouveau centrifugés 15 minutes à 14 000g. Le surnageant contenant les protéines est récupéré et congelé à -80°C jusqu'à utilisation.

Les protéines ont ensuite été dosées par une méthode utilisant l'acide bicinchoninique (BCA). En milieu alcalin, les protéines réduisent l'ion cuivrique Cu^{2+} en Cu^+ . La quantité de protéines est alors proportionnelle à la quantité de Cu^+ formé. Le BCA forme des complexes pourpres avec le Cu^+ , dont la concentration peut être déterminée par colorimétrie, ces complexes colorés ayant une absorption optimale à 562nm.

25µl d'échantillons (dilués ou non) ont été déposés en duplicats dans une microplaque 96 puits. Le mélange réactionnel a été préparé en mélangeant 50 unités de volume de BCA pour 1 unité de volume de sulfate de cuivre. 200µl de ce mélange réactionnel ont été ajoutés à nos échantillons et aux standards de BSA. La plaque a été mise à incuber pendant 30 minutes à 37°C sous agitation légère. L'absorbance des standards et des échantillons a été ensuite déterminée à 562nm grâce au lecteur Multiskan.

10µg de protéines ont été déposées par puits, avec 5µl de SDS tris-glys, 4X (Alpha Aesar) et 5µl d' H_2O , dans des gels précoulés Novex tris-glycine, 15 puits de 1,5mm (Life Technologies, ThermoFisher Scientific). Les protéines ont été au préalable dénaturées pendant 2min à 95°C.

La migration a été réalisée pendant 1 heure à 35mA et le transfert à 30V pendant 1h30. CD16 (ab94773, Abcam), CD206 (ab64693, Abcam), CYP1B1 (PTWX11276, Proteogenix), NRF2 (MAB3925, R&D Systems) et PTEN (D3QGG, Cell Signlaing Technologies) ont été analysé dans les THP1 et les monocytes primaires et CD63 (NB100-65805, Novus biologicals) et CD81 (NBP2-42225, Novus biologicals) dans les EV. La quantification a été réalisée sur l'actine (ab8227, Abcam)

H. ANALYSES STATISTIQUES

Les résultats obtenus ont été représentés par leur médiane et leur espace interquartile (quartile 25% - quartile 75%), à l'exception des résultats de taille des EV qui ont été présentés en moyenne et déviation standard. Après vérification des conditions de normalité (test de Shapiro-Wilk, $p > 0.05$), la mise en évidence des significativités a été réalisée en utilisant le test U de Mann-Whitney ($p < 0,05$).

Les quantifications relatives de l'expression génique ont été réalisées selon la méthode du $2^{-\Delta\Delta Ct}$ décrite par Livak et Schmittgen (Schmittgen and Livak, 2008) et normalisées sur la moyenne géométrique des Ct du couple ACTB/RPL37A pour les ARNm provenant des cellules THP-1 et du Ct du 18S pour les macrophages primaires. Les niveaux d'expression des miARN ont été normalisés grâce à RNU48 pour les THP1 et U6 pour les macrophages primaires. Concernant les niveaux d'expression des miARN dans les EV, une matrice de corrélation basée sur le test de corrélation de Pearson ($p < 0,05$) et la méthode du $2^{-\Delta\Delta Ct}$ décrite par Schmittgen et Livak (Schmittgen and Livak, 2008) a permis d'identifier miR-16 comme gène de référence. Enfin, la mise en évidence des significativités a été réalisée, en utilisant respectivement les seuils 0,5 et 2 pour une sous-expression et une sur-expression.

CHAPITRE 3 :

Résultats

Dans ce troisième chapitre, nous présenterons les résultats obtenus au cours de ce travail de thèse. Ce chapitre sera subdivisé en quatre sous parties. La première portera sur les résultats de caractérisation physico-chimique des $PM_{2.5}$. La deuxième partie traitera de l'optimisation faite sur une lignée cellulaire, les THP1. La troisième partie sera consacrée aux résultats obtenus après exposition des macrophages primaires aux $PM_{2.5}$ et la dernière aux résultats obtenus après exposition des cellules épithéliales pulmonaires BEAS-2B aux vésicules extracellulaires libérées par les THP1 et les macrophages primaires en réponse à l'exposition aux particules.

III. RESULTATS

A. CARACTERISATION PHYSICO-CHIMIQUE DES PM_{2,5}

1. Concentrations en PM_{2,5}

Au cours de la période de 12 mois durant laquelle l'échantillonnage des particules a été réalisé (19 mars 2014 - 18 mars 2015), la concentration moyenne de PM_{2,5} était de 16,6 µg/m³, selon les données recueillies dans une station de typologie urbaine à Dunkerque du réseau de mesure Atmo Hauts-de-France. Ce niveau de concentration correspond à une valeur similaire aux normales enregistrées sur ce site et se situe en-dessous de la limite annuelle de 25 µg/m³ en vigueur en France depuis le 1^{er} janvier 2015. L'évolution de la concentration journalière des PM_{2,5} sur les 4 saisons pendant la période d'échantillonnage (figure 39) montre néanmoins ponctuellement des augmentations conséquentes de la concentration en PM_{2,5}. Ces dernières sont notamment associées à des épisodes de pollution lors desquels les seuils d'information et de recommandation (>50µg/m³) ou d'alerte (>80µg/m³) qui se réfèrent à la réglementation relative aux concentrations en PM₁₀ ont été dépassés. Durant la période globale de 12 mois, le seuil d'information et de recommandation a été franchi sur 51 jours (dont 20 au printemps), contre 5 pour le seuil d'alerte. Il ressort également qu'il a été enregistré plus de jours caractérisés par une concentration de PM_{2,5} au-delà de 25 µg/m³ au printemps que durant les autres saisons. Ceci est en accord avec la survenue plus fréquente d'épisodes de pollution aux particules en période printanière (Favez et al., 2012). En termes de concentration moyenne de PM_{2,5} au cours de chaque saison, une légère différence est observée entre hiver-printemps (de l'ordre de 17µg/m³ contre 15,5 µg/m³ en été). L'écart entre les saisons est peu significatif, néanmoins cette différence s'explique par la survenue plus fréquente d'épisodes de forte concentration sur des périodes courtes au printemps et d'un épisode en particulier de forte amplitude et de longue durée en fin d'hiver (figure 38).

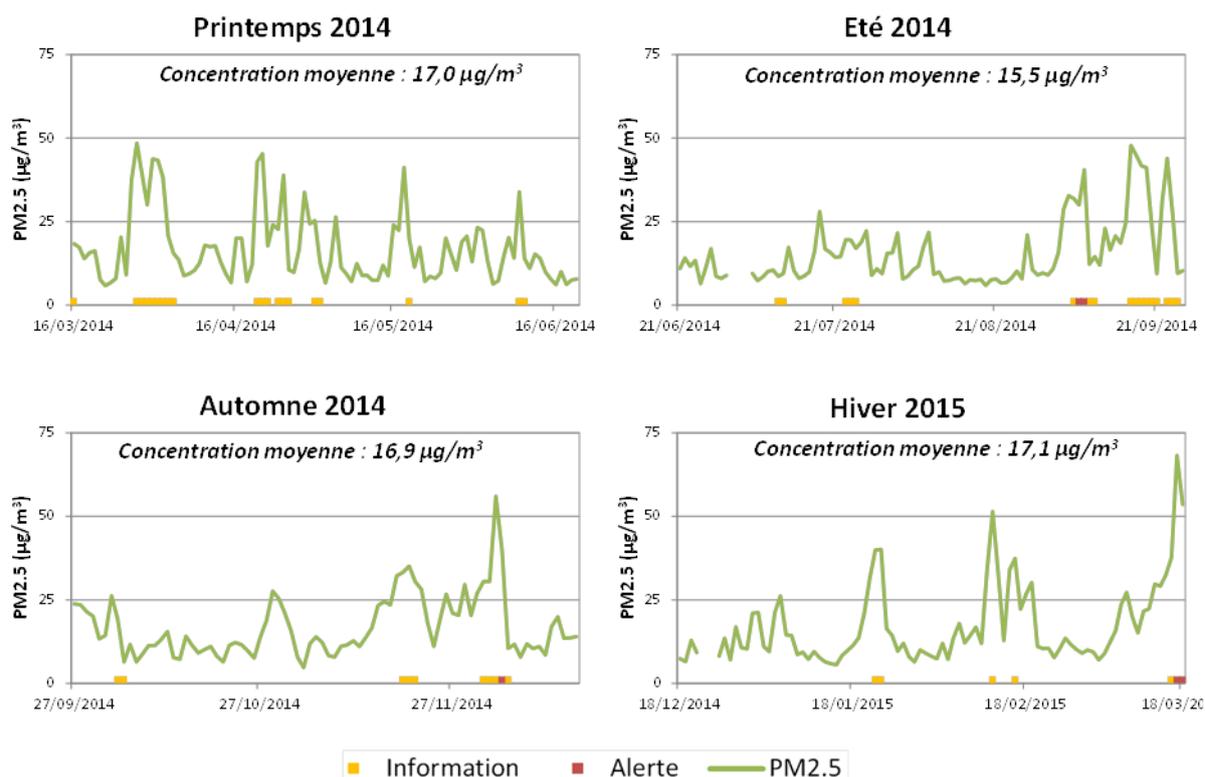


Figure 38 : Evolution des concentrations moyennes journalières de PM_{2,5} à Dunkerque au cours de la période d'échantillonnage entre mars 2014 et mars 2015
 (printemps 2014 : 16/03 au 21/06 ; été 2014 : 21/06 au 26/09 ; automne 2014 : 27/09 au 17/12 ; hiver 2015 : 18/12/14 au 18/03/15) ; seuil d'information et d'alerte relatif à la réglementation PM₁₀

Le tracé des roses de concentration de PM_{2,5} (figure 39) montre que les niveaux les plus élevés de PM_{2,5} ont été enregistrés par des vents de secteur Est à chaque saison, ainsi que par vent de Sud-Est en été et en hiver. Cette information tend à montrer l'influence d'apports continentaux sur les niveaux de concentration de PM_{2,5}. Elle est en cohérence avec des observations analogues faites sur le même site d'étude en 2010-2011 (Kfoury, 2013). L'exploitation de données de rétrotrajectoires de masses d'air avait alors montré, sous le secteur Est, l'influence d'apports sur de longues distances venant d'Europe centrale, et d'autre part, sous le secteur Sud-est, l'influence de masses d'air ayant traversé la France du Sud au Nord. Lors de ces déplacements de masses d'air sur de longues distances et par condition sèche, celles-ci accumulent des polluants gazeux et des particules. Les conditions météorologiques anticycloniques sont propices à la conversion d'une partie des polluants gazeux (NO_x, SO₂, NH₃, certains COV) en particules, ce qui contribue également aux valeurs élevées de concentration de PM_{2,5} observées. Il apparaît également des différences saisonnières avec la distinction de valeurs moyennes de l'ordre de 20 µg/m³ sous le secteur nord-ouest au printemps et en été, tandis que cette observation n'apparaît pas du tout en hiver. Il sera intéressant de prendre en compte ces différences

lors de l'interprétation des données de composition chimique des particules et des contributions de sources.

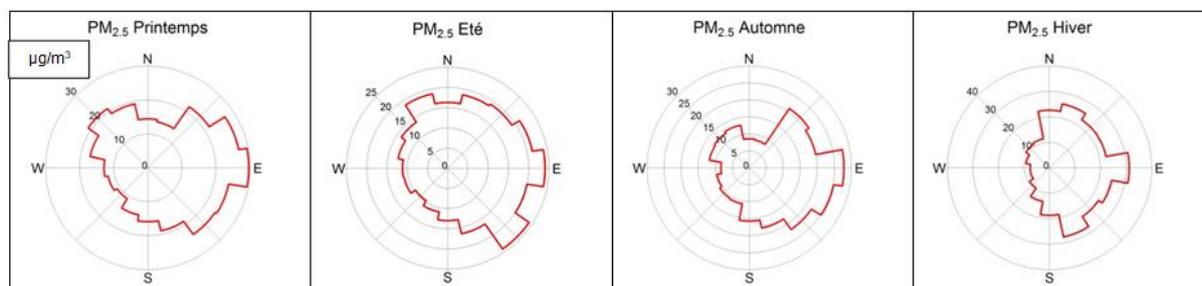


Figure 39 : Roses de concentration de PM_{2,5} au cours de chaque saison de la période d'échantillonnage mars 2014 - mars 2015.

2. Teneurs en éléments et ions inorganiques hydrosolubles

Les teneurs en éléments majeurs et traces ainsi qu'en espèces inorganiques hydrosolubles sont reportées dans le tableau 10. Le Carbone (14,3%), les espèces ioniques hydrosolubles anioniques (23,6%) - nitrates (NO₃⁻), sulfates (SO₄²⁻), chlorures (Cl⁻) - et cationiques (11,3%), calcium (Ca²⁺), sodium (Na⁺), ammonium (NH₄⁺), magnésium (Mg²⁺) et potassium (K⁺), ainsi que le Fe (3,8%) et l'Al (2,8%) représentent des constituants majoritaires des particules (56% au total).

Tableau 10 : Teneurs en éléments et ions inorganiques hydrosolubles des particules PM_{0,3-2,5} collectées à Dunkerque (µg/g)

µg/g	Annuel	Printemps	Été	Automne	Hiver
Al	28 026	21 810	27 136	31 719	34 171
As	13,9	12,2	12,1	17,3	16,1
Ba	331	272	343	399	339
Cd	6,3	6,8	6,2	5,6	6,2
Co	8,7	10,3	7,9	7,4	7,0
Cr	144	136	136	181	152
Cu	639	583	538	803	691
Fe	37 530	41 179	40 666	31 331	43 747
Mn	1 767	1 880	1 984	1 235	1 922
Mo	30,3	24,0	30,5	40,2	30,7
Ni	116	137	111	105	95,9
P	1 345	1 303	1 882	1 509	783
Pb	234	226	179	263	271
Sn	78,3	56,5	61,5	116	128
Sr	126	149	116	98,2	120
Ti	369	474	370	269	316
V	108	122	110	76,0	118
Zn	1 293	1 259	1 117	1 335	1 440
F⁻	200	300	200	< l de q	< l de q
Cl⁻	60 900	63 200	45 300	51 000	86 700
SO₄²⁻	75 200	70 600	83 400	72 100	76 600
NO₃⁻	100 400	126 100	92 900	80 900	89 900
Na⁺	43 300	49 700	39 600	29 300	50 100
NH₄⁺	16 400	16 800	15 000	22 900	21 700
K⁺	4 500	4 300	4 500	4 900	4 700
Mg²⁺	6 500	6 800	6 200	5 200	6 900
Ca²⁺	44 600	52 900	46 200	34 600	37 800
C	143 000	113 000	136 000	190 000	143 000
H	25 000	23 000	26 000	31 000	25 000
N	44 000	51 000	43 000	47 000	43 000
S	24 000	20 000	25 000	23 000	27 000

Les ions NO₃⁻ et SO₄²⁻ représentent essentiellement des ions inorganiques secondaires qui proviennent respectivement de la conversion des composés gazeux NO_x et SO₂. Les oxydes d'azote NO_x sont majoritairement émis par des procédés de combustion (énergies fossiles dans l'automobile ou l'industrie) tandis que l'origine du SO₂ s'explique essentiellement par des émissions industrielles ou liées à la combustion de fioul lourd riches en soufre (Ledoux et al., 2018). Les NO₃⁻ sont détectés en quantité plus élevée au printemps qu'aux autres saisons, notamment en raison de conditions propices à leur accumulation dans l'atmosphère à cette saison (Favez et al., 2012; Kfoury et al., 2016). L'ion ammonium NH₄⁺

correspond aussi à un ion inorganique secondaire, qui résulte de la conversion de l'ammoniac NH_3 dont l'origine est essentiellement agricole. A l'échelle de notre site d'étude, on ne peut toutefois pas exclure une contribution industrielle au regard de la présence d'ammonium dans les émissions particulières du site sidérurgique (Hleis et al., 2013).

Les ions Na^+ , Mg^{2+} et Cl^- sont connus pour être associés aux aérosols marins, dont la contribution peut être significative sur le site d'étude en raison de sa proximité avec l'espace Manche-Mer du Nord. Les données montrent que l'influence des aérosols marins est plus importante en hiver, ce qui est vraisemblablement relié aux conditions météorologiques favorables à la mise en suspension des embruns, notamment lors de vents de vitesse élevée (Roche, 2016). D'une saison à l'autre, il apparaît que le rapport Cl^-/Na^+ n'est pas constant (1,3 au printemps ; 1,1 en été ; 1,7 en automne et en hiver). Le rapport Cl^-/Na^+ égal à 1,7 correspond de près à la valeur caractéristique de l'eau de mer (1,8) et témoigne qu'en automne et hiver, des sels marins fraîchement émis sont présents dans les particules. L'obtention de rapports Cl^-/Na^+ inférieur à 1,7 s'explique par une évolution des sels marins dans l'atmosphère suite à leur réaction avec des espèces gazeuses SO_2 et NO_x , conduisant à une perte d'ions Cl^- (Roche, 2016; Zhao and Gao, 2008). On parle dans ce cas de la présence de sels marins anthropisés ou de sels marins âgés. Le rapport Cl^-/Na^+ est le plus faible en été (1,1) en accord avec des études antérieures qui ont montré que ces réactions interviennent davantage lorsque les conditions favorables aux réactions photochimiques sont rencontrées.

En moyenne sur l'année, et avec très peu de variation saisonnière (1,08-1,20), le rapport de neutralisation entre cations et anions vaut 1,16, montrant un déficit en anions pouvant en partie s'expliquer par la présence de carbonates (CO_3^{2-}) dans l'échantillon. Ces derniers n'ont pas été quantifiés dans cette étude, cependant la détection de la phase CaCO_3 lors de l'étude par diffraction de rayons X appuie cette hypothèse (cf. chapitre A.6 DRX).

Le carbone élémentaire représente 14,3% de la masse des particules, en moyenne annuelle. Les teneurs en C les plus importantes sont mesurées sur les particules prélevées en automne et en hiver, en lien avec les températures plus froides à ces saisons et l'utilisation des moyens de chauffage utilisant des combustibles fossiles. Le ratio C/H est plus élevé pour l'automne (6,2) et l'hiver (5,7) comparé au printemps (4,8) et à l'été (5,2) signifiant que la fraction carbonée de particules collectées l'automne et l'hiver montrent une proportion plus grande de suies (Ambrogio et al., 2002).

Parmi les éléments métalliques mesurés, Al et Fe présentent des teneurs les plus élevées (entre 2 et 4% en masse) et peuvent montrer des origines crustale et industrielle, traduisant respectivement l'exposition du site d'études à des réenvols de particules issues du sol et à des émissions issues des activités sidérurgiques, métallurgiques ou cimentières (Kfoury et al., 2016; Oravisjarvi et al., 2003; Santacatalina et al., 2010).

Les éléments métalliques Cr, Cu, Mn, Ni, Pb, V et Zn sont très majoritairement associés à des origines anthropiques. Les éléments Ni, V et Co peuvent être considérés comme des traceurs de la combustion de fioul lourd, notamment utilisé pour le trafic maritime (Mazzei et al., 2008; Roche, 2016), tandis que les éléments Zn, Pb, Cr et Cu sont davantage associés à l'usure de pièces des véhicules comme les freins et les pneus (Gietl et al., 2010; Thorpe and Harrison, 2008). Notons aussi que lors d'une étude réalisée dans le bassin dunkerquois, la présence des éléments Fe, Mn, Zn, Pb, Cr et Cd a pu être également reliée à l'activité sidérurgique et métallurgique (Kfoury et al., 2016).

De manière à mettre en évidence d'éventuelles différences saisonnières au niveau des éléments, nous avons comparé la teneur des éléments à chaque saison avec celle mesurée dans l'échantillon moyen annuel, en calculant le rapport : $([X]_{\text{saison}} - [X]_{\text{annuel}}) / [X]_{\text{annuel}}$ (figure 41). La présence prépondérante de certaines espèces, au cours d'une saison en particulier, peut être reliée à l'influence plus marquée d'une source émettrice. De manière à mieux visualiser les informations, les éléments reliés à des sources principales ont été représentés par une même couleur. Comme indiqué ci-dessus, nous confirmons une association des éléments issus de la combustion du fioul lourd Ni, V et Co avec des écarts analogues de ces éléments pour une saison donnée par rapport à la moyenne annuelle. La contribution de cette source est plus prononcée au printemps alors qu'elle est la plus faible en automne. De la même manière, nous observons un impact des émissions sidérurgiques et métallurgiques, caractérisé par l'évolution des éléments Fe, Mn, Cd, supérieur au printemps, en été et en hiver par rapport à la moyenne annuelle. En automne, la teneur en Fe et Mn dans les particules est moindre, ce qui indique une exposition plus faible aux émissions de l'industrie sidérurgique à cette saison. Ceci est en accord la fréquence plus élevée des vents de secteur Sud-Ouest en automne, comme le montre les roses des vents en Annexe I, qui favorisent la dispersion des émissions industrielles vers la Mer du Nord, plutôt que vers le site sur lequel est conduit l'échantillonnage. A l'inverse, la figure 41 révèle un impact des émissions liées au trafic routier hors échappement (Zn, Pb, Cu, Cr) plus grand en automne et en hiver qu'en moyenne sur l'année. Ceci est également cohérent

avec les roses des vents rencontrées durant ces deux saisons qui montrent la prédominance de vents de secteur Sud, provenant du cœur de l'agglomération dunkerquoise.

Les éléments Ca et Ti montrent également une évolution analogue. Ces derniers sont connus pour être représentatifs de la composition du sol (Wedepohl, 1995), tout comme Al. Ce dernier n'a cependant pas le même comportement que Ca et Ti, très probablement en raison de l'origine multiple que cet élément peut montrer.

Durant l'automne et l'hiver, nous pouvons observer des écarts à la moyenne très importants pour Sn. Ces deux périodes ont été caractérisées par une très forte proportion de vents de Sud (Annexe D). L'origine de cet élément est délicate à définir mais nous pouvons émettre l'hypothèse de l'influence des émissions d'une industrie verrière localisée à Saint-Omer, 35 km au sud de Dunkerque. Dans un précédent travail, nous avons en effet montré que cette industrie avait un impact non négligeable sur les teneurs atmosphériques en Sn et As ; nous avons également prouvé que des émissions étaient susceptibles d'impacter un site distant de 35 km (Ledoux et al., 2017).

Ce type de représentation montre ainsi de claires différences saisonnières de teneurs en éléments, qui s'expliquent par des impacts de sources variables d'une saison à l'autre. Outre les flux d'émission qui peuvent varier au cours de l'année, les conditions météorologiques (fréquences et directions de vent) gouvernent en partie ces différences saisonnières.

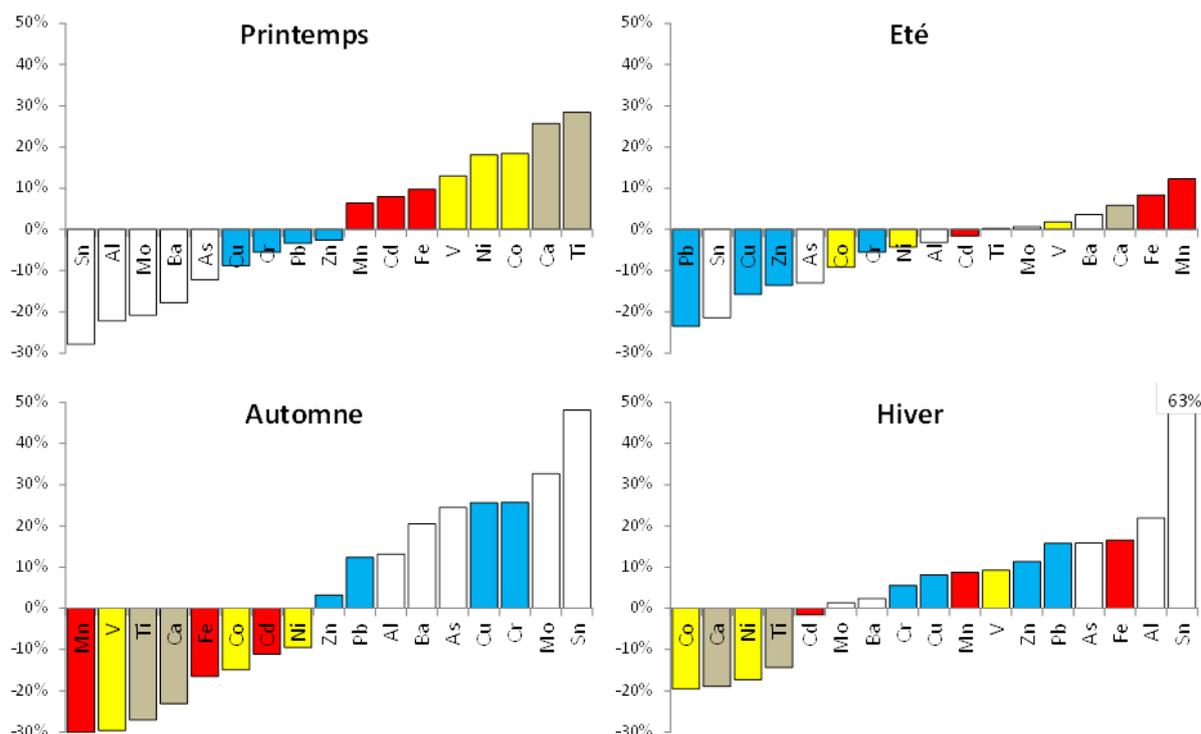


Figure 40 : Ecart de concentration des éléments par rapport à la moyenne annuelle mettant en évidence les différences saisonnières et l'impact prépondérant de différentes sources.

Les éléments ont été regroupés par couleur en fonction de leur origine probable : rouge pour l'activité sidérurgique et métallurgique ; bleu pour les émissions liées au trafic hors échappement ; jaune pour les émissions liées à la combustion du fioul lourd ; marron pour l'origine crustale)

3. Dioxines, furanes et polychlorobiphényles

Les concentrations en dioxines, furanes et polychlorobiphényles (PCB) mesurées dans l'échantillon de PM_{0.3-2.5} collecté sont présentées dans le tableau 11. Les teneurs des PM en DL PCB sont du même ordre de grandeur que dans l'étude réalisée en 2011 à Dunkerque (Landkocz et al., 2016). En revanche, on remarque une augmentation sensible des teneurs en dioxines, furanes et PCBi.

Les concentrations en dioxines, furanes et PCB dans les divers compartiments de l'environnement sont en général exprimées en équivalent toxique (I-TEQ : International Toxic Equivalent) défini par l'Organisation Mondiale de la Santé (WHO : World Health Organization). Pour un mélange donné, le calcul en équivalent toxique (TEQ) consiste à multiplier la concentration de chaque molécule par son facteur d'équivalent toxique (TEF) puis à sommer l'ensemble des contributions. On obtient ainsi 535,5 pg I-TEQ WHO / g PM de dioxines et furanes et 15,8 pg I-TEQ WHO / g PM de DL-PCB (tableau 11).

Tableau 11 : Teneurs moyennes en dioxines, furanes et polychlorobiphényles dans les PM_{0.3-2.5} collectées entre mars 2014 et mars 2015

	Concentration	Echantillon moyen (pg/g)	Facteur d'équivalence de toxicité (TEF) (Van den Berg et al., 2006)	pg I-TEQ WHO /g PM
PCB-DL	PCB81	LD	0,0003	LD
	PCB77	451	0,0001	0,045
	PCB123	52	0,00003	0,002
	PCB118	5 752	0,00003	0,173
	PCB114	LD	0,00003	LD
	PCB105	3 044	0,00003	0,091
	PCB126	154	0,1	15,4
	PCB167	615	0,00003	0,018
	PCB156	1 651	0,00003	0,050
	PCB157	408	0,00003	0,012
	PCB169	<LD	0,03	<LD
	PCB189	<LD	0,00003	<LD
	Total PCB-DL	12 127		15,8
PCBi	PCB28	1 297		
	PCB52	2 827		
	PCB101	4 014		
	PCB138	9 419		
	PCB153	11 570		
	PCB180	8 390		
	Total PCBi	37 517		
Dioxines	2,3,7,8 TCDD	<LD	1	<LD
	1,2,3,7,8 PeCDD	84	1	84
	1,2,3,4,7,8 HxCDD	<LD	0,1	<LD
	1,2,3,6,7,8 HxCDD	81	0,1	8,1
	1,2,3,7,8,9 HxCDD	1 864	0,1	186,4
	1,2,3,4,6,7,8 HpCDD	3 587	0,01	35,9
	OCDD	8 521	0,0003	2,556
	Total Dioxines	14 137		317,
Furanes	2,3,7,8, TCDF	116	0,1	11,6
	1,2,3,7,8 PeCDF	225	0,03	6,8
	2,3,4,7,8 PeCDF	456	0,3	136,8
	1,2,3,4,7,8 HxCDF	<LD	0,1	<LD
	1,2,3,6,7,8 HxCDF	<LD	0,1	<LD
	2,3,4,6,7,8 HxCDF	312	0,1	31,2
	1,2,3,7,8,9 HxCDF	166	0,1	16,6
	1,2,3,4,6,7,8 HpCDF	678	0,01	6,8
	1,2,3,4,7,8,9 HpCDF	850	0,01	8,5
	OCDF	1 051	0,0003	0,315
	Total Furanes	3 855		218,6 pg I-TEQ WHO / g PM

4. Hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP)

Les concentrations moyennes sur la période d'étude des 16 HAP prioritaires listés par l'United States Environmental Protection Agency (USEPA) sont reportées dans le tableau 12. Les composés majoritairement détectés sont le dibenz[a,h]anthracène (8,9 µg/g), devant l'indéno[1,2,3-c,d]pyrène, le chrysène et le benzo[b]fluoranthène, avec des concentrations très proches et comprises entre 5,3 et 6,0 µg/g. Les autres composés montrent des concentrations inférieures à 5 µg/g, et les 6 HAP les plus légers (composés à 2 et à 3 cycles) sous 1 µg/g.

Tableau 12 : Teneurs en Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (µg/g) dans les PM_{0.3-2.5} collectées à Dunkerque entre Mars 2014 et Mars 2015 et Facteur d'Equivalence Toxique (BaP-TEF) (Kumar *et al.*, 2018; Nisbet and LaGoy, 1992) et mutagène (BaP-MEF) (Jung *et al.*, 2010) relatifs au BaP (n.d. : non détecté)

Composé	Symbole	Annuel (µg/g)	BaP-TEF	BaP-MEF
Naphtalène	Nap	0,20	0,001	
Acénaphthylène	Acy	0,11	0,001	
Acénaphthène	Ace	n.d	0,001	
Fluorène	Flu	0,18	0,001	
Phénanthrène	Phe	0,99	0,001	
Anthracène	Ant	0,28	0,001	
Fluoranthène ¹	Fla	2,12	0,001	
Pyrène ¹	Pyr	1,76	0,001	
Benz[a]anthracène ¹	BaA	1,91	0,1	0,08
Chrysène ¹	Chr	5,45	0,01	0,02
Benzo[b]fluoranthène ¹	BbF	5,30	0,1	0,25
Benzo[k]fluoranthène ¹	BkF	1,66	0,1	0,11
Benzo[a]pyrène ¹	BaP	3,85	1	1,00
Indéno[1,2,3-c,d]pyrène ¹	InPy	6,06	0,1	0,31
Dibenz[a,h]anthracène	DahA	8,88	5	0,29
Benzo[g,h,i]pérylène ¹	BghiP	4,43	0,01	0,19

¹ HAP liés à la combustion (CPAH)

Le trafic automobile et plus particulièrement les fumées d'échappement des moteurs Diesel représente la principale source de dibenz[a,h]anthracène et de benzo[b]fluoranthène (Duval and Friedlander, 1981). Le diben[a,h]anthracène est également retrouvé dans la fumée de cigarette ou encore dans les émissions de cokerie (INERIS, 2005a). L'indéno[1,2,3-cd]pyrène est lui aussi principalement émis suite à l'utilisation de combustibles fossiles. Il peut se retrouver dans l'atmosphère lors de la

combustion incomplète de bois, de charbon, de carburant essence ou diesel (INERIS, 2005b). Le chrysène, quant à lui, peut être émis dans l'atmosphère lors de la distillation du charbon et lors de la distillation ou pyrolyse de graisses et de pétrole. Il est présent à des concentrations plus élevées que la plupart des autres HAP dans les combustibles fossiles tels que le pétrole brut. Il fait aussi partie des HAP prédominants dans les émissions particulières provenant des incinérateurs d'ordures ménagères, des appareils ménagers à gaz naturel et des dispositifs de chauffage domestique, en particulier ceux utilisant le bois (INERIS, 2011). Rappelons que parmi les activités industrielles présentes autour de l'agglomération dunkerquoise, figurent la sidérurgie intégrée (comprenant une cokerie), le raffinage de pétrole (en particulier spécialisé dans la production de combustibles marins assimilables à des fiouls lourds), une cimenterie et un centre de traitement de déchets. Les composés majoritairement détectés peuvent donc également, au moins en partie, s'expliquer par l'implantation industrielle sur le territoire.

Le calcul du ratio de concentration de HAP liés à la combustion (tableau 12) par rapport à celle totale en HAP (CPAH/TPAH) donne une valeur de 0,75 en moyenne (tableau 13), ce qui s'avère plutôt caractéristique d'un environnement urbain. La littérature donne, en effet, les valeurs de référence suivantes : 0,7 pour une zone urbaine et 0,96 pour une zone hautement industrialisée (Gogou et al., 1996; Yue and Fraser, 2004).

Tableau 13 : Teneurs moyennes en HAP totaux (TPAH), HAP liés à la combustion (CPAH), ratio CPAH/TPAH et teneurs en équivalent BaP cancérigène (BaP-TEQ) et Mutagène (BaP-MEQ) des PM_{2.5} collectées entre mars 2014 et 2015 en moyenne et pour les différentes saisons

	Année	Printemps	Été	Automne	Hiver
TPAH (µg/g)	43,16	25,09	21,49	79,26	85,15
CPAH (µg/g)	32,53	17,16	14,09	64,84	70,41
CPAH/TPAH	0,75	0,68	0,66	0,82	0,83
BaP-TEQ (µg/g)	49,83	36,76	32,25	68,24	70,57
BaP-MEQ (µg/g)	10,90	7,03	5,74	21,17	21,54

L'étude de ratios de concentrations caractéristiques entre HAP peut permettre d'identifier la contribution de certaines sources d'émission. En effet, certains HAP possèdent des propriétés physicochimiques identiques vis-à-vis de la photochimie, et conservent une proportion relative constante depuis leur point d'émission et lors de leur séjour dans l'atmosphère (Borgie et al., 2016). Ainsi, le ratio InPy/(InPy+BghiP) = 0,58 est compatible avec les émissions diesel (0,35-0,70) (Ravindra et al., 2008), mais aussi avec les émissions associées à la combustion du charbon (>0,50) (Chen et al., 2014). Le ratio BaP/BghiP = 0,87 est, quant à lui, dans la gamme 0,6-1,7 caractéristique de l'activité de raffinage (Masclat

et al., 1986). Le ratio Fla/(Fla+Pyr) = 0,55 est lui aussi compatible avec la combustion de charbon (De La Torre-Roche et al., 2009). En conclusion, l'étude de ces ratios caractéristiques de HAP met en évidence la contribution des émissions des moteurs diesel, ainsi que celles de l'activité industrielle relative à la sidérurgie (cokerie) et au raffinage de pétrole.

La comparaison des données relatives à chaque saison montre de manière globale des teneurs en HAP 3 à 4 fois supérieures en automne et en hiver par rapport au printemps et à l'été (tableau 12). Cette observation avait également été faite dans d'autres travaux menés sur le Dunkerquois ou en région Hauts-de-France (Crenn et al., 2017; Landkocz et al., 2017). La distribution en concentrations des composés est sensiblement identique pour les PM collectées d'un côté, durant le printemps et l'été et, de l'autre, en automne/hiver (figure 41). Entre ces deux périodes, le profil de HAP diffère surtout par la teneur en chrysène (contribution combustion bois et distillation du charbon) et benzo[b]fluoranthène (émissions véhicules diesel). L'évolution du ratio CPAH/TPAH, confirme la contribution plus importante des sources de combustion en automne et hiver, avec une proportion de 82-83% des HAP associés à cette origine, contre 66-68% au printemps/été. Ceci est en accord avec l'évolution de la valeur du ratio C/H évoquée précédemment.

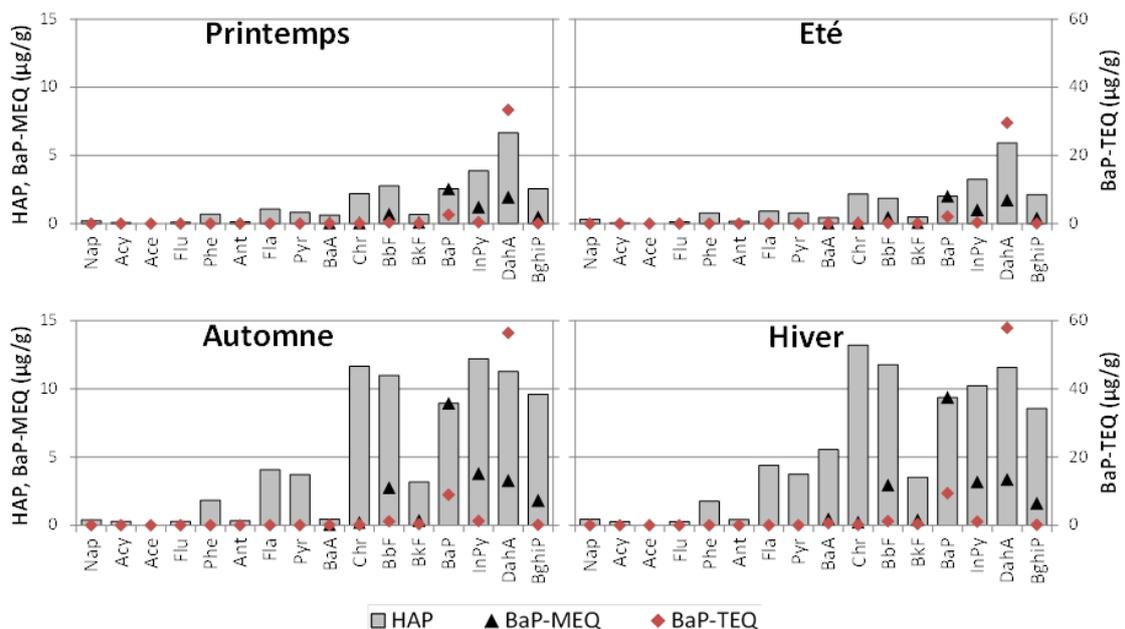


Figure 41 : Teneurs moyennes en HAP, équivalent toxique-BaP (BaP-TEQ), équivalent mutagène-BaP (BaP-MEQ) des particules fines collectées durant les 4 saisons de la période mars 2014 – mars 2015

Les HAP sont des composés connus pour leur toxicité et notamment leurs effets pro-cancérogène et mutagène. Pour cette famille de composés, des facteurs d'équivalence toxiques relatifs au BaP ont pu être définis afin d'être en mesure d'estimer le potentiel cancérogène (BaP-TEF) et mutagène (BaP-MEF) de composés contenant un mélange de HAP. Les facteurs d'équivalence publiés dans la littérature (Jung et al., 2010; Kumar et al., 2018; Nisbet and LaGoy, 1992) sont repris dans le tableau 12. Il suffit alors de multiplier les concentrations observées par ces coefficients et de les sommer pour obtenir une estimation de la toxicité (BaP-TEQ) ou de la mutagénicité (BaP-MEQ) des particules étudiées en équivalent-BaP. Les résultats basés sur ces calculs montrent que les particules recueillies durant les saisons froides (automne/hiver) ont un potentiel cancérogène et mutagène environ 2 fois et 3 à 4 fois respectivement, plus élevée que celles recueillies au printemps et l'été (tableau 13). Parmi les molécules étudiées, le dibenz[a,h]anthracène est celui qui contribue le plus au potentiel cancérogène loin devant le benzo[a]pyrène, indépendamment de la période d'étude (figure 42). Concernant le potentiel mutagène, celui-ci est principalement lié aux teneurs en BaP, DahA, InPy, BbF et BghiP. Les deux premiers composés contribuent de manière égale au printemps/été alors que le BaP présente une valeur près de 2 fois plus élevée que celle du DahA et InPy en automne/hiver. Par rapport à d'autres sites d'études tels que Londres (WGOPAH, 2001) ou New-York (Jung et al., 2010), Dunkerque se distingue par le rôle prépondérant du DahA, dans l'estimation de la toxicité.

5. Alcanes linéaires (n-alcanes)

Le profil des n-alcanes (encore appelés paraffines) peut également être utilisé comme un indicateur du type de sources d'émissions, les homologues pairs (C_{22} , C_{24} ...) pouvant être reliés à des origines anthropiques et les impairs (C_{25} , C_{27} ...) à des origines naturelles (Waples, 1985). L'étude du profil de concentration montre clairement une différence entre les périodes, avec une concentration plus importante pour les homologues inférieurs à C_{25} durant l'automne et l'hiver (figure 42). Ces derniers sont connus pour être associés aux sources de combustion liées au trafic, et s'apparentent à des composés semi-volatils. Les concentrations plus élevées observées en cette période pourraient être liées aux conditions météorologiques plus fraîches, favorisant la présence de ces composés dans l'état particulaire (Andreou and Rapsomanikis, 2009; Feng et al., 2006). Durant le printemps et l'été, les profils sont marqués par de fortes concentrations des homologues impairs C_{25} , et

surtout C₂₇, C₂₉ et C₃₁. Ces derniers sont connus pour provenir des végétaux (Kotianová et al., 2008; Rogge et al., 1993).

En considérant les différents homologues, nous avons déterminé les "Carbon Preference Index" (CPI) à partir des équations proposées par (Bray and Evans, 1961) et (Cooper and Bray, 1963), et reprises dans différents travaux (Chen et al., 2014) :

$$\text{- Overall CPI}_{21-35} = (\Sigma C_{21}-C_{33} + \Sigma C_{21}-C_{35}) / (2 \times \Sigma C_{20}-C_{34}),$$

$$\text{- High CPI}_{25-35} = (\Sigma C_{25}-C_{33} + \Sigma C_{27}-C_{35}) / (2 \times \Sigma C_{26}-C_{34}).$$

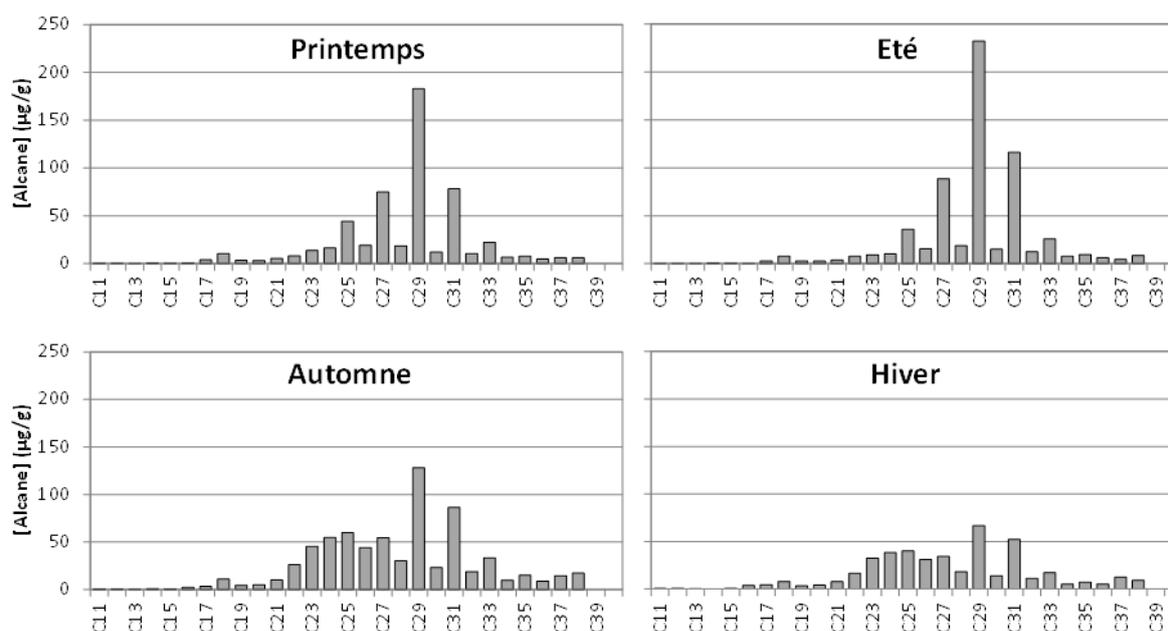


Figure 42 : Teneurs moyennes en alcanes des particules fines collectées durant les 4 saisons de la période mars 2014 – mars 2015

Les valeurs de CPI permettent de mettre en évidence la contribution des sources à partir des valeurs caractéristiques telles que définies sur la figure 43. Il apparaît ainsi clairement que les particules collectées en automne et hiver montrent une contribution mixte des sources naturelles et anthropiques ainsi qu'une origine pétrogénique plus marquée que les particules prélevées au printemps et l'été. Pour ces dernières, le profil n-alcanes montre clairement la contribution des sources naturelles.

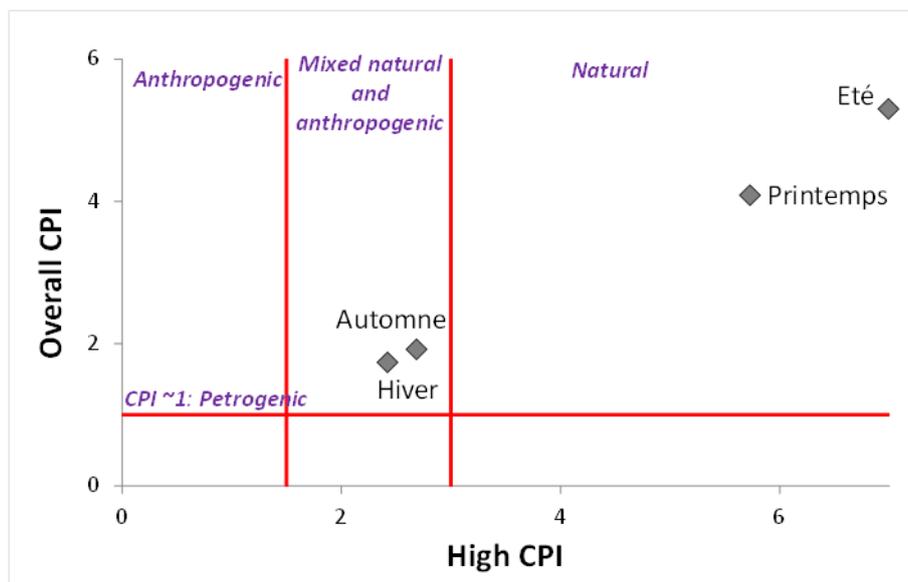


Figure 43 : Etude des sources d'alcane prédominantes selon la saison, à partir du calcul des Carbon Preference Index (CPI) relatifs à l'ensemble des alcanes et à ceux de hauts poids moléculaires

6. Etudes des phases cristallisées par diffraction des rayons X (DRX)

Des éléments associés l'un à l'autre dans l'état solide peuvent se retrouver dans un état cristallisé et la diffraction de rayons X est alors une technique non destructive appropriée pour l'identification des phases cristallines. Le recours à ce type d'analyse est une façon d'obtenir une information sur la forme chimique des éléments détectés et selon la nature des phases identifiées, de déduire l'origine et le mode de formation de certaines particules. L'analyse par diffraction de rayons X a permis de mettre en évidence plusieurs phases cristallines (figure 44) :

- | | |
|--------------------------------|---|
| - calcite [05-0586] | CaCO_3 |
| - gypse [33-1311] | $\text{CaSO}_4, 2\text{H}_2\text{O}$ |
| - silice quartz [46-1045] | SiO_2 |
| - kaolinite [87-2497] | $\text{Al}_2\text{Si}_2\text{O}_5(\text{OH})_4$ |
| - chamosite [85-1356] | $(\text{Fe}_5\text{Al})(\text{AlSi}_3)\text{O}_{10}(\text{OH})_8$ |
| - chlorure de sodium [78-0751] | NaCl |
| - nitratine [85-0850] | NaNO_3 |
| - thermadite [02-0805] | Na_2SO_4 |
| - hématite [33-0664] | $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ |
| - magnétite [16-629] | Fe_3O_4 |

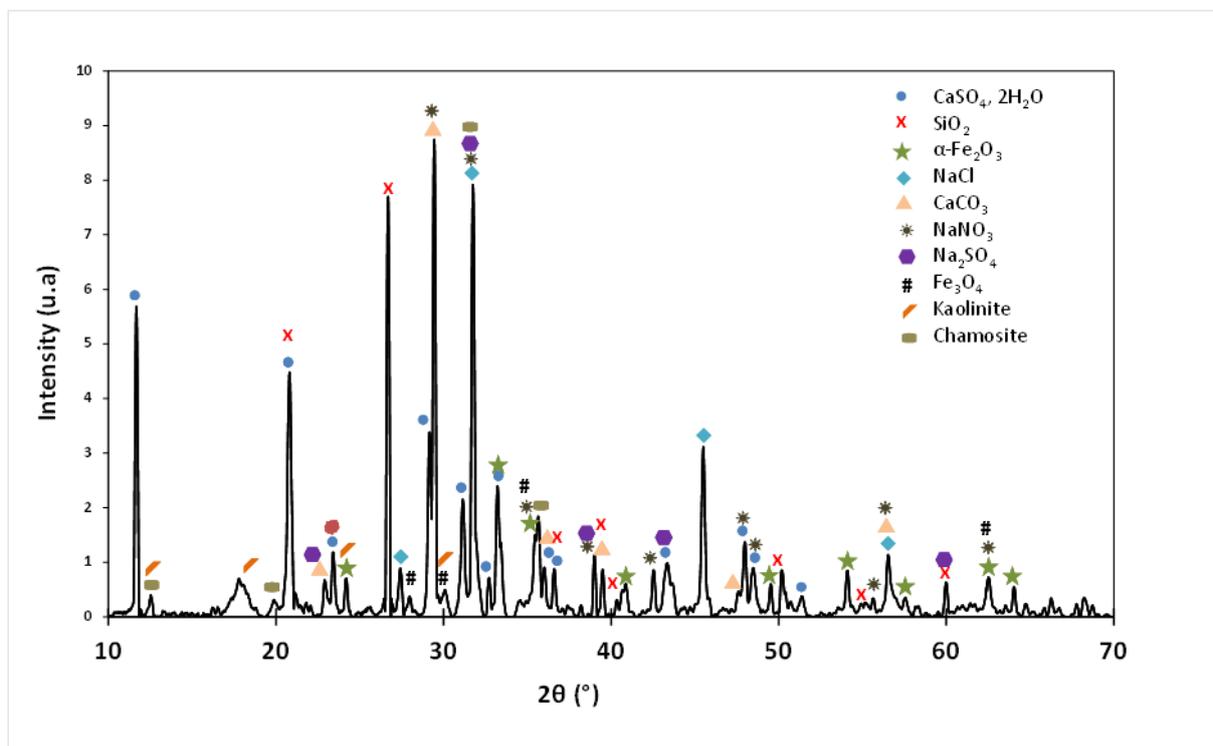
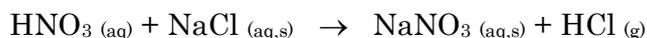


Figure 44 : Diffractogramme de rayons X de l'échantillon de PM_{0,3-2,5} collecté à Dunkerque

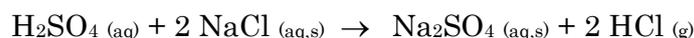
En premier lieu pour les phases contenant le calcium, le carbonate de calcium CaCO_3 est un composé ayant une origine essentiellement crustale et se retrouverait dans les particules atmosphériques suite à une remise en suspension des particules de sol. Il peut être précisé que la zone littorale de notre région est caractérisée par la présence de sols riches en carbonate de calcium. Notons également que notre site d'études possède une zone industrielle dans laquelle ce même carbonate de calcium est une matière première utilisée dans l'industrie sidérurgique. L'origine du gypse $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ peut être multiple. Celui-ci peut provenir d'une part de poussières issues de matériaux de construction (Sturges and Harrison, 1989) et d'autre part, il peut être formé dans l'atmosphère à la suite d'une réaction entre la calcite CaCO_3 et l'acide sulfurique ou le dioxyde de soufre SO_2 (Mori et al., 1998).

La détection de chlorure de sodium (NaCl), de thermadite (Na_2SO_4) et de nitratine (NaNO_3) s'explique par la présence de sels marins primaires (NaCl) et anthropisés (Na_2SO_4 , NaNO_3) dans les particules atmosphériques. Il est connu que les sels marins primaires tendent à réagir avec des micro-goutellettes contenant des espèces acides telles HNO_3 ou H_2SO_4 , en particulier lors de mélanges de masses d'air d'origine marine avec d'autres enrichies en composés d'origine anthropique, comme les oxydes d'azote NO_x ou le

dioxyde de soufre SO₂. En effet, les oxydes d'azote NO_x, présents en concentration relativement élevée dans les agglomérations notamment en raison des émissions liées au trafic routier peuvent se transformer en acides nitreux et nitrique pour donner après réaction avec NaCl, le composé NaNO₃ :



Selon un mécanisme assez similaire, l'oxydation de SO₂, essentiellement d'origine industrielle, et la condensation de vapeurs de H₂SO₄ sur des sels marins conduisent à la formation de Na₂SO₄.



Deux oxydes de fer ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ et Fe₃O₄) ont été détectés dans les PM_{0,3-2,5}. Le premier correspond à l'hématite $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$, qui est la phase cristalline d'oxyde de Fe la plus fréquemment rencontrée dans des échantillons de particules atmosphériques (Querol et al., 1996). Il s'agit d'un composé qui est d'une part rencontré à l'état naturel dans des sols ferrugineux et d'autre part présent dans des émissions anthropiques provenant de l'usure de pièces métalliques comme les freins des véhicules (Gietl et al., 2010)(Gietl et al., 2010), dans des cendres (Winburn et al., 2000) ou encore dans des particules d'origine sidérurgique (Hleis et al., 2013). La magnétite Fe₃O₄ correspond à une forme partiellement réduite de l'oxyde de fer (présence de Fe(II) et Fe(III)) et présente essentiellement une origine anthropique. En particulier, il a été montré dans une étude antérieure menée au laboratoire sur les caractéristiques des émissions sidérurgiques, la présence de cette phase dans des émissions reliées à des procédés à très haute température, comme les émissions issues de hauts-fourneaux et d'aciérie(Hleis et al., 2013). Cette question sera mieux décrite dans la partie présentant les résultats de microscopie électronique à balayage.

Enfin, trois phases cristallines contenant du silicium ont été mises en évidence : SiO₂, Al₂Si₂O₅(OH)₄ et (Fe₅Al)(AlSi₃)O₁₀(OH)₈. La silice et les aluminosilicates sont des composés majoritaires du sol et la détection de ces phases révèle la présence de particules d'origine crustale mises en suspension dans l'air et se retrouvant dans les PM_{0,3-2,5}. Néanmoins, à notre connaissance, le composé (Fe₅Al)(AlSi₃)O₁₀(OH)₈ n'est pas recensé en tant que phase principale du sol de notre région. En revanche, on ne peut exclure que sa présence s'explique par sa manipulation en tant que matière première utilisée en sidérurgie.

7. Analyse par microscopie électronique à balayage couplée à la microanalyse X (MEB-EDX)

L'échantillon $PM_{0,3-2,5}$ a été examiné en microscopie électronique à balayage de façon à obtenir des informations telles que la taille des différents types de particules, leur morphologie, ou encore leur degré d'agglomération et la manière dont les espèces peuvent être associées au sein de la particule. Les principales observations sont présentées sur la figure 45.

Deux types de particules contenant le sodium ont été mis en évidence, avec dans le premier une association avec l'élément Cl (cliché a) et le second une association avec l'élément S (cliché b). Les particules correspondantes présentent une forme anguleuse de type parallélépipédique ou hexagonale et une taille de l'ordre de 1 à 2 μm . Ces particules correspondent aux sels marins primaires (NaCl) et marins anthropisés (Na_2SO_4). Les clichés c et d montrent la présence de particules sans forme particulière de composition riche en Si (cliché c) ou associant les éléments Si et Al, de même que les éléments Ca et Fe dans des proportions moindres. Ces observations sont compatibles avec la présence de particules crustales riches en SiO_2 et en alumino-silicates. Les clichés e et f correspondent tous deux à des particules riches en Fe, de type oxyde de fer, mais présentent une morphologie très différente. Les particules riches en Fe de forme anguleuse peuvent être attribuées à des particules crustales, de minerais de fer ou encore être reliées à l'usure de pièces métalliques. La présence de particules de forme sphérique est reliée à un mode de formation spécifique faisant appel à un procédé à haute température (Machemer, 2004). Des microsphères et nanosphères se forment lors du refroidissement et de la condensation des émissions dans l'air. La présence de ces particules sur notre site d'études s'explique majoritairement par la proximité de sources d'émissions sidérurgiques (hauts-fourneaux et aciérie) mais une contribution de cendres émises par les foyers domestiques ne peut cependant être exclue. Le cliché g présente des particules de forme anguleuse, compactes et riches en Ca et S. Leur taille varie entre 2 à 5 μm et peuvent être attribuées au gypse $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Enfin, le cliché h montre des particules riches en carbone de taille proche de 100-200 nm liées entre elles pour former des chaînes de particules. Ces particules anthropiques sont caractéristiques de suies. Elles peuvent avoir une origine industrielle mais il est bien connu que le trafic routier utilisant le diesel est un émetteur principal de ce type de particules (Ambrogio et al., 2002).

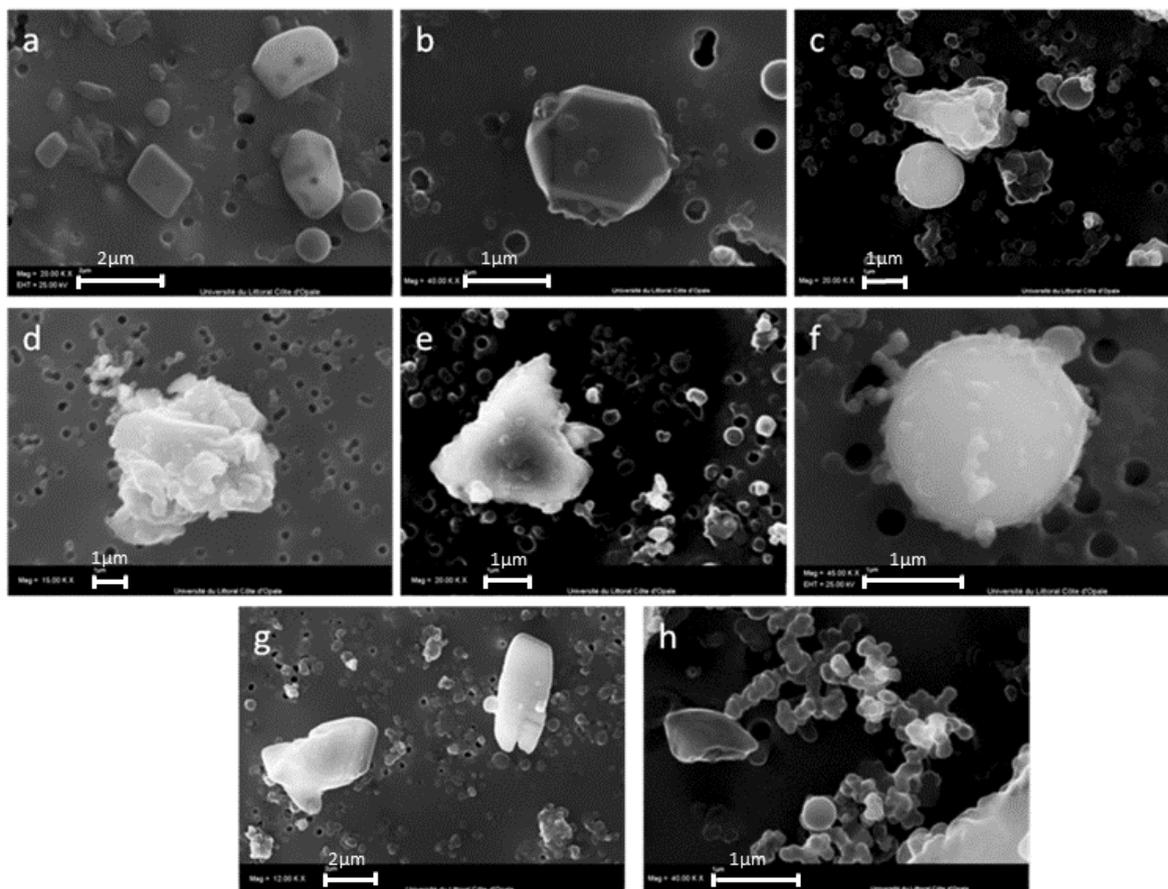


Figure 45 : Images de microscopie électronique à balayage des particules $PM_{0,3-2,5}$ collectées à Dunkerque
Images a et b : particules riches en Na associées avec l'élément Cl (image a) et S (image b) ; images c et d : particules riches en Si ; images e et f : particules riches en Fe ; image g : particules riches en Ca et S ; image h : particules riches en C

L'analyse des éléments majeurs, traces métalliques et des espèces ioniques a montré que les particules renfermaient de nombreux éléments associés à des émissions d'origine naturelle (poussières de sol, sels marins) et anthropique (émissions industrielles d'origine sidérurgique, influence du trafic routier, combustion de fioul lourd). L'influence de sources de combustion a été explorée plus finement par l'analyse des composés organiques (HAPs, n-alcanes, dioxines, furanes et PCB) et a permis notamment d'identifier l'impact du trafic routier et de la combustion de biomasses (bois) et d'autres combustibles fossiles (charbon, fioul lourd) sur la composition des particules $PM_{0,3-2,5}$. Les données obtenues sur l'origine des particules ont été confortées suite à l'identification des formes cristallines présentes dans les $PM_{0,3-2,5}$ et l'analyse individuelle des particules par microscopie électronique à balayage.

Afin de mettre en évidence les effets d'une exposition aux particules fines, nous avons choisi de travailler sur l'échantillon moyen annuel en utilisant ce dernier pour exposer des macrophages.

B. OPTIMISATION SUR LES THP1

Une optimisation des conditions d'exposition des cellules aux PM_{2.5} en vue de la production d'EV a été réalisée sur une lignée monocyttaire cancéreuse, les THP1. Il s'agit de se placer dans des conditions d'exposition qui assurent une production d'EV, sans entraîner une réponse toxique importante. Les données issues de cette étape préalable pourront ensuite servir de guide dans la partie de notre travail portant sur les macrophages primaires.

1. Détermination de la cytotoxicité de l'exposition aux PM_{2.5}

Nous avons exposé 900 000 cellules dans des plaques 6 puits, pendant 3 temps d'exposition, 6h, 24h ou 48h, et pour 5 concentrations de PM_{2.5}, 6 µg/mL, 12,5 µg/mL, 25 µg/mL, 50 µg/mL et 100 µg/mL. Le témoin correspond à des THP1 non exposées aux particules.

Nous avons réalisé un test LDH afin de mesurer la cytotoxicité de l'exposition aux PM_{2.5}. Le témoin 100% de mortalité a été obtenu en ajoutant du triton X100 (figure 46).

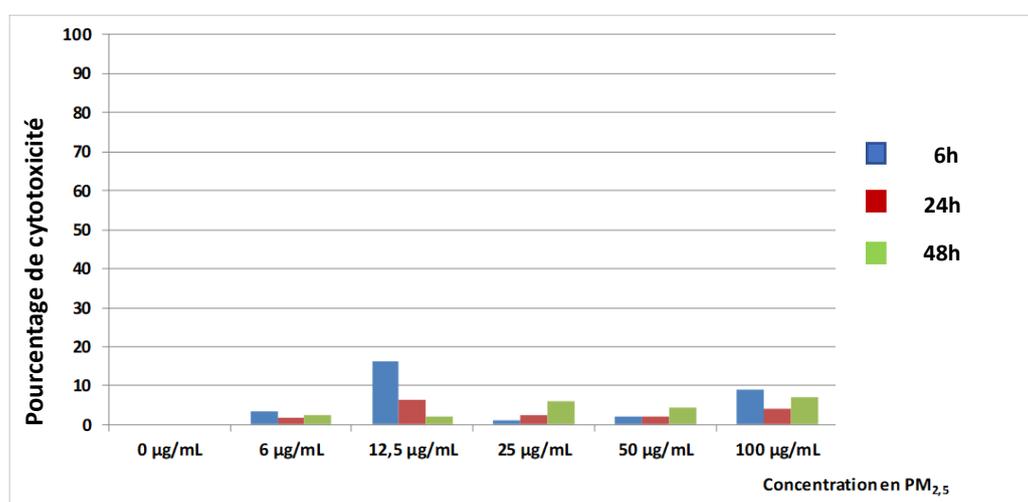


Figure 46 : Mesure de la cytotoxicité suite à l'exposition des THP1 aux PM_{2.5}
Quantification de la cytotoxicité réalisée par dosage LDH

Les résultats montrent qu'il n'y a pas plus de 10% de mortalité cellulaire après exposition aux PM_{2.5}, dans les conditions expérimentales suivies, hormis pour la concentration 12,5 µg/mL à 6 h d'exposition.

Nous avons décidé de travailler avec les 3 durées d'exposition testées ci-dessus, 6 h, 24 h et 48 h, et avons choisi 2 concentrations en PM_{2.5}, 12,5 µg/mL et 50 µg/mL.

2. Exposition des THP1 aux PM_{2.5} pour l'obtention des EV

a) Protocole expérimental

Les THP1 ont été cultivées en flasque de 150 cm² (T150) pendant 6 h, 24 h et 48 h (tableau 14), à raison de 150 millions de cellules par condition (en respectant le ratio surface de culture par volume que nous avons utilisé lors de l'évaluation de la cytotoxicité), afin d'obtenir un nombre suffisant d'EV pour leur caractérisation et la mesure de leurs effets.

En plus de la caractérisation des EV (quantification du nombre d'EV, dosage protéique, analyse de CD63 et CD81, expression des miARN) qui sera menée dans un deuxième temps, l'attention a tout d'abord été portée sur l'évaluation de l'effet de l'exposition des THP1 aux particules, en termes de réponse inflammatoire et au stress oxydant, de même que sur l'expression des miARN.

Les cellules ont été récupérées et culotées afin d'obtenir 5 culots cellulaires correspondants à 5 réplicats biologiques (figure 47).

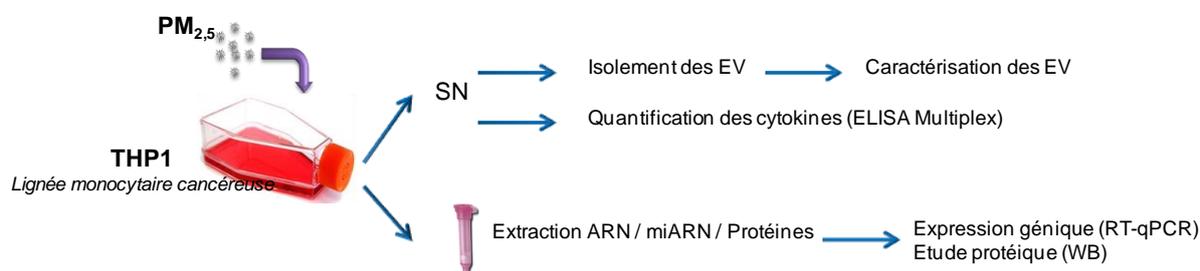


Figure 47 : Protocole expérimental d'exposition des THP1 aux PM_{2.5} et de leurs analyses

Afin de faciliter la lecture et la compréhension des travaux effectués, nous avons adopté une notation abrégée pour chaque échantillon (tableau 14).

Tableau 14 : Notation des échantillons de THP1

	6h	24h	48h
Témoin	T1.6h	T1.24h	T1.48h
	T2.6h	T2.24h	T2.48h
	T3.6h	T3.24h	T3.48h
	T4.6h	T4.24h	T4.48h
	T5.6h	T5.24h	T5.48h
12,5 µg/ml de PM_{2,5}	[12,5]1.6h	[12,5]1.24h	[12,5]1.48h
	[12,5]2.6h	[12,5]2.24h	[12,5]2.48h
	[12,5]3.6h	[12,5]3.24h	[12,5]3.48h
	[12,5]4.6h	[12,5]4.24h	[12,5]4.48h
	[12,5]5.6h	[12,5]5.24h	[12,5]5.48h
50 µg/ml de PM_{2,5}	[50]1.6h	[50]1.24h	[50]1.48h
	[50]2.6h	[50]2.24h	[50]2.48h
	[50]3.6h	[50]3.24h	[50]3.48h
	[50]4.6h	[50]4.24h	[50]4.48h
	[50]5.6h	[50]5.24h	[50]5.48h

b) Mesure de la réponse inflammatoire

Nous avons tout d'abord quantifié l'expression de gènes codant pour des cytokines inflammatoires. La première étape a été de tester des gènes de référence, parmi lesquels B2M, 18S, ACTB et RPL37A. A l'issue de ces tests et après analyse des résultats, nous avons choisi de travailler avec le couple ACTB et RPL37A, qui se présente comme le plus stable, en fonction des différentes conditions d'exposition. Notons que notre choix est en cohérence avec les travaux de Maess et al. menés sur des THP1 également (Maess et al., 2010).

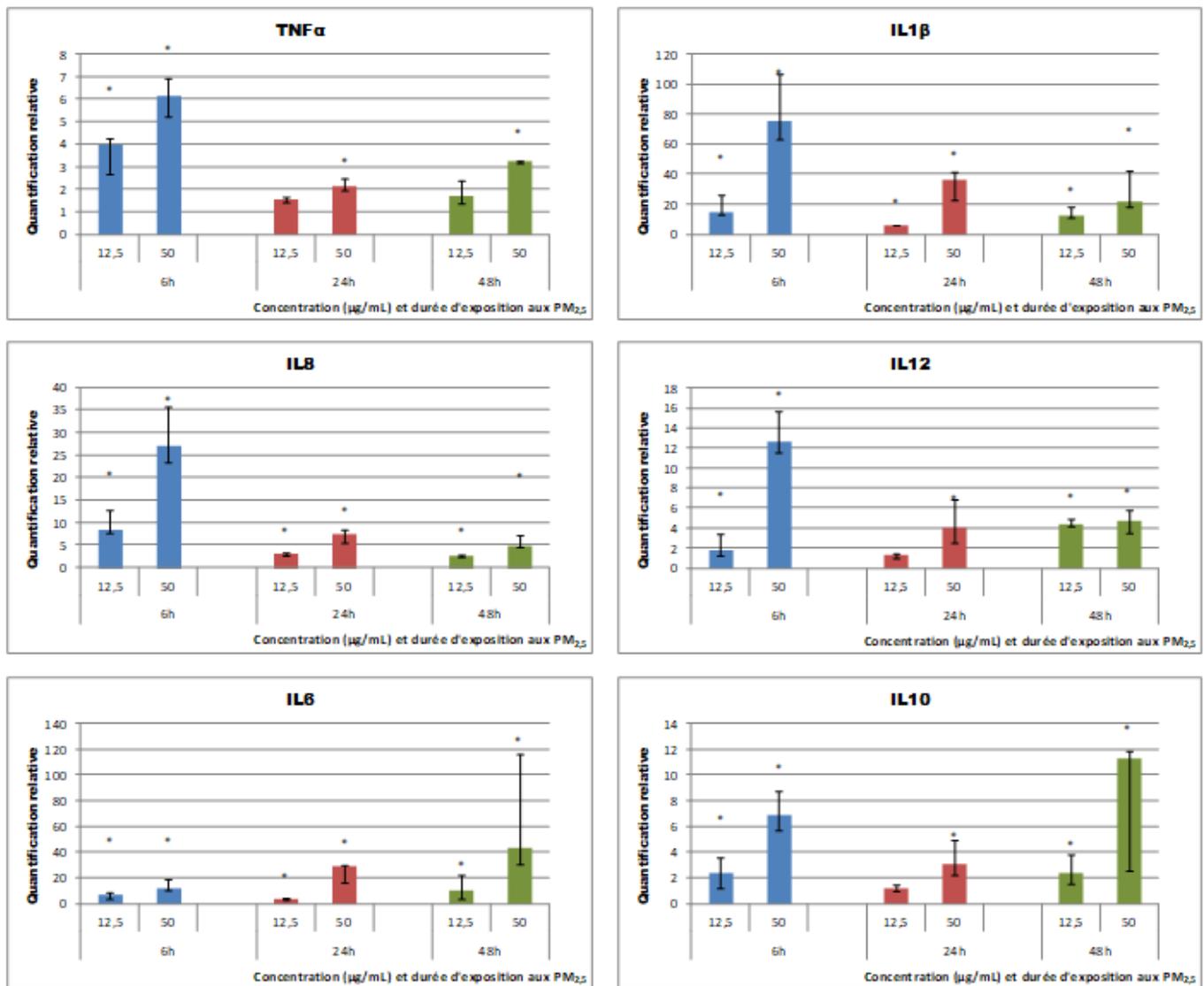


Figure 48 : Mesure de l'expression de gènes de l'inflammation dans les THP1 après exposition aux PM_{2.5} ΔCt normalisé sur l'expression du couple *ACTB/RPL37A*. *significativité $RQ > 2$ ou $RQ < 0,5$

Les résultats montrent une induction significative des transcrits pour le TNF α , l'IL1 β , l'IL6, l'IL8, l'IL10 et l'IL12p40 (figure 48). Nous observons une induction précoce du TNF α , de l'IL1 β , de l'IL8 et de l'IL12p40, plus importante pour la concentration de 50 μ g/mL. Ces 4 gènes sont induits à 6 h, et l'induction, même si elle reste significative, est moins importante après 24 h et 48 h d'exposition.

Concernant l'IL6 et l'IL10, nous observons également une induction précoce, mais qui perdure dans le temps et qui est plus élevée dans le cas d'une exposition à 50 μ g/mL qu'à 12,5 μ g/mL.

Bauer et al ont montré que l'IL8 s'adsorbait sur les particules (Bauer et al., 2012). Avant de réaliser le dosage des cytokines dans les surnageants, nous avons réalisé un témoin PM_{2.5} (25 µg/mL) et IL8 (100 pg/mL) et IL8 seul pendant 6 h, 24 h et 48 h afin d'examiner si l'IL-8 pouvait s'adsorber sur les particules ou subir une altération à leur contact.

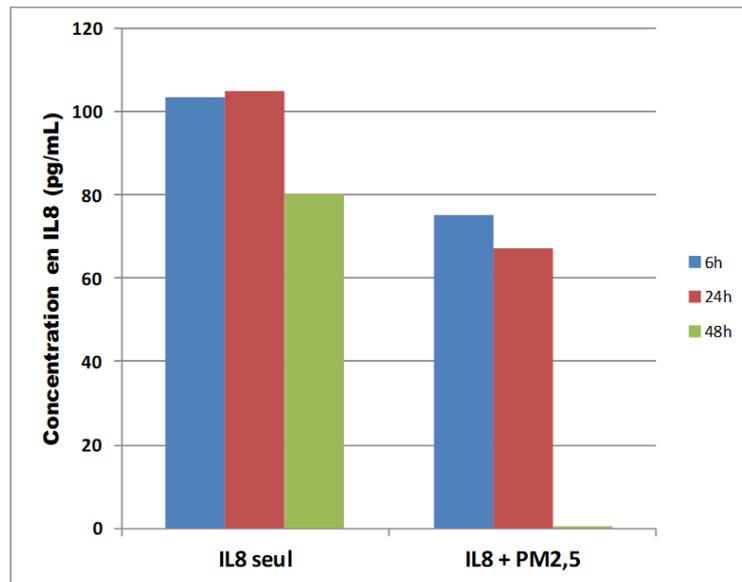


Figure 49 : Dosage de l'IL8 dans du milieu de culture avec ou sans PM_{2.5} pendant 6h, 24h et 48h

En absence de particules, l'IL-8 demeure stable jusqu'à 24 h puis semble subir une dégradation partielle après 48h. En présence de particules, une diminution de la concentration d'IL-8 est observée, dès 6 h, et une quasi-disparition de la protéine est constatée après 48 h. Il peut ainsi être suggéré que l'IL-8 serait adsorbée sur la surface des particules ou subirait une modification par le biais de constituants des particules libérées dans le surnageant ou au contact direct des particules.

Malgré cela, le dosage de la sécrétion d'IL8 par les THP1 après exposition aux PM_{2.5} (figure 50) montre une augmentation importante de la quantité de cette cytokine dans les surnageants de culture, en fonction du temps d'exposition et de la dose en particules. Ce résultat suggère une réponse inflammatoire importante après exposition des THP1 aux PM_{2.5} et il peut être ajouté que la valeur de concentration de cytokines serait très probablement plus élevée encore si ce phénomène d'adsorption/modification des cytokines en présence des particules n'avait pas lieu.

En plus de l'IL8, nous avons réalisé le dosage de 7 autres cytokines dans les surnageants de culture des THP1 (figure 50).

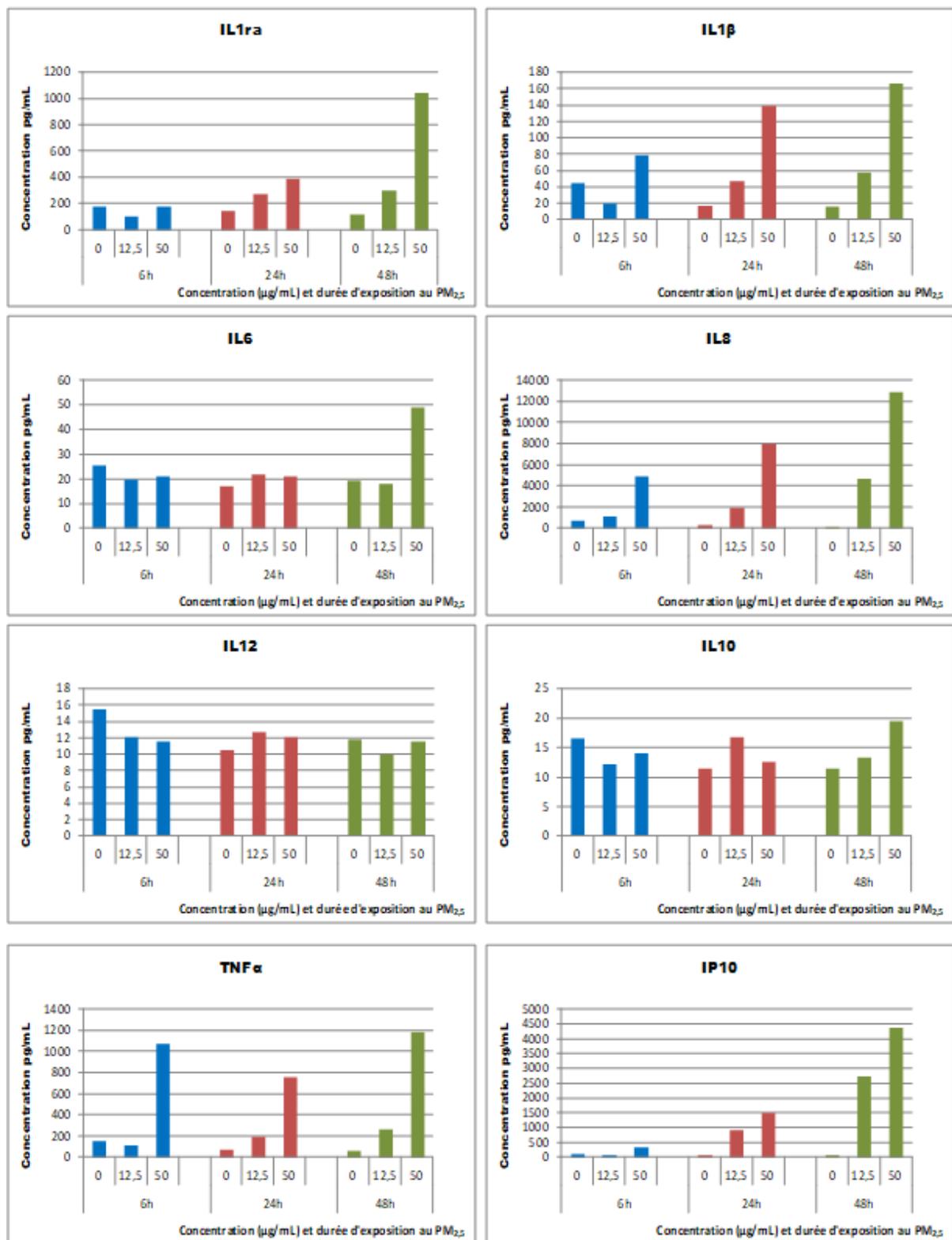


Figure 50 : Dosage des cytokines dans les surnageants de culture des THP1 exposées aux PM_{2.5}
 Dosage réalisé par ELISA Multiplex. Les THP1 ont été exposées pendant 6h, 24h ou 48h à 0μg/mL, 12,5μg/mL et 50μg/mL de PM_{2.5}

Les résultats pour le TNFα, l'IL1β, l'IL1ra, l'IP10 et l'IL8 montrent une augmentation de la sécrétion en fonction de la concentration en PM_{2.5} et le temps d'exposition. Cette

augmentation de la production de cytokines inflammatoires suite à une exposition aux particules fines est en accord avec des études précédentes (Fahy et al., 2002; Kocbach et al., 2008; Xu et al., 2018; Zhang et al., 2018).

Concernant l'IL6, l'IL10 et l'IL12, nous observons une sécrétion de ces cytokines en présence des particules aux 2 concentrations quasiment identique à celle du témoin sans particules, et quel que soit le temps. On relève toutefois des sécrétions d'IL6 et IL10 en augmentation à la concentration la plus élevée (50 µg/mL) et au temps le plus long (48h), par rapport au témoin.

c) *Mesure de la réponse cellulaire au stress oxydant*

En parallèle de la mesure de l'inflammation, nous nous sommes intéressés à la réponse au stress oxydant généré dans les THP1 suite à l'exposition aux PM_{2.5}. Nous avons mesuré différents paramètres, parmi lesquels un gène codant pour des enzymes de métabolisation des xénobiotiques, CYP1B1, des gènes codant pour des enzymes impliquées dans les mécanismes d'oxydoréduction ou l'élimination des radicaux libres, NQO1 et SOD2, et un gène codant pour un facteur de transcription jouant un rôle dans la protection contre le stress oxydant, NRF2.

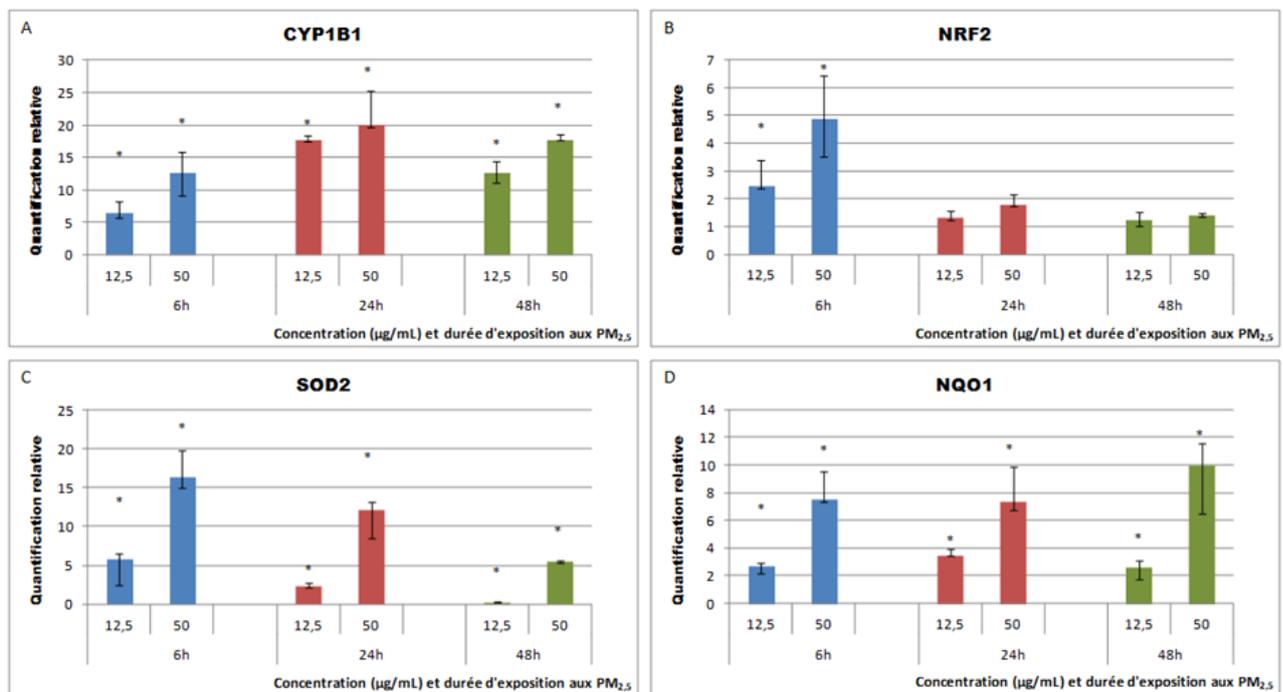


Figure 51 : Mesure de l'expression de gènes impliqués dans la réponse au stress oxydant dans les THP1 après exposition aux PM_{2.5}

Act normalisé sur l'expression du couple *ACTB/RPL37A*. *significativité $RQ > 2$ ou $RQ < 0,5$

Les résultats (figure 51) montrent une induction significative des gènes CYP1B1, SOD2 et NQO1 pour toutes les concentrations et tous les temps d'exposition. En revanche, l'induction de NRF2 est significative uniquement après 6h d'exposition.

Ces résultats sont en accord avec la littérature. En effet, il est connu qu'une exposition aux PM_{2.5} induit une inflammation importante, un stress oxydant et entraîne également la mise en place d'une réaction de métabolisation des xénobiotiques afin d'éliminer les constituants des PM_{2.5} (Liu et al., 2018a; Park et al., 2011).

Si l'on se penche sur les différentes conditions d'exposition (durée et dose), nous pouvons observer une induction précoce de ces différents gènes, montrant la mise en place d'une réponse cellulaire (inflammation, induction de gènes impliqués dans le stress oxydant et métabolisation des xénobiotiques) rapidement après l'exposition. Pour CYP1B1 ou NQO1, l'induction de l'expression génique reste importante même après 24h ou 48h d'exposition aux PM_{2.5}.

Les travaux ont été poursuivis par l'analyse protéique par western blot de NRF2 et de CYP1B1, afin de savoir si les modifications observées sur les ARNm étaient retrouvées dans la production des protéines.

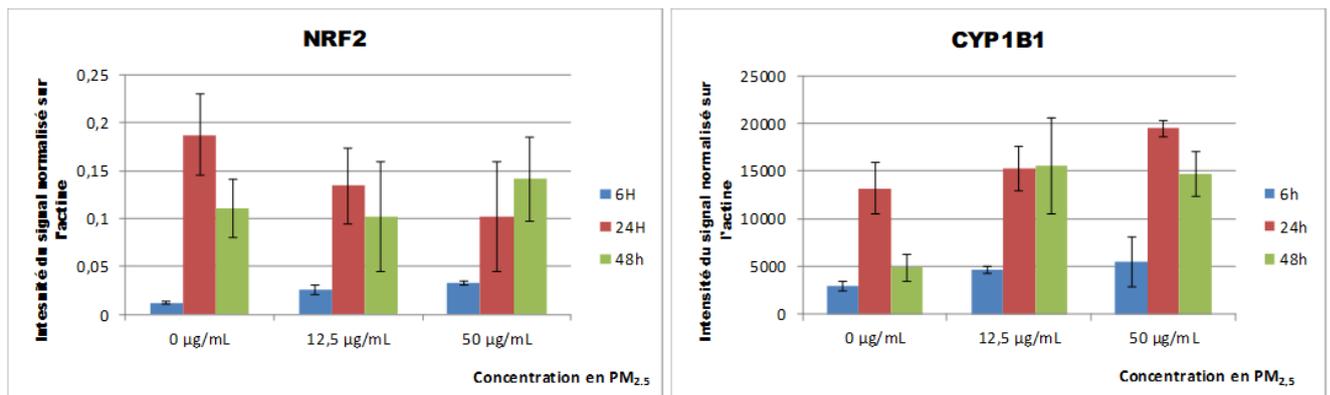


Figure 52 : Quantification de NRF2 et CYP1B1 dans les THP1 après exposition aux PM_{2.5}
 Quantification réalisée par western blot, rapportée sur la quantité d'actine
 Test U de Mann-Whitney, significativité $p < 0.05$

NRF2

$p < 0.05$: 6h : T vs 12,5µg/mL, T vs 50µg/mL, et 48h : T vs 12,5µg/mL, T vs 50µg/mL, 12,5µg/mL vs 50 µg/mL

CYP1B1

$p < 0.05$: 6h : T vs 12,5µg/mL, T vs 50µg/mL, 12,5µg/mL vs 50 µg/mL et 48h : T vs 12,5µg/mL, T vs 50µg/mL

Pour les deux protéines, la quantification a été rapportée sur les valeurs obtenues pour l'actine. Le résultat montre une augmentation significative de la protéine NRF2, par rapport au témoin, en fonction de la concentration en PM_{2.5} après 6h d'exposition et après 48h d'exposition, mais uniquement à la concentration de 50µg/mL. Ce résultat est corrélé

avec celui obtenu par qPCR et apparait en bon accord avec les observations de Deng et al. qui ont montré que NRF2 était activé de façon précoce après exposition aux particules fines (Deng et al., 2013b). A l'inverse, après 24h d'exposition aux PM, la quantité de NRF2 diminue.

Concernant CYP1B1, les résultats montrent une augmentation de la quantité de cette protéine en fonction du temps d'exposition et de la dose en PM_{2.5}, résultat pouvant à nouveau être corrélé à celui obtenu lors de la mesure de l'expression génique.

a) Expression des miARN dans les THP1

Il a été montré qu'une exposition aux PM_{2.5} modifiait l'expression des miARN dans les cellules exposées aux particules fines (Bollati et al., 2014; Pergoli et al., 2017; Rodosthenous et al., 2016). C'est pourquoi nous avons continué nos analyses en quantifiant le niveau de miARN dans les cellules. Après analyse de données bibliographique, nous avons choisi de travailler sur 12 miARN : let-7a, let-7g, miR-19a, miR-21, miR-27a, miR-29a, miR-29b.1, miR-125, miR-128, miR-146a, miR-222 et miR-223. La sélection de ces miARN a porté sur le fait que leur expression était modifiée dans certaines maladies pulmonaires ou après exposition aux PM_{2.5} (Annexe III).

Le but de notre analyse était à la fois d'observer les effets de l'exposition aux PM_{2.5} sur l'expression des miARN dans les THP1, mais aussi dans un second temps d'observer si ces modifications étaient retrouvées dans les EV libérées par les cellules. Ce type d'analyse requiert de disposer de miARN de référence appropriés. Dans le cadre de ce travail, nous avons retenu RNU48 comme référence (Gee et al., 2011; Masè et al., 2017).

Plusieurs profils se dégagent des résultats (figure 53).

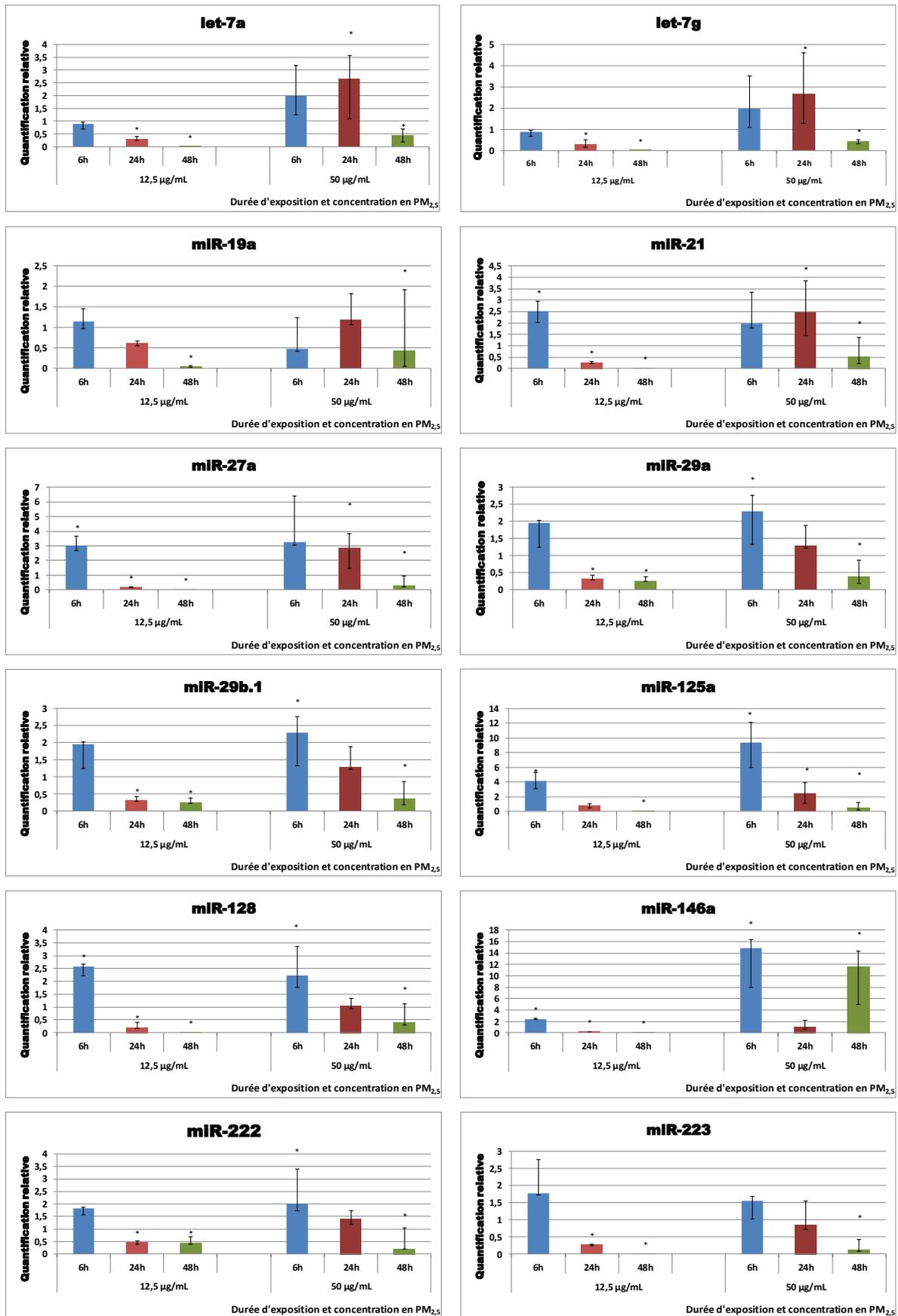


Figure 53 : Analyse des niveaux de miARN dans les THP1 après exposition aux PM_{2,5}
 Quantification relative normalisée sur l'expression de *RNU48*. *significativité $RQ > 2$ ou $RQ < 0,5$

Tout d'abord, nous observons une diminution de l'expression de let-7a, let-7g, miR-19a et miR-21, en fonction du temps après exposition à 12,5 µg/mL de PM_{2.5}, une augmentation après 6h et 24h d'exposition suivie d'une diminution après 48h lorsque les THP1 ont été exposés à 50 µg/mL de PM_{2.5}.

Les résultats montrent aussi une diminution de l'expression de miR-27a, miR-29a, miR-29b.1, miR-125a, miR-128, miR-222 et miR-223, dépendante du temps d'exposition et de la concentration en PM_{2.5}.

Enfin, nous observons une augmentation de l'expression de miR-146a après 6h et 48h d'exposition pour la concentration la plus forte (50µg/mL).

Certains des résultats obtenus sur les miARN sont inattendus. Nous avons testé des miARN avec des effets différents, voire opposés. Certains régulent des oncogènes et agissent comme des suppresseurs de tumeurs, comme let-7g (WANG et al., 2012), et dans notre cas, une diminution de l'expression de let-7g est observée par exemple pour la concentration de 12,5µg/mL de PM_{2.5} aux trois temps. En revanche, certains autres miARN régulent des suppresseurs de tumeurs et vont agir comme des oncogènes, comme miR-21 (Krichevsky and Gabriely, 2009). Ils sont alors appelés OncomiR. La diminution de miR-21 observée dans notre cas pour la concentration de 12,5µg/mL de PM_{2.5} n'était pas attendue. La littérature montre le plus souvent que l'expression de ce miARN tend à être augmentée après exposition aux PM_{2.5} (Dai et al., 2017).

3. Analyse des EV libérées par les THP1 en réponse à l'exposition aux PM_{2.5}

L'un des objectifs de ces travaux de thèse était d'observer l'effet d'une exposition aux particules fines sur les EV libérées en réponse. Pour cela, nous avons isolé les EV du milieu de culture des THP1. Après les avoir quantifiées, nous avons analysé deux marqueurs protéiques retrouvés à la surface des EV : CD63 et CD81. Enfin, nous avons quantifié des miARN, dans le but d'observer si les modifications d'expression des miARN retrouvées dans les macrophages étaient transmises dans les EV, mais également de savoir si le profil en miARN était différent entre les EV libérées suite à l'exposition et celles libérées spontanément par les THP1.

a) *Notation des échantillons des EV de THP1*

Nous avons obtenu 9 échantillons, correspondant aux 9 conditions d'exposition (tableau 15).

Tableau 15 : Notation des échantillons de THP1

	6h	24h	48h
Témoin	T.6h	T.24h	T.48h
12,5µg/ml	[12,5].6h	[12,5].24h	[12,5].48h
50µg/ml	[50].6h	[50].24h	[50].48h

b) *Microscopie électronique des EV de THP1*

Nous avons observé par microscopie électronique la présence d'EV dans les surnageants de culture de THP1. Cette observation montre une population relativement homogène au niveau de la morphologie et de la taille (figure 54).

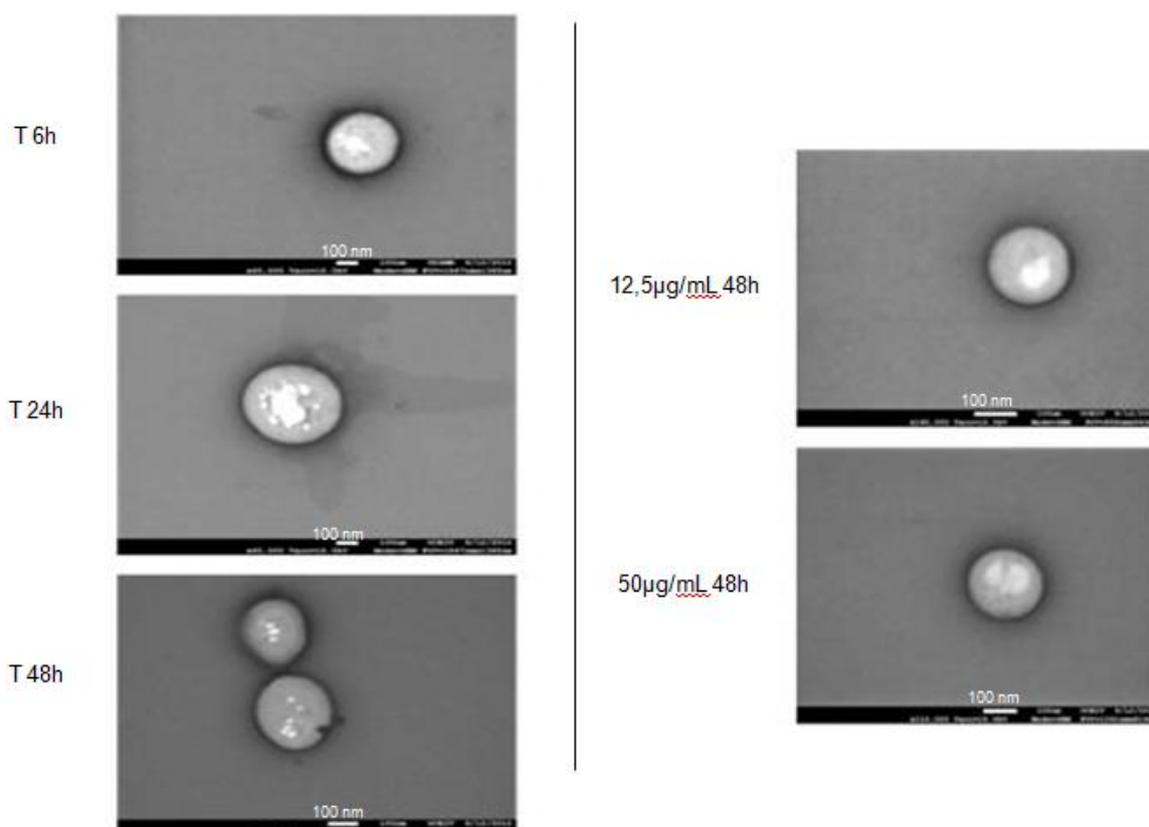


Figure 54 : Images de microscopie électronique à balayage des EV libérées par les THP1
Les « T » correspondent aux THP1 non exposées (0 µg /mL) aux 3 temps d'exposition (6h, 24h et 48h)

c) Dosage des EV de THP1

La taille et la quantité des EV ont également été analysées par une technique de suivi individuel (figure 55 et tableau 16).

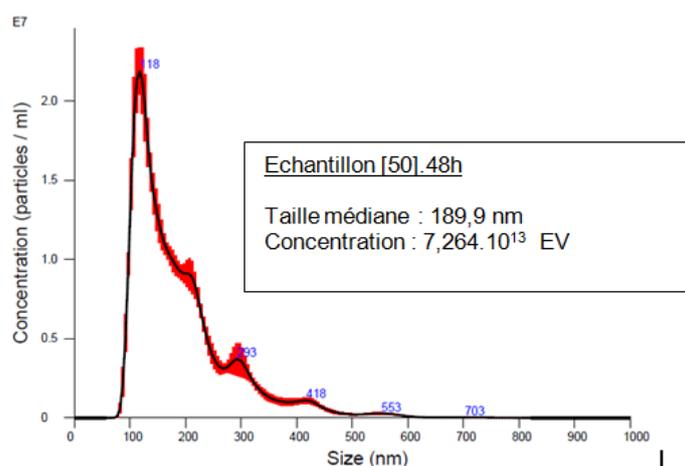


Figure 55 : Quantification de l'échantillon d'EV [50].48h par Nanoparticle Tracking Analysis
Graphique représentatif d'une analyse individuelle de particules réalisée au Nanosight®

Tableau 16 : Quantification des échantillons d'EV libérées par les THP1 suite à l'exposition aux PM_{2.5}
Analyse individuelle de particules réalisée au Nanosight®

Echantillon	Taille moyenne des EV (nm)	Nombre d'EV par échantillon	Nombre de cellules (THP1) exposées aux PM _{2.5}	Nombre d'EV libérées par cellules
T.6h	149,8 +/- 2,5	0,135 x 10 ¹³	2,626 x 10 ⁸	5 140
[12,5].6h	149,2 +/- 2,5	1,054 x 10 ¹³	2,598 x 10 ⁸	40 572
[50].6h	142,3 +/- 4,5	1,029 x 10 ¹³	2,526 x 10 ⁸	40 728
T.24h	186,6 +/- 3,4	1,824 x 10 ¹³	2,746 x 10 ⁸	66 423
[12,5].24h	185,7 +/- 3,8	2,288 x 10 ¹³	2,536 x 10 ⁸	90 220
[50].24h	139,3 +/- 2,4	3,440 x 10 ¹³	1,520 x 10 ⁸	226 315
T.48h	193,8 +/- 2,4	2,064 x 10 ¹³	3,965 x 10 ⁸	52 055
[12,5].48h	188,4 +/- 2,0	6,045 x 10 ¹³	2,511 x 10 ⁸	240 740
[50].48h	189,9 +/- 1,8	7,264 x 10 ¹³	2,471 x 10 ⁸	293 970

L'analyse au Nanosight® montre que les EV ont un diamètre moyen allant de 139 nm à 193 nm (tableau 16). Les mesures révèlent aussi que les vésicules obtenues après 6h présentent une taille comprises entre 140 et 150 nm, alors que celles produites à partir de 24h, présentent une taille supérieure comprise entre 185 et 190 nm (à l'exception de l'échantillon [50].24h) Les épaulements observés sur le profil granulométrique de

l'échantillon d'EV [50].48h montré en exemple (figure 55) correspondent à des multiples de la taille moyenne minimale observée, suggérant la formation d'agrégats d'EV. Il est possible également que le stimulus provoqué par l'exposition aux particules, entraîne la libération d'EV de tailles différentes, comme montré dans des études précédentes (Bonzini et al., 2017; Pergoli et al., 2017).

Puis, nous avons calculé le nombre d'EV libérées par cellule en réponse à l'exposition aux PM_{2.5}. Les résultats obtenus montrent une augmentation du nombre d'EV en fonction du temps d'exposition et de la concentration en PM_{2.5} (figure 56). Ce type de résultat a déjà été montré par Bonzini et al dans le sang de 51 volontaires exposés aux PM_{2.5} et par Pergoli et al lors de leurs travaux sur les EV libérées par des macrophages et des plaquettes en réponse à l'exposition aux PM_{2.5} (Bonzini et al., 2017; Pergoli et al., 2017).

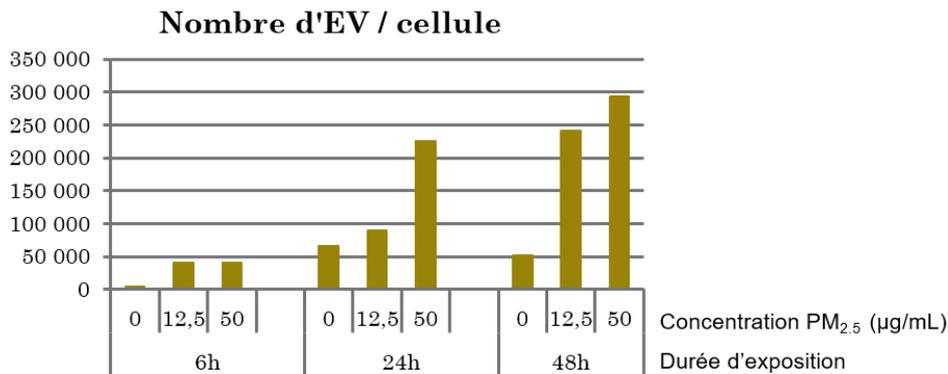


Figure 56 : Nombre d'EV libérées par cellule après exposition des THP1 aux PM_{2.5}
Quantification réalisée après dosage des EV au Nanosight® et quantification du nombre de cellules exposées au Cellometer®

Cette analyse nous donne différentes informations. Tout d'abord, les cellules libèrent plus d'EV en réponse à l'exposition aux PM_{2.5}, même après un court temps d'exposition comme 6h. Ensuite, nous observons une libération croissante des EV par les THP1 avec une dose croissante de PM_{2.5}. Cela montre que l'exposition aux particules déclenche une libération des EV dépendante de la dose et du temps d'exposition.

De manière à compléter l'analyse des EV, deux marqueurs protéiques CD63 et CD81, marqueurs spécifiques des exosomes (chapitre I.E.1.) (Kowal et al., 2014) ont été analysés par western blot.

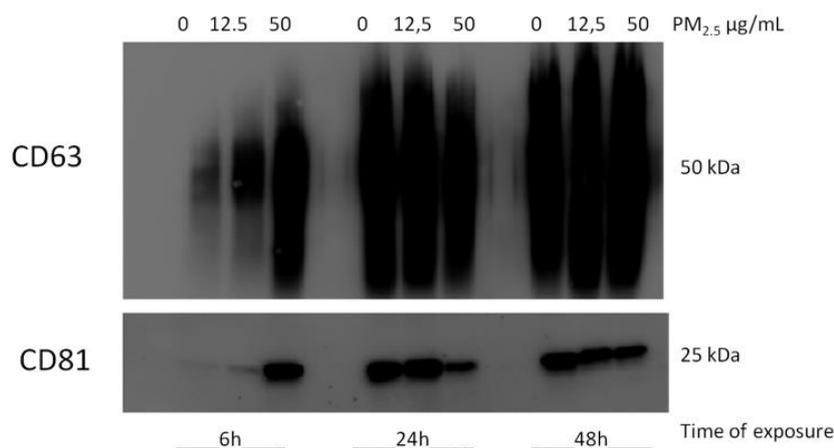


Figure 57 : Analyse protéique de CD63 et CD81 dans les EV de THP1 après exposition aux PM_{2.5}
Analyse réalisée par Western Blot

Le résultat (figure 57) semble montrer une augmentation de la quantité de ces marqueurs en fonction du temps d'exposition et de la concentration en PM_{2.5}, à l'exception de l'échantillon [50].24h, qui semble contenir moins de CD63 et CD81 que les deux autres échantillons d'EV libérées après 48h d'exposition.

A l'exception de l'échantillon [50].24h, l'analyse par western blot rejoint la quantification au Nanosight® et traduirait une augmentation du nombre d'EV suite à l'exposition des THP1 aux PM_{2.5}.

Ces différentes analyses permettent de confirmer que l'exposition aux PM_{2.5} entraîne une libération plus importante d'EV, croissante avec l'augmentation de la concentration en PM_{2.5} et la durée d'exposition.

d) *Quantification des miARN dans les EV de THP1*

Tout d'abord la concentration en miARN a été quantifiée par Bioanalyzer®. Les résultats obtenus montrent une modification de la concentration en miARN après exposition aux PM_{2.5} (tableau 17).

Tableau 17 : Concentration en miARN dans les EV de THP1 après exposition aux PM_{2.5}
Dosage réalisé par Bioanalyzer®

Échantillon	Concentration en miARN (pg/μl)
T.6h	1 589,50
[12,5].6h	4 131,20
[50].6h	1 334,70
T.24h	210,60
[12,5].24h	2079,20
[50].24h	381,00
T.48h	2687,10
[12,5].48h	499,1
[50].48h	51,60

Après 6h d'exposition, nous observons une augmentation de la concentration en miARN dans les échantillons exposés à 12,5 μg/mL de particules. En revanche, la concentration entre les miARN des EV libérées par des cellules témoin et par les cellules exposées à 50 μg/mL de PM_{2.5} semble être légèrement diminuée. Après 24h d'exposition, nous observons toujours une augmentation importante de la quantité de miARN après exposition à 12,5 μg/mL de PM_{2.5}. La concentration en miARN dans les EV de cellules exposées à 50 μg/mL de particules est augmentée également par rapport à celle retrouvée dans les EV témoin, cependant elle est bien moindre qu'après exposition à 12,5 μg/mL de PM_{2.5}. Enfin, nos résultats montrent une diminution importante de la concentration en miARN dans les EV libérées après 48h d'exposition, dépendamment de la concentration en PM_{2.5}.

Les analyses ont ensuite été poursuivies par la quantification des miARN par qPCR (figure 58). Il n'existe actuellement pas de miARN de référence dans les EV. Nous avons déterminé par analyses statistiques miR-16 comme meilleur candidat, celui-ci ayant de plus déjà été utilisé comme miARN de référence pour la quantification des niveaux de miARN dans les EV (Masè et al., 2017), notamment lors d'une étude précédente menée au laboratoire (Héliot et al., 2017) (Cf Matériels et Méthodes, Analyses statistiques).

Nous avons testé 16 miARN dans les EV de THP1 après exposition aux PM_{2.5} : let-7a, let-7g, miR-19a, miR-21, miR27a, miR-29a, miR-29b.1, miR-125, miR-128, miR-146a, miR-155, miR-193, miR-200c, miR-222, miR-223 et miR-421. La figure 61 présente les résultats pour 3 des 16 miARN : let-7a, miR-21 et miR-146a. Les résultats obtenus montrent un profil identique pour tous les miARN (annexe IV). Nous observons une augmentation des niveaux après 6h d'exposition, une diminution après 24 h d'exposition et pour finir une

nouvelle augmentation des 3 miARN après 48 h d'exposition pour la concentration 12,5 µg/mL et une diminution après 48h d'exposition pour la concentration 50 µg/mL.

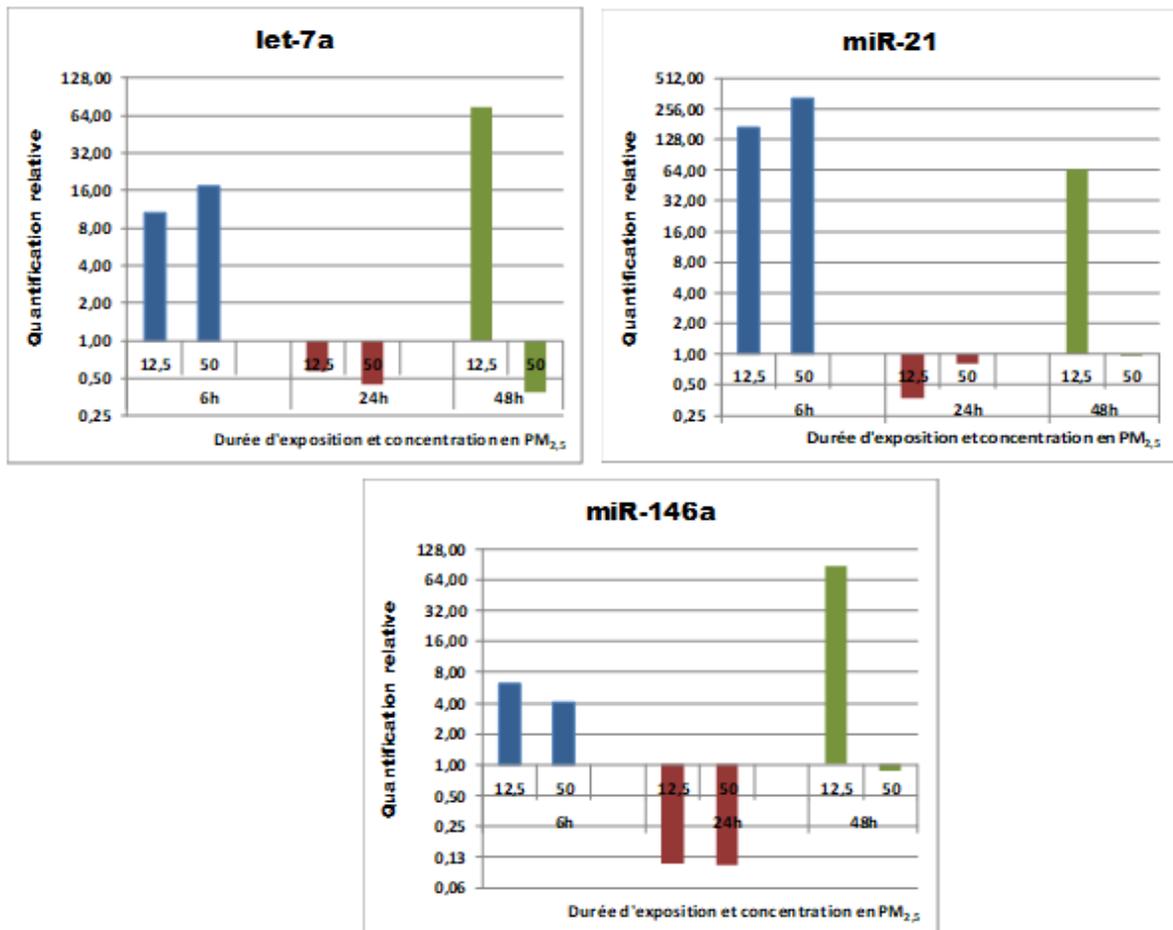


Figure 58 : Analyse des niveaux de let-7a, miR-21 et miR-146a dans les EV libérées par les THP1 après exposition aux PM_{2.5}

Quantification relative normalisée sur la quantité de miR-16.

A : let-7a ; B : miR-21 ; C : miR-146a

Ces résultats sont différents des résultats obtenus pour les miARN dans les THP1 (figure 53). Il y a donc une différence entre l'expression des miARN dans les cellules et celle dans les EV libérées par ces cellules.

Cette partie de l'étude a permis de montrer que l'exposition des macrophages aux PM_{2.5} entraîne une libération plus importante d'EV et que les EV libérées voient leur profil en miARN modifié en fonction du temps et de la dose en PM_{2.5}.

Cette phase d'optimisation a mis en évidence qu'une exposition des THP1 aux PM_{2.5} entraînait une inflammation précoce et importante, l'activation de gènes impliqués dans

le stress oxydant ainsi qu'une libération plus importante d'EV par les cellules. Ce travail nous a également permis de déterminer les conditions expérimentales et d'optimiser les protocoles que nous utiliserons pour la suite des travaux, sur les macrophages primaires, isolés à partir de poches de sang.

C. EXPOSITION DES MACROPHAGES AUX PM_{2.5}

Nous avons poursuivi en travaillant cette fois sur des macrophages primaires, isolés à partir de poches de sang de 6 donneurs anonymes. Nous avons dans un premier temps étudié l'effet des PM_{2.5} sur la morphologie des macrophages primaires. Puis nous avons poursuivi par la mesure du stress oxydant, de l'inflammation ou encore de l'expression des miARN. Nous nous sommes ensuite intéressés à l'effet de l'exposition sur la polarisation des macrophages et nous avons caractérisé les EV libérées par les macrophages en réponse à l'exposition aux PM_{2.5}.

1. Effet des PM_{2.5} sur la morphologie des macrophages primaires

Dans un premier temps, nous avons étudié l'effet des PM_{2.5} sur la morphologie des macrophages primaires. Pour cela, nous avons analysé la population cellulaire par cytométrie en flux.

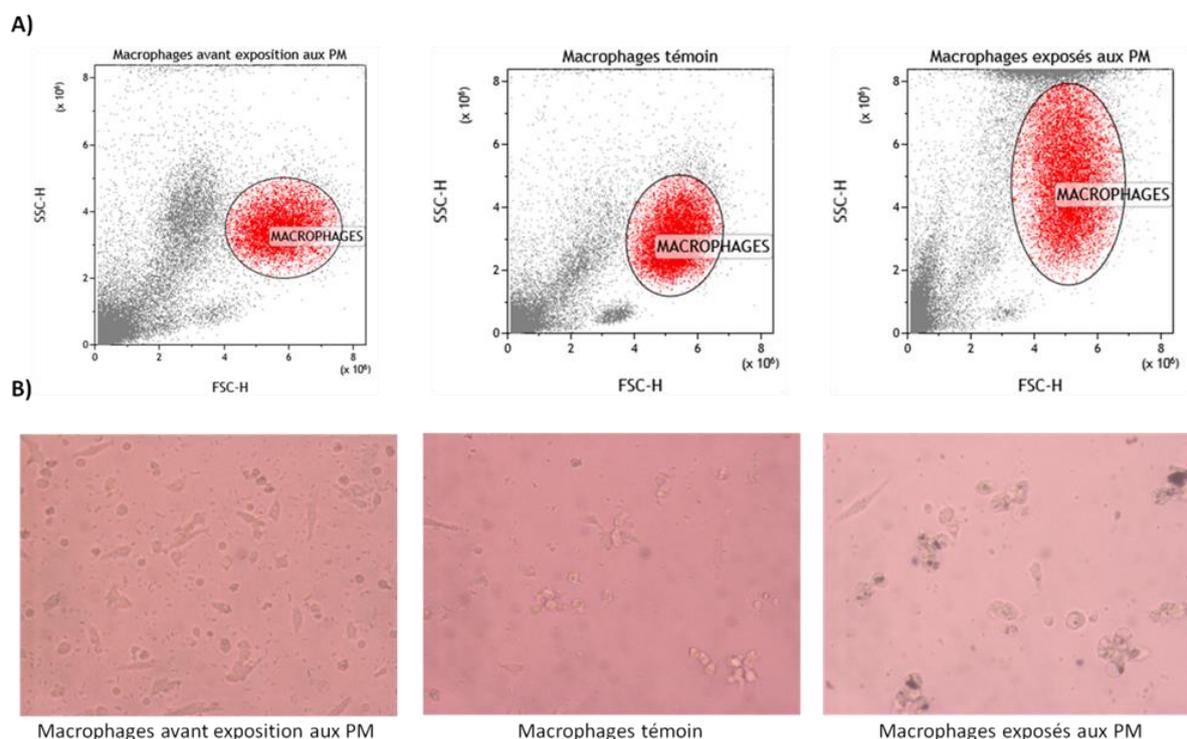


Figure 59 : Morphologie des macrophages primaires avant et après exposition aux $PM_{2.5}$.
Les macrophages ont été étudiés pour leur morphologie avant et après exposition aux $PM_{2.5}$ pendant 48h. Les macrophages n'ayant pas été exposés sont les témoins. Analyse en cytométrie en flux de la taille (FSC-H) et de la granulosité (SSC-H) des macrophages. B) Images de microscopie optique (grossissement x20) des macrophages exposés ou non (témoin), ou avant exposition aux $PM_{2.5}$. Caractérisation par CFM et microscopie réalisée sur les macrophages isolés à partir d'1 poche de sang test.

D'après la figure 59, nous observons que l'exposition des macrophages primaires aux $PM_{2.5}$ entraîne une augmentation de leur granulosité, en comparaison avec les macrophages non exposés (témoin), qui ont une granulosité qui reste équivalente à celles des macrophages avant exposition. L'exposition aux $PM_{2.5}$ entraîne l'apparition d'une population hétérogène, comprenant des macrophages plus différenciés, qui ont phagocyté les $PM_{2.5}$, entraînant la formation de granules, comme cela a déjà été montré dans une étude précédente (Gawda et al., 2018).

2. Quantification de la mort cellulaire après exposition des macrophages primaires aux $PM_{2.5}$

Nous avons réalisé un test LDH sur les surnageants d'exposition des macrophages primaires aux $PM_{2.5}$, ceci dans le but de connaître l'effet des particules en termes de cytotoxicité (figure 60).

Nos résultats montrent une mortalité cellulaire peu différente que les cellules aient été exposées pendant 48h aux PM_{2.5} ou non. Ce résultat révèle que cette concentration de particules n'occasionne pas de mortalité additionnelle des macrophages.

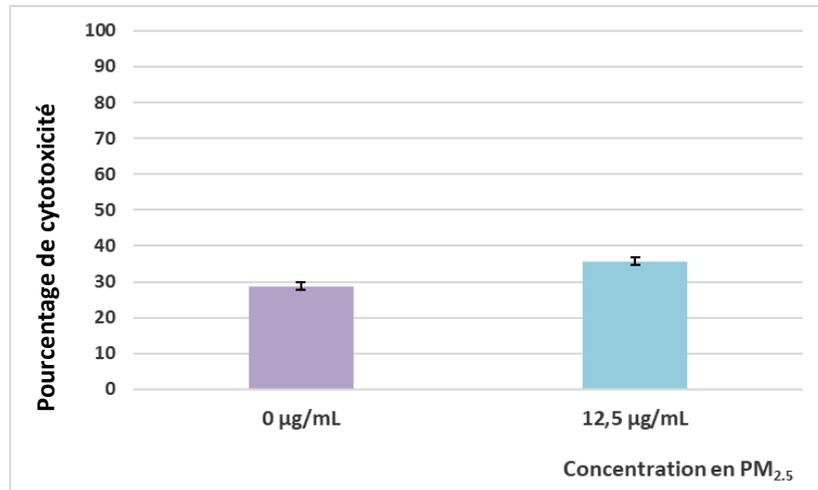


Figure 60 : Mesure de la viabilité cellulaire dans les macrophages primaires après exposition aux PM_{2.5}
Quantification de la cytotoxicité réalisée par dosage LDH dans les surnageants de culture des macrophages isolés de poches de sang de 6 sujets
*Test de Mann-Whitney * significativité : $p \leq 0.05$*

3. Mesure de la réponse des macrophages au stress oxydant

Comme nous l'avons vu précédemment, l'exposition aux PM_{2.5} est connue pour entraîner une inflammation couplée au stress oxydant dans les cellules exposées. Après avoir exposé les macrophages primaires pendant 48h à 12,5 µg/mL, nous avons mesuré l'expression de 3 gènes impliqués dans la réponse au stress oxydant : CYP1B1, NRF2 et SOD2 (figure 61).

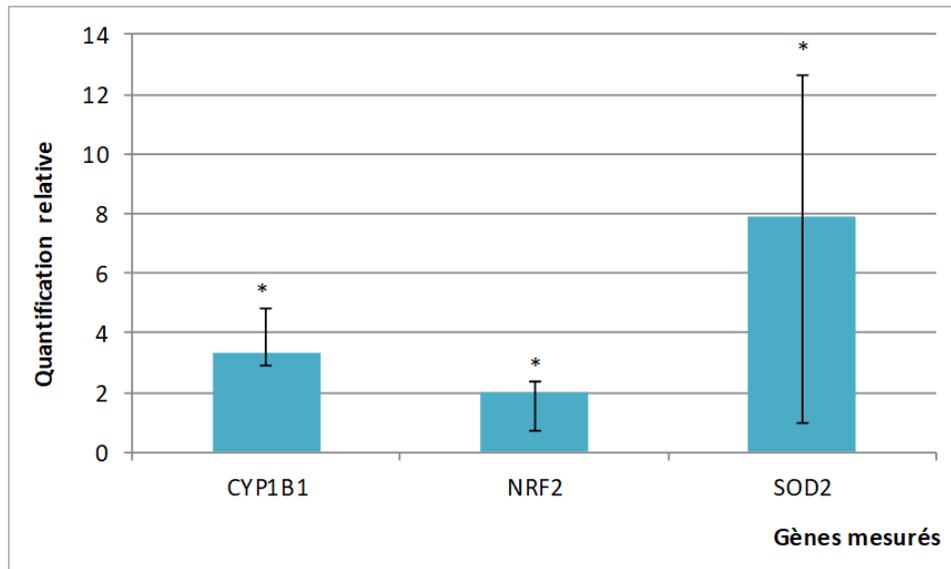


Figure 61 : Expression génique de CYP1B1, NRF2 et SOD2 dans les macrophages exposés pendant 48h aux $PM_{2.5}$
 ΔCt normalisé sur l'expression du 18S. *significativité $RQ > 2$ ou $RQ < 0,5$
 Rapporté sur la valeur du témoin non exposé, normalisé à 1
 Les expositions ont été réalisées sur les macrophages isolés à partir de poches de sang de 6 sujets

Dans les macrophages, l'exposition aux $PM_{2.5}$ induit l'expression des gènes impliqués dans le processus de métabolisation des xénobiotiques ou de stress oxydant. CYP1B1 ainsi que NRF2 et SOD2 sont induit de façon significative après exposition aux $PM_{2.5}$, montrant la mise en place d'une réponse cellulaire contre le stress oxydant généré par les particules fines.

Nous avons ensuite mesuré par western blot la production de NRF2 et CYP1B1 dans les macrophages. Nous n'avons pas observé de différences significatives dans la production de ces deux protéines entre les témoins non exposés et les cellules exposées aux $PM_{2.5}$.

4. Réponse immunitaire des macrophages aux $PM_{2.5}$

En parallèle de la mesure de la réponse au stress oxydant, nous avons mesuré l'effet des $PM_{2.5}$ sur la réponse immunitaire des macrophages.

L'expression génique de cytokines pro-inflammatoires, IL1 β , IL6, IL8 et TNF α et l'expression génique du TGF β , cytokine impliquée dans la régulation des réponses immunitaires, ont été mesurées (figure 62).

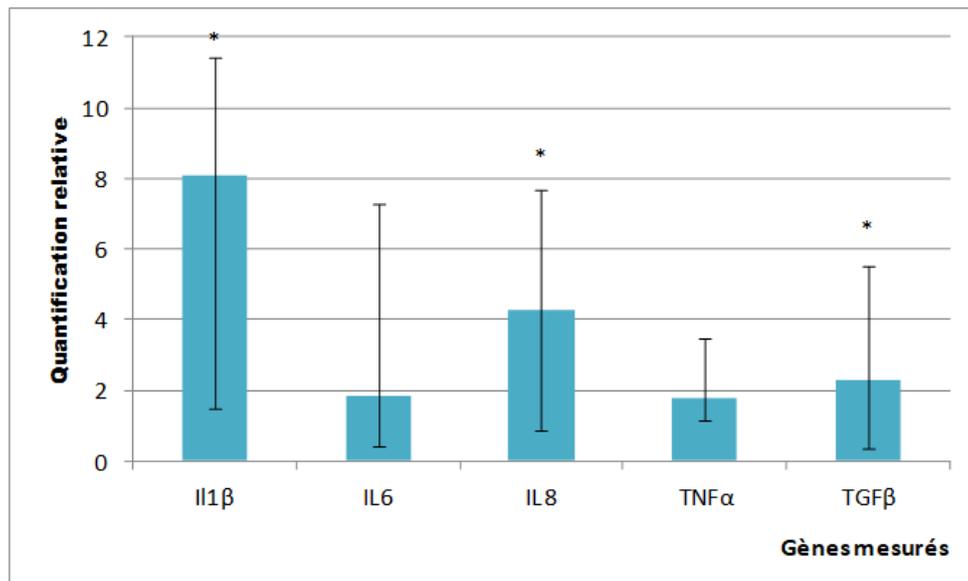


Figure 62 : Mesure de l'expression génique de l'IL1β, l'IL6, l'IL8, le TNFα et le TGFβ dans les macrophages primaires après 48h d'exposition aux PM_{2.5}
 ΔCt normalisé sur l'expression du 18S. *significativité $RQ > 2$ ou $RQ < 0,5$
 Rapporté sur la valeur du témoin non exposé, normalisé à 1
 Les expositions ont été réalisées sur les macrophages isolés à partir de poches de sang de 6 sujets

Les résultats obtenus montrent une induction significative de l'IL1β et de l'IL8 mais également du TGFβ. L'augmentation de l'expression génique de l'IL6 et du TNFα n'est pas significative mais présente une forte tendance à la hausse ($RQ = 1,86$ pour l'IL6 et $RQ = 1,80$ pour le TNFα). L'augmentation de l'expression génique de l'IL1β, de l'IL8 et du TGFβ, tout comme celle de l'IL6 et du TNFα, après exposition aux PM_{2.5} était attendue et est en accord avec la littérature (Jia et al., 2017; Zhao et al., 2016; Zou et al., 2018).

En parallèle, la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL1β, l'IL6, l'IL8, l'IL12, le TNFα et anti-inflammatoires comme l'IL4, l'IL10 et l'IL13 après exposition aux PM_{2.5} a été mesurée par ELISA Multiplex (figure 63)

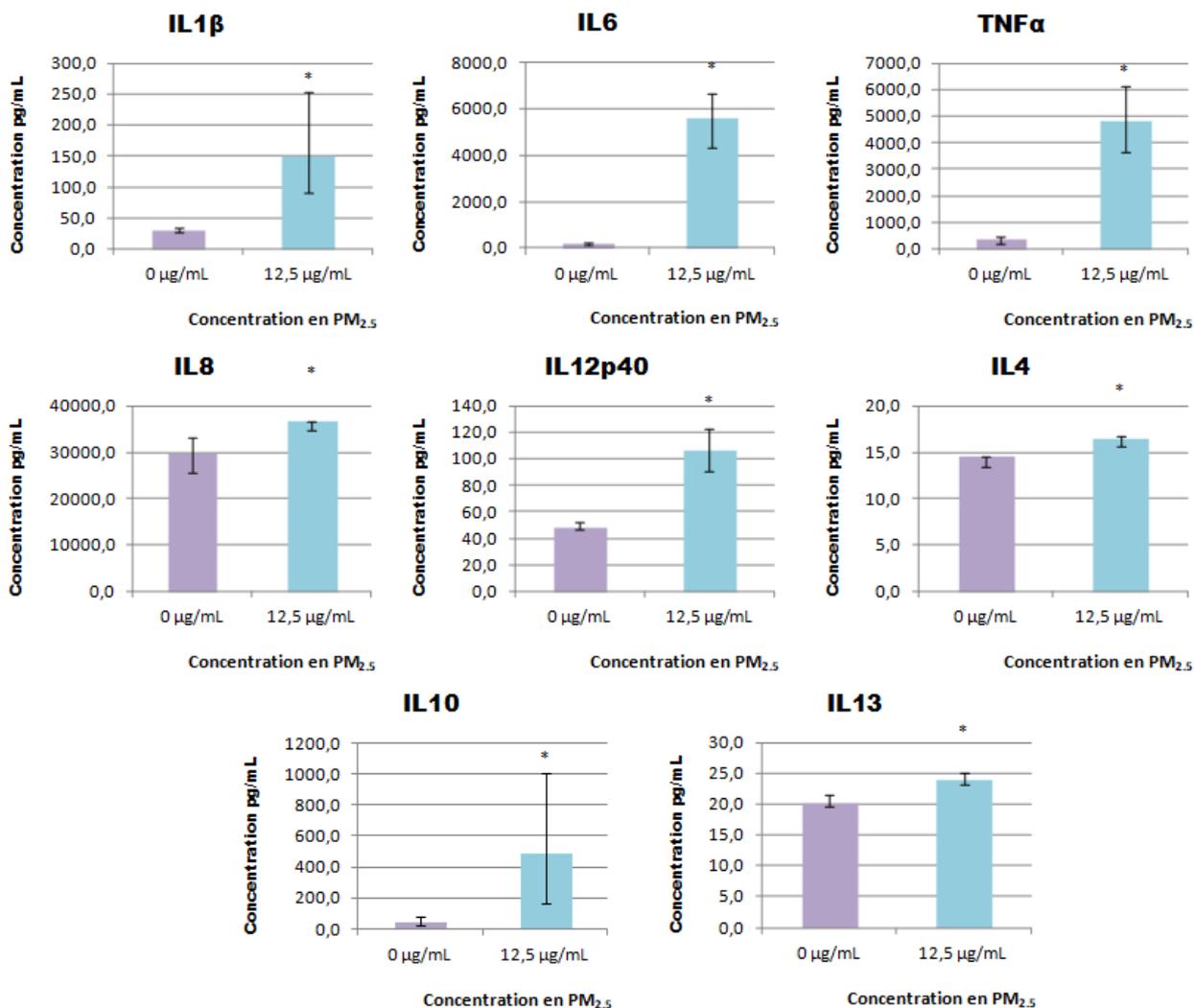


Figure 63 : Dosage de la sécrétion de cytokines dans le surnageant des macrophages primaires après exposition aux $PM_{2.5}$

Dosage réalisé par ELISA Multiplex. Les macrophages primaires ont été exposés à 0 $\mu\text{g/mL}$ et 12,5 $\mu\text{g/mL}$ de $PM_{2.5}$ pendant 48h. Test de Mann-Whitney * significativité : $p \leq 0.05$

IL1 β $p=0.0021$; IL6 $p=0.0021$; TNF α $p=0.0021$; IL8 $p=0.0086$; IL12p40 $p=0.0021$; IL4 $p=0.0046$; IL10 $p=0.0086$; IL13 $p=0.0086$

Les résultats obtenus montrent, après exposition aux $PM_{2.5}$, une augmentation significative de la sécrétion de l'ensemble des cytokines testées : celles pro-inflammatoires comme l'IL1 β , l'IL6, la TNF α , l'IL8 et l'IL12p40, et celles anti-inflammatoires comme l'IL4, l'IL10 et l'IL13

Ces résultats permettent d'établir un profil des macrophages exposés aux $PM_{2.5}$. Nous pouvons nous demander si la dualité observée dans la sécrétion de ces cytokines montrerait une polarisation vers un phénotype M1, avec l'augmentation de l'IL12p40 par exemple (Park et al., 2011). Cependant, lorsque l'on prête attention à la concentration de

l'IL10 par rapport à celle de l'IL12p40, on remarque que l'IL10 est présent en plus grande concentration, comme le montre le calcul du ratio IL12p40/IL10 (figure 64), ce qui ferait pencher la balance vers une polarisation de type M2 (Ma et al., 2015). (Rószler, 2015) chapitre I.C.3)

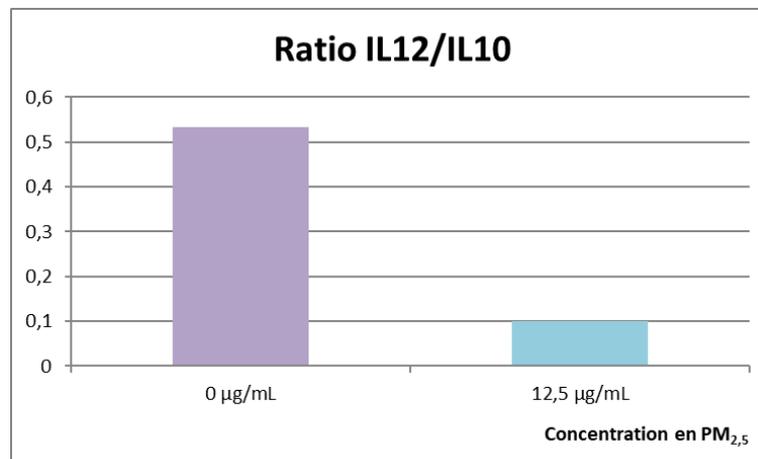


Figure 64 : Ratio molaire IL12/IL10 obtenu après quantification de la sécrétion d'IL12 et d'IL10 dans les macrophages primaires après exposition aux PM_{2,5}
Dosage des cytokines réalisé par ELISA Multiplex

Néanmoins, l'augmentation de la production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 β , l'IL-6 et le TNF α , fait penser que la population de macrophages primaires suite à l'exposition est hétérogène. Pour vérifier cette hypothèse, les marqueurs de surface spécifiques, tels que CD86, utilisés comme marqueur de la polarisation M1, CD206, marqueur de la polarisation M2 et CD16, marqueur monocytaire (cf. Chapitre I.C) ont été mesurés, aux niveaux génique et protéique (Figure 65). CD14, marqueur exprimé à la surface des macrophages, a également été mesuré, ceci dans le but de travailler sur une population de macrophages.

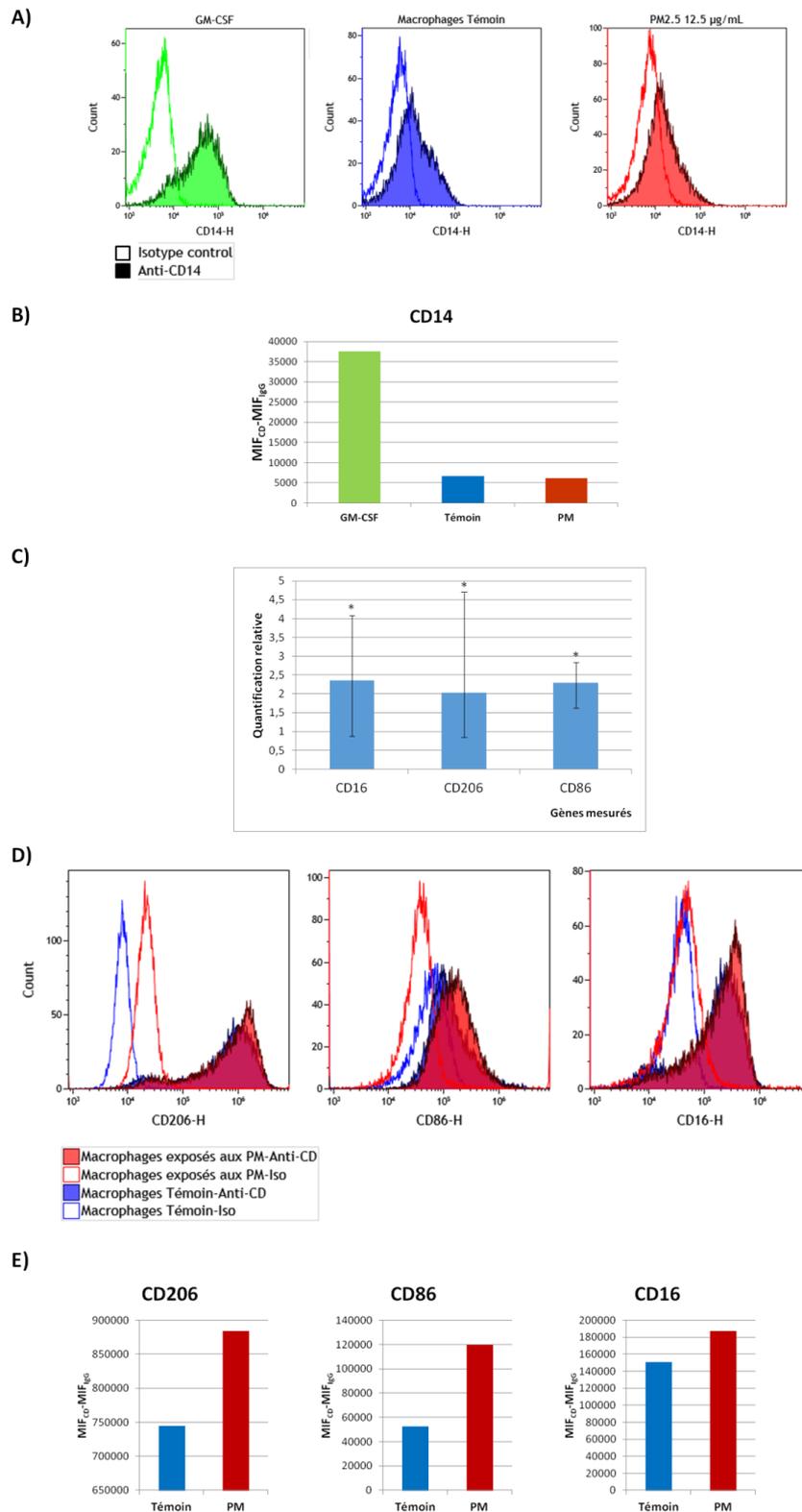


Figure 65 : Mesure des marqueurs de surface des macrophages primaires.

Les macrophages ont été cultivés 36h avec du GM-CSF puis 48h avec 12.5 µg/mL de PM_{2.5} ou non (témoin). Ils ont ensuite été marqués avec un anticorps dirigé contre les marqueurs de surface CD14 (A), CD206, CD86 et CD16 (D) et analysés par cytométrie en flux. La mesure de l'expression génique de CD206, CD86 et CD16 après exposition aux PM_{2.5} a également été réalisée (C) ΔCt normalisé sur l'expression du 18S.

*significativité $RQ > 2$ ou $RQ < 0,5$ Rapporté sur la valeur du témoin non exposé, normalisé à 1 (B) et (E) représentent les moyennes d'intensité de fluorescence (MIF) des cellules marquées (MIF_{CD}) - les MIF des cellules incubées avec l'isotype contrôle (MIF_{IgG}).

Afin de mesurer ces marqueurs sur la population macrophagique, le marqueur monocytaire CD14 a été quantifié (Figure 65 A et B). Les résultats montrent une diminution de ce marqueur après 48h, que les cellules aient été exposées ou non. Ceci peut être dû au GM-CSF, puisqu'il est connu que celui-ci entraîne une diminution de CD14 à la surface des monocytes/macrophages (Sadeghi et al., 2016). Ensuite l'expression des gènes codant pour CD16, CD206 et CD86 a été mesurée (Figure 65 C). Les résultats montrent une augmentation significative de l'expression de chacun des 3 gènes suite à l'exposition aux PM_{2.5}. Enfin, les marqueurs CD206, CD86 et CD16 ont été quantifiés par cytométrie en flux uniquement sur la population CD14 positive (Figure 65 D et E). Nous observons une augmentation de chacun des marqueurs à la surface des macrophages après exposition aux PM_{2.5}. L'augmentation à la fois des marqueurs CD86 et CD16 (M1) et du marqueur CD206 (M2) confirme l'hypothèse émise précédemment, c'est-à-dire que l'exposition aux PM_{2.5} induit à la fois le phénotype M1 et le phénotype M2.

5. Expression des miARN dans les macrophages primaires après exposition aux PM_{2.5}

Nous avons poursuivi par la mesure des effets des PM_{2.5} sur l'expression des miARN. Pour cela, nous avons quantifié par qPCR les niveaux de 12 miARN avec pour référence U6 (Yao et al., 2015) (figure 66). Ces miARN ont été sélectionnés après analyse bibliographique sur le fait qu'ils soient potentiellement modifiés après exposition aux PM_{2.5}, dans les maladies respiratoires ou encore impliqués dans la polarisation des macrophages (Annexe III).

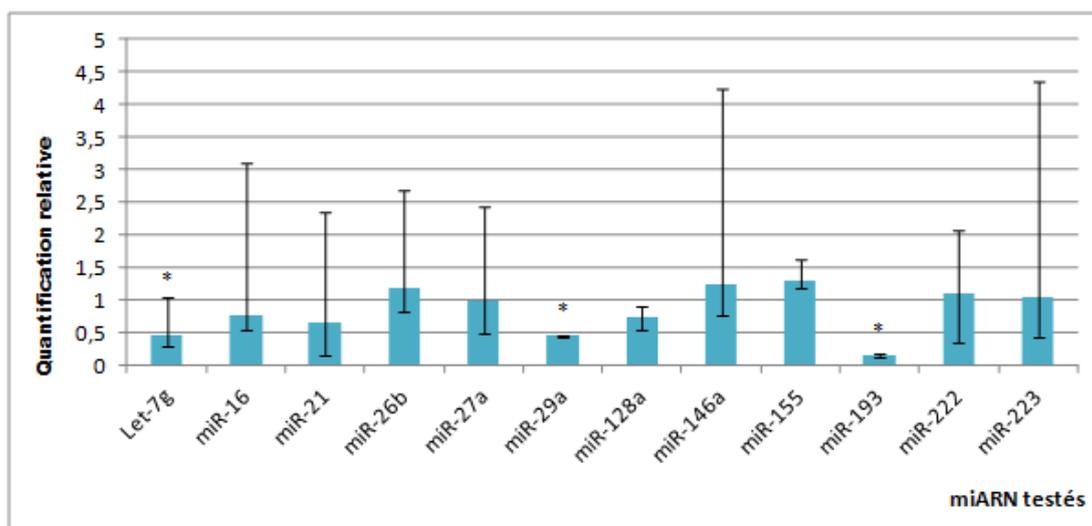


Figure 66 : Quantification relative de l'expression des miARN dans les macrophages primaires après exposition aux PM_{2.5}

*Δ Ct normalisé sur l'expression de U6, significativité RQ>2 ou RQ<0,5 ; médiane [Q1-Q3]
Rapporté sur la valeur du témoin non exposé, normalisé à 1. L'exposition a été réalisée sur les macrophages isolés de poches de sang de 6 sujets.*

Sur ces 12 miARN, 3 sont diminués de façon significative : let-7g, miR-29a et miR-193. Cependant, nous avons travaillé sur 6 poches de sang de donneurs anonymes et la variabilité individuelle entre en jeu, ce qui pourrait contribuer à l'absence de significativité pour les autres miARN.

Nous nous sommes focalisés sur les 3 miARN dont l'expression est diminuée de manière significative quels que soient les individus.

Nos recherches ont montré que let-7g régulait BCL-XL, gène codant pour une protéine anti-apoptotique, mais aussi BAX, codant pour une protéine pro-apoptotique (Bao et al., 2013; Cao et al., 2015; Shimizu et al., 2010; Wang et al., 2017b; Wu et al., 2015; Zhang et al., 2013a). Nous avons donc mesuré l'expression de ces deux gènes (Figure 67).

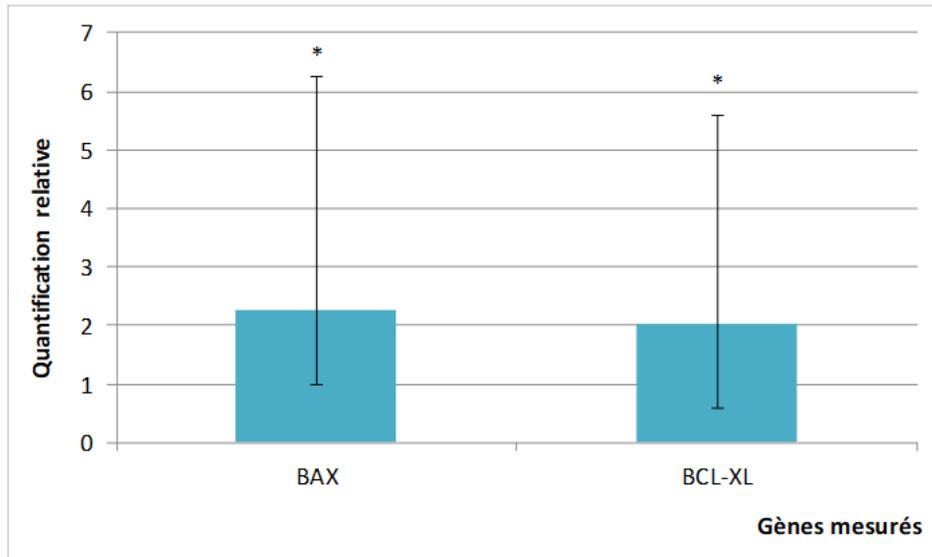


Figure 67 : Mesure de l'expression génique de BAX et BCL-XL dans les macrophages primaires après exposition aux PM_{2.5}
 ΔCt normalisé sur l'expression du 18S. *significativité $RQ > 2$ ou $RQ < 0,5$
 Rapporté sur la valeur du témoin non exposé, normalisé à 1
 L'exposition a été réalisée sur 6 sujets

Après mesure de l'expression génique de BAX et BCL-XL (figure 67), nos résultats montrent que tous deux sont induits de façon significative après exposition aux particules fines, ce qui est en corrélation avec la diminution de let-7g que nous observons.

Concernant miR-29a, il a été montré que PTEN et VEGFA, impliqués dans les processus de cancérogénèse (Chen et al., 2014; Wang et al., 2018) étaient deux de ses cibles. PTEN est également un gène cible de miR-193 (Liu et al., 2017) . Nous avons donc mesuré l'expression de ces deux gènes dans les macrophages après exposition aux PM_{2.5} (figure 68).

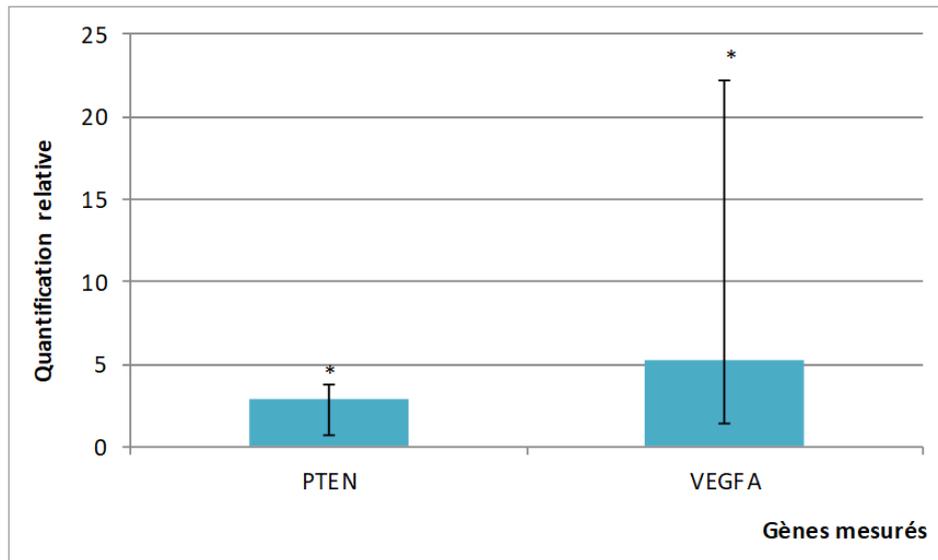


Figure 68 : Mesure de l'expression génique de PTEN et VEGFA dans les macrophages primaires après exposition aux PM_{2.5}
 ΔCt normalisé sur l'expression du 18S. *significativité $RQ > 2$ ou $RQ < 0,5$
 Rapporté sur la valeur du témoin non exposé, normalisé à 1
 L'exposition a été réalisée sur les macrophages primaires isolés à partir du sang de 6 sujets

Nos résultats montrent que ces deux gènes sont induits de façon significative après exposition aux PM_{2.5}. Ce résultat est corrélé avec la diminution de l'expression de miR-29a et miR-193, contribuant alors à une augmentation de l'expression des gènes cibles.

6. Analyse des EV libérées par les macrophages primaires en réponse à l'exposition aux PM_{2.5}

Après analyse de l'effet de l'exposition aux PM_{2.5} sur les macrophages primaires, nous avons analysé les EV libérées en réponse.

Après 48h d'exposition, les surnageants des macrophages des 6 donneurs ont été récupérés, et ont été regroupés par condition (ceci afin de maximiser le nombre d'EV par condition). Nous avons donc obtenu 2 échantillons desquels nous avons isolé les EV :

- 1 échantillon d'EV témoin, libérées par des macrophages non exposés aux PM_{2.5}
- 1 échantillon d'EV libérées par des macrophages exposés à 12,5 µg/mL de PM_{2.5}

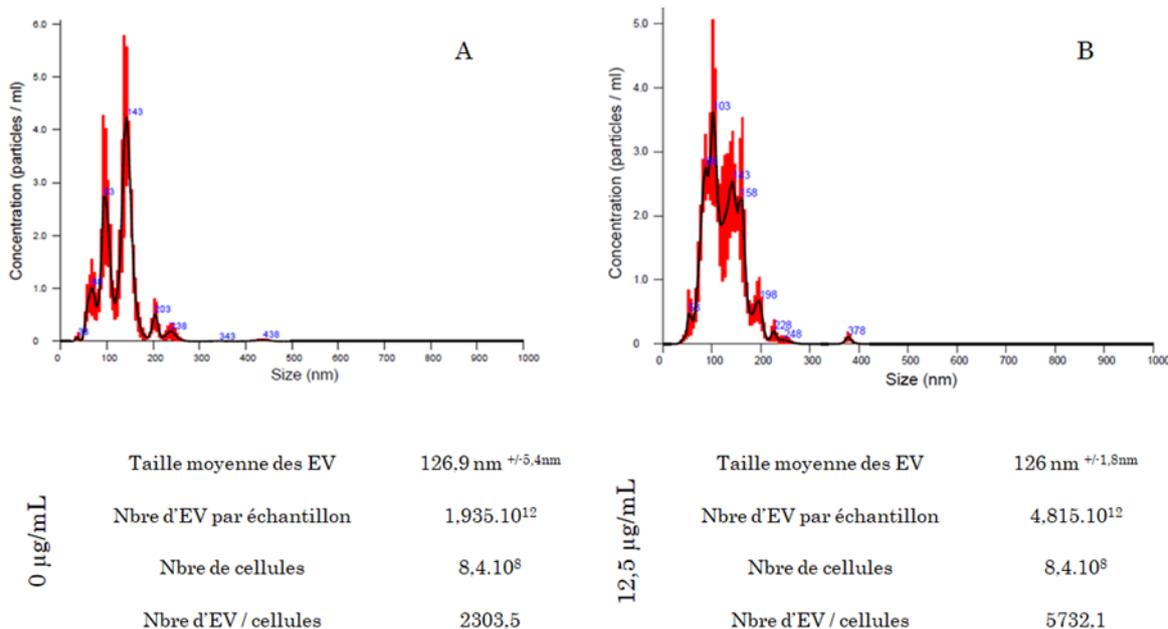


Figure 69 : Analyse individuelle par NTA des EV libérées par les macrophages primaires
A : Echantillon d'EV libérées après 48h par les macrophages primaires non exposés aux PM_{2.5} ; B : Echantillon d'EV libérées après 48h par les macrophages primaires exposés à 12,5 µg/mL de PM_{2.5}

Les EV obtenues ont été quantifiées par suivi individuel au Nanosight (figure 69). Nous avons ainsi observé que nos échantillons sont composés d'EV ayant une taille moyenne estimée à 126 nm. La quantification des EV a permis d'établir un ratio du nombre d'EV libérées par les macrophages primaires exposés aux PM_{2.5} par rapport à celles libérées par les macrophages primaires non exposés. Les cellules exposées aux particules libèrent près de 2,5 fois plus d'EV que celles non exposées (figure 70).

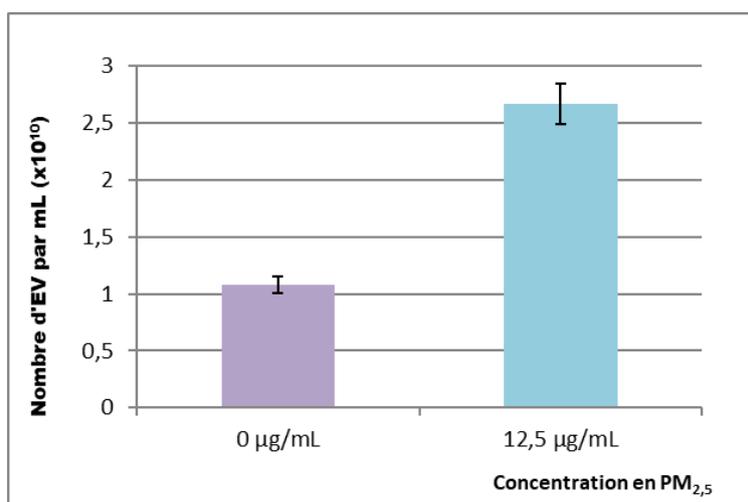


Figure 70 : Quantification des EV libérées par les macrophages primaires suite à l'exposition aux PM_{2.5}
Quantification réalisée par suivi individuel sur les EV libérées par les macrophages exposés ou non aux PM_{2.5} pendant 48h

Ensuite, les protéines des EV ont été dosées par la méthode Bradford (tableau 18). Les mesures révèlent une quantité de protéines totales supérieure d'un facteur d'environ 1,4 quand les macrophages ont été exposés aux particules, en comparaison avec le témoin non exposé.

Tableau 18 : Quantification des protéines dans les EV de macrophages primaires
Dosage réalisé par la méthode Bradford

Echantillon	Concentration (ng/ μ l)
0 μ g/mL	31
12,5 μ g/mL	43

Comme pour les THP1, nous avons analysé les 2 marqueurs protéiques CD63 et CD81, par western blot. Ces deux protéines sont présentes dans les échantillons d'EV libérées par les macrophages exposés aux PM_{2.5} et dans les EV libérées par les macrophages témoins (figure 71) révélant la présence d'exosomes dans les échantillons.

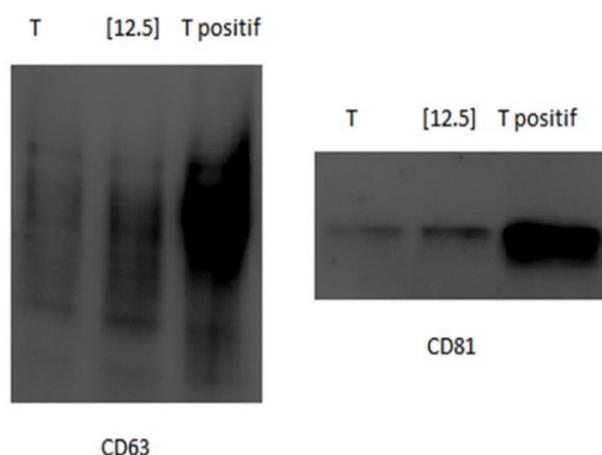


Figure 71 : Analyse par western blot de CD63 et CD81 dans les EV libérées par les macrophages en réponse à l'exposition aux PM_{2.5} pendant 48h

T = EV témoin, libérées par des macrophages non exposés aux PM_{2.5}; [12,5] = EV libérées par des macrophages exposés aux PM_{2.5}; T positif = échantillon d'EV exprimant CD63 et CD81

La dernière partie du travail sur les EV a été d'établir leur profil en miARN, afin d'observer si l'exposition aux PM_{2.5} avait une influence.

Nous avons dans un premier temps dosé les petits ARN, de taille inférieure à 200 nucléotides, incluant les miARN, dans les EV des macrophages primaires (tableau 19).

Les mesures révèlent la présence d'une concentration en miARN supérieure quand les macrophages ont été exposés aux PM_{2.5}. Il semblerait que l'exposition aux PM_{2.5} engendre une augmentation de la proportion de miARN par rapport aux petits ARN.

Tableau 19 : Concentration en petits ARN dans les EV de macrophages primaires après exposition aux PM_{2.5}
Dosage réalisé par Bioanalyzer®

Echantillon	Concentration en miARN (pg/μl)	Concentration en petits ARN (pg/μl)	Ratio miARN / petits ARN (%)
0 μg/mL	132,20	267,6	49%
12,5 μg/mL	141,60	194,8	73%

Nous avons ensuite mesuré le niveau d'expression de 12 miARN : let-7e, let-7g, miR-21, miR-26a, miR-26b, miR-30a, miR-128a, miR-197, miR-221, miR-223, miR-331 et miR-378. Il n'existe actuellement pas de miARN de référence dans les EV. Nous avons retenu miR-16 comme miARN de référence, car ce dernier a été utilisé dans des travaux précédents (Masè et al., 2017), mais aussi dans une précédente étude menée au sein de notre équipe sur les EV de LBA de sujets fumeurs vs non-fumeurs (Héliot et al., 2017) et également lors de la quantification des miARN dans les EV de THP1 (cf III.B.2.c).

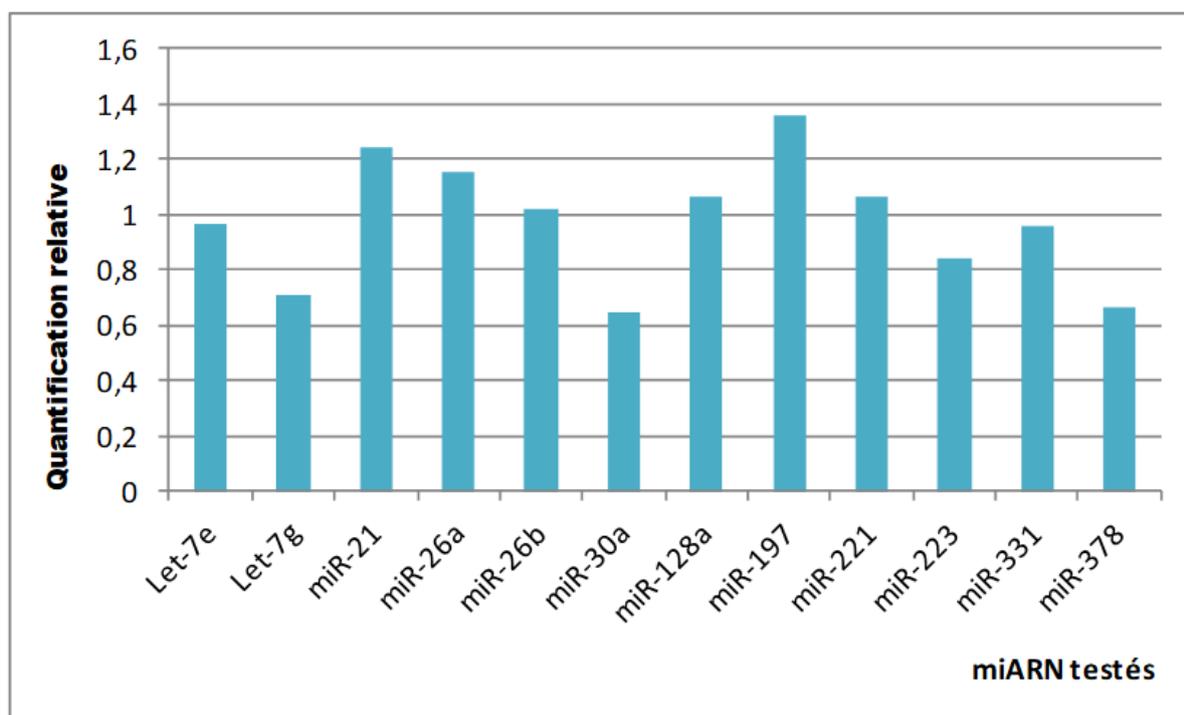


Figure 72 : Quantification relative du niveau des miARN dans les EV de macrophages primaires après exposition aux PM_{2.5} pendant 48h
ΔCt normalisé sur l'expression de miR-16. +significativité RQ>2 ou RQ<0,5 ; médiane

Les résultats obtenus ne mettent pas en évidence de différences significatives dans les niveaux des miARN dans les EV libérées par les macrophages exposés ou non aux PM_{2.5} (figure 72) à part une tendance à la baisse pour certains miARN comme let-7g, miR-30a

ou miR-378. Si l'on se rapporte à l'expression génique des miARN dans les macrophages primaires, nous pouvons faire un parallèle avec let-7g, présentant, dans les EV libérées par les macrophages exposés aux PM_{2.5}, un niveau qui tendrait à diminuer, et dont l'expression était diminuée de façon significative dans les cellules après exposition aux PM_{2.5}.

Les différentes mesures effectuées sur les macrophages après exposition aux PM_{2.5} montrent une augmentation de l'expression des gènes codant pour CYP1B1 et des gènes codant pour des protéines impliquées dans la réponse au stress oxydant. Nos résultats montrent également une augmentation de l'expression et de la sécrétion de cytokines pro et anti-inflammatoires. Nous observons de plus une modification dans la balance entre macrophages M1 et M2, dans le sens d'une polarisation vers un phénotype M2.

Après quantification des EV, nos résultats ont montré une libération plus importante d'EV par les macrophages primaires exposés aux PM_{2.5} par rapport à celles libérées par des macrophages non exposés. Le profil en miARN des EV produites en réponse à une exposition des macrophages se trouve légèrement diminué par rapport au témoin non exposé.

Les EV sont des médiateurs de la communication cellulaire et peuvent modifier le phénotype des cellules cibles. Ces travaux ont été poursuivis par l'étude d'effets potentiels entraînés sur des cellules épithéliales pulmonaires par les EV libérées en réponse à l'exposition aux PM_{2.5}.

D. EXPOSITION DES BEAS-2B AUX EV LIBEREES EN REPONSE A L'EXPOSITION DES THP1 ET DES MACROPHAGES PRIMAIRES

1. Effets des EV de THP1 sur des BEAS-2B

Nous avons souhaité observer si les EV libérées par des cellules exposées aux PM_{2.5} transmettent un message spécifique à leurs cellules cibles. Pour cela, nous avons exposé des cellules épithéliales pulmonaires humaines, les BEAS-2B, aux EV libérées par les THP1 en réponse à l'exposition aux PM_{2.5} (tableau 20).

Nous avons décidé de travailler en volume et non en nombre d'EV afin de respecter le ratio entre le nombre d'EV libérées suite à l'exposition aux PM_{2.5}.

Tableau 20 : Nombre d'EV de THP1 utilisées pour l'exposition des BEAS-2B

	Concentration et temps d'exposition	Nombre d'EV dans 50 µl	Nombre de BEAS-2B exposées
EV libérées par les THP1 exposées aux PM _{2.5}	0 µg/mL 6h	28,13 x 10 ¹⁰	350 000 cellules
	12,5 µg/mL 6h	22,00 x 10 ¹⁰	350 000 cellules
	50 µg/mL 6h	21,40 x 10 ¹⁰	350 000 cellules
	0 µg/mL 24h	38,00 x 10 ¹⁰	350 000 cellules
	12,5 µg/mL 24h	47,70 x 10 ¹⁰	350 000 cellules
	50 µg/mL 24h	71,70 x 10 ¹⁰	350 000 cellules
	0 µg/mL 48h	43,00 x 10 ¹⁰	350 000 cellules
	12,5 µg/mL 48h	125,9 x 10 ¹⁰	350 000 cellules
	50 µg/mL 48h	151,30 x 10 ¹⁰	350 000 cellules

Au bout de 36h de culture (initialement prévue à 48h), les BEAS-2B exposées étaient décollées ou mortes, alors que les cellules témoin, non exposées aux EV de THP1, étaient toujours en vie.

Nous avons alors arrêté la culture et réalisé un test LDH afin de mesurer la mort cellulaire (figure 73).

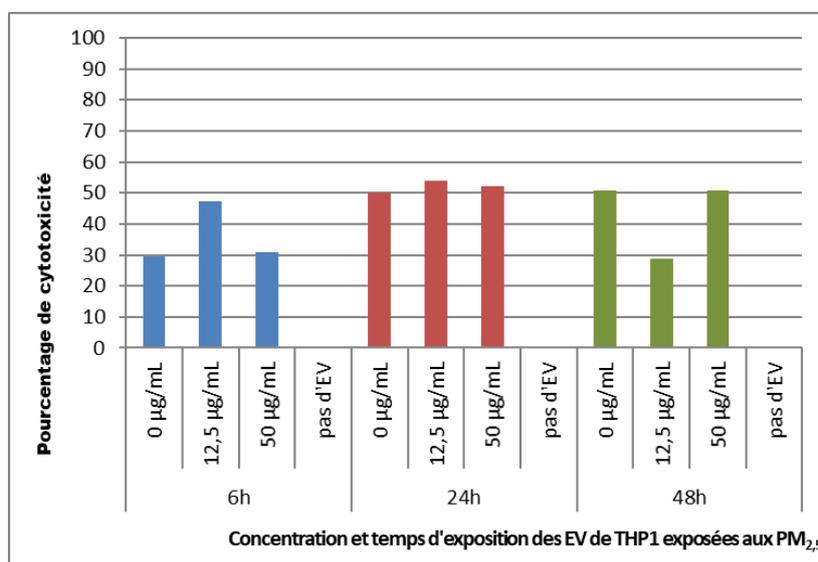


Figure 73 : Dosage de la mortalité cellulaire des BEAS-2B après exposition aux EV de THP1

Dosage réalisé par LDH sur les surnageants de culture cellulaire des BEAS-2B

La LDH est libérée dans le milieu de culture après lyse des cellules. Sa quantité est liée à la mortalité cellulaire des BEAS-2B après exposition aux EV de THP1.

Les résultats montrent une mortalité cellulaire des BEAS-2B allant de près de 30% à 54% après exposition aux EV de THP1, les mortalités les plus importantes étant observées pour des temps de 24h et 48h. Nous avons réalisé un contrôle (blanc) pour chaque temps de libération des EV par les THP1 (6h, 24h et 48h). Ce blanc a été réalisé avec le même nombre de cellules (350 000) que nous n'avons pas exposé aux EV (50 µl de PBS ont été ajoutés dans le milieu de culture).

Ces cellules contrôles ne présentent aucune mortalité cellulaire.

Nous avons poursuivi par la quantification d'un marqueur de l'apoptose dans les surnageants de culture, sFas, par ELISA Multiplex (figure 74).

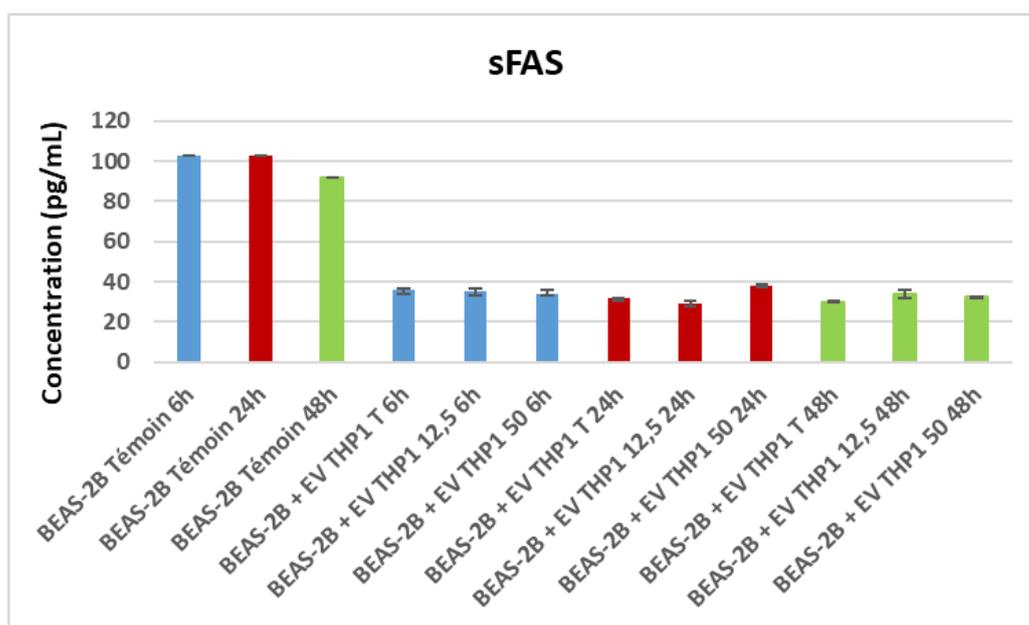


Figure 74 : Dosage de la sécrétion de sFas dans les surnageants des BEAS-2B exposées aux EV de THP1 libérées en réponse à l'exposition aux PM_{2.5}
Dosage réalisé par ELISA Multiplex sur les surnageants de culture des BEAS-2B après exposition aux EV libérées par les THP1 en réponse à l'exposition aux PM_{2.5}.

sFas est la forme soluble de Fas. Il inhibe la liaison Fas-FasL, entraînant le blocage de l'apoptose médiée par Fas (Yasuda et al., 1998). Les résultats montrent une diminution de la forme soluble de sFas dans les surnageants de culture des BEAS-2B exposées aux EV de THP-1 (libérées ou non sous l'effet des PM_{2.5}), alors que la concentration de sFas est 2 à 3 fois plus importante dans les surnageants des BEAS-2B non exposées aux EV (BEAS-2B témoins). Cette diminution de sFas permet à Fas de se fixer sur son ligand, ce qui entraîne l'apoptose des cellules.

En couplant ces résultats avec la mortalité cellulaire après exposition (figure 73), nous pouvons émettre l'hypothèse que les EV issues de THP-1, exposées ou non aux PM_{2.5}, entraînent la mort cellulaire des BEAS-2B en inhibant la sécrétion de sFas.

2. Effets des EV de macrophages primaires sur des BEAS-2B

En parallèle de l'exposition des BEAS-2B aux EV de THP1, nous avons exposé les BEAS-2B aux EV libérées par les macrophages primaires en réponse à l'exposition aux PM_{2.5}.

Afin de rester sur un modèle le plus physiologique possible, nous avons décidé d'exposer ces cellules à un volume équivalent d'EV, conservant ainsi le ratio de 2,5 entre les cellules non exposées et les cellules exposées aux PM_{2.5} (figure 73).

Nous avons exposé, en triplicats de culture, 350 000 cellules à 50 µl d'EV pendant 36h, afin de stopper la culture des BEAS-2B exposées aux EV de macrophages primaires en même temps que celle des BEAS-2B exposées aux EV de THP1 (tableau 21).

Tableau 21 : Nombre de vésicules de macrophages primaires utilisées lors de l'exposition des BEAS-2B

	Beas-2B + EV de macrophages non exposées	Beas-2B + EV de macrophages exposés aux PM_{2.5}
Nombre d'EV dans 50 µl	7,17 x 10 ¹⁰ EV	17,85 x 10 ¹⁰ EV
Nombre de cellules exposées	350 000 cellules	350 000 cellules

Après 36h de culture, les acides nucléiques, les extraits protéiques et les surnageants de culture des BEAS-2B ont été récupérés.

En préalable aux mesures d'expression génique, il a été recherché si des particules fines pouvaient être retrouvées dans les culots d'EV, malgré les étapes de filtration et d'ultracentrifugation suivies lors de l'isolement des EV. Cette question se pose car il est connu que les particules exercent un effet pro-inflammatoire direct sur les cellules BEAS-2B (Dergham et al., 2012; Veranth et al., 2004). Pour cette raison, nous avons réalisé un témoin, appelé « témoin particules », de la façon suivante : 12,5 µg/mL de PM_{2.5} ont été ajoutés dans le milieu de culture seul pendant 48h pour recréer les conditions d'exposition et de libération des EV par les macrophages primaires.

Les milieux de culture avec PM_{2.5} ont ensuite été soumis à des centrifugations différentielles, filtration à 220nm puis ultracentrifugation, de la même façon que pour l'isolement des EV. Après ultracentrifugation, nous avons récupéré le culot dans du PBS.

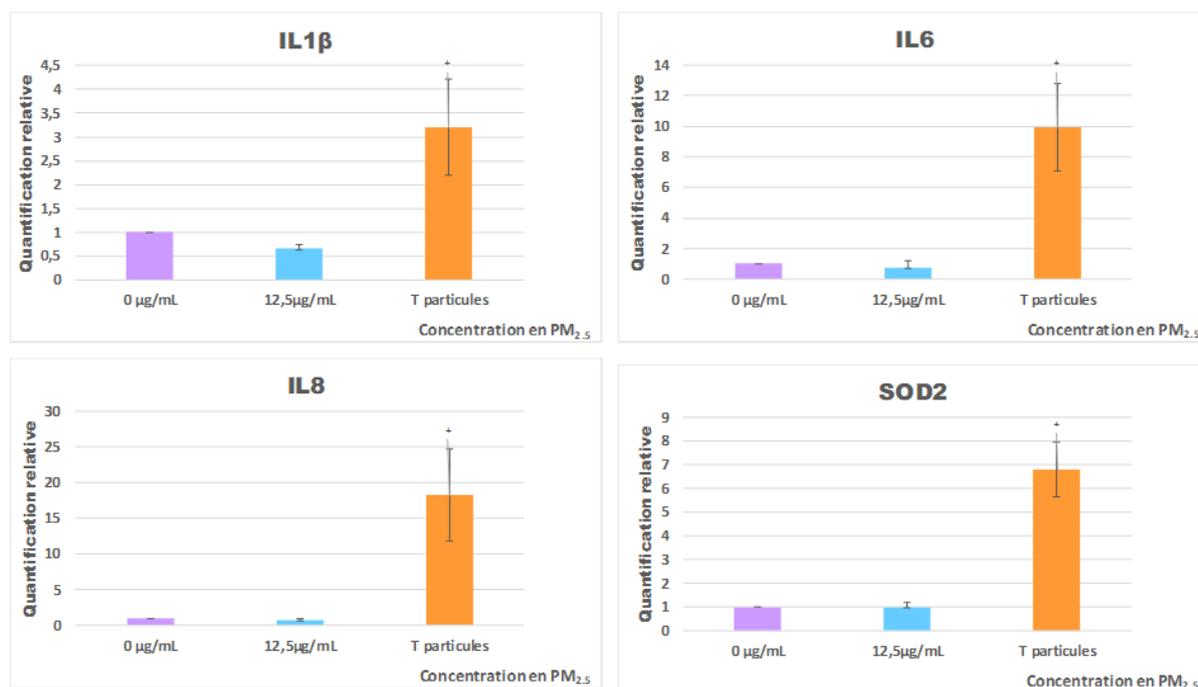


Figure 75 : Expression génique d'IL1 β , IL6, IL8 et SOD2 dans les BEAS-2B exposées aux EV libérées par les macrophages et au témoin « particule »

ΔCt normalisé sur l'expression du 18S. +significativité $RQ > 2$ ou $RQ < 0,5$

0 $\mu\text{g/mL}$ = BEAS-2B exposées aux EV libérées par les macrophages non exposés aux $\text{PM}_{2,5}$; 12,5 $\mu\text{g/mL}$ = BEAS-2B exposées aux EV libérées par les macrophages exposés à 12,5 $\mu\text{g/mL}$ de $\text{PM}_{2,5}$;

Le résultat de l'expression génique des cellules BEAS-2B exposées au témoin « particules » peut être comparé à ceux obtenus sur les BEAS-2B après exposition aux EV de macrophages. Les résultats montrent une induction significative des 3 interleukines lorsque les BEAS-2B sont exposées avec le témoin particules : l'IL1 β , l'IL6 et l'IL8 ainsi que du gène codant pour SOD2 (figure 75), alors qu'il n'y a pas d'induction lorsque les cellules sont exposées avec les EV libérées par les macrophages non exposés et exposés à 12,5 $\mu\text{g/mL}$ de $\text{PM}_{2,5}$. Cette observation peut être reliée à la présence d'un reste de particules dans le culot du témoin PBS, particules qui induisent une réponse inflammatoire des cellules.

Ce résultat nous permet de conclure sur l'absence de $\text{PM}_{2,5}$ dans nos échantillons d'EV. Pour expliquer cela, il peut être suggéré que lorsque l'on expose les macrophages aux $\text{PM}_{2,5}$, ces dernières seraient phagocytées. Ainsi, le fait qu'il n'y ait pas d'induction de l'expression des gènes testés lorsque les cellules sont exposées avec les EV libérées par les macrophages exposés aux $\text{PM}_{2,5}$ s'expliquerait par une absence de particules dans le culot et que dans ces conditions, les EV produites en réponse à une exposition des macrophages n'entraîne pas d'induction significative des gènes testés.

Nous avons quantifié l'expression de 12 autres gènes dans les BEAS-2B après exposition aux EV de macrophages : le gène codant pour la cytokine anti-inflammatoire TGF β ; des gènes impliqués dans le processus de métabolisation des xénobiotiques ou le stress oxydant, comme CYP1A1, CYP1B1, NRF2, CAT, SOD2 et NQO1 et des gènes impliqués dans le processus de cancérogénèse ou d'apoptose comme PDL1, PTEN, VEGFA, BCL-XL, BCL2 et IAP1.

Aucun des gènes testés ne présente de différences significatives dans leur expression génique, par rapport au témoin qui correspond à des cellules BEAS-2B exposées avec des vésicules libérées par des macrophages non exposés aux PM_{2.5} (tableau 22).

Tableau 22 : Mesure de l'expression génique dans les BEAS-2B après exposition aux EV de macrophages primaires
 ΔCt normalisé sur l'expression du 18S. +significativité $RQ > 2$ ou $RQ < 0,5$; médiane [Q1-Q3]

Gène testé	Quantification relative BEAS-2B + EV libérées par les macrophages exposés à 12,5 $\mu\text{g/mL}$ de PM _{2.5}	Fonctions	Observations
IL1 β	0,72 [0,69 – 0,73]	Inflammation	Pas de différences significatives
IL6	0,84 [0,79 – 1,19]		
IL8	0,93 [0,85 – 0,99]		
TGF β	0,97 [0,96 – 0,98]		
CYP1A1	0,81 [0,57 – 0,91]	Métabolisation des Xénobiotiques	
CYP1B1	0,80 [0,78 – 0,83]		
NRF2	0,97 [0,90 – 1,02]		
NQO1	0,91 [0,84 – 0,96]		
CAT	1,38 [1,22 – 1,47]	Stress oxydant	
SOD2	1,03 [0,99 – 1,21]		
PDL1	0,77 [0,84 – 1,10]	Cancer	
PTEN	1,03 [0,91 – 1,20]		
VEGFA	0,96 [0,89 – 1,02]		
BCL-XL	1,02 [1,01 – 1,13]		
BCL2	1,02 [0,96 – 1,17]	Apoptose	
IAP1	0,82 [0,81 – 0,88]		

Nous avons poursuivi notre travail par la quantification de miARN dans les BEAS-2B exposées aux EV de macrophages.

Tout d'abord, un dosage des miARN a été réalisé au Bioanalyzer® (tableau 23). Nous avons observé une stabilité de la concentration en miARN et du rapport miARN / petits ARN dans les deux conditions, selon que les EV produites proviennent de macrophages exposés aux PM_{2.5} ou non. De plus, nous n'observons pas de différence nette dans la concentration en miARN ou en petits ARN entre les BEAS-2B exposées aux EV et celles exposées au témoin particules ou non exposées. Néanmoins, il faut souligner que le ratio miARN/petits ARN indique une proportion très faible en miARN par rapport aux petits ARN.

Tableau 23 : Dosage des petits ARN dans les BEAS-2B après exposition aux EV libérées par les macrophages primaires en réponse à l'exposition aux PM_{2.5}.

Dosage réalisé au Bioanalyzer®

Echantillon	Concentration en miARN (pg/μl)	Concentration en petits ARN (pg/μl)	Ratio miARN / petits ARN
BEAS-2B + EV macrophages non exposés	406,1	10 218	0,04
	420,7	8 644	0,05
	442,3	9 015	0,05
BEAS-2B + EV macrophages exposés à 12,5 μg/ml de PM _{2.5}	377,6	6 252	0,06
	476,2	7 672	0,06
	398,4	6 539	0,06
BEAS-2B + Témoin particules	477,9	6 935	0,07
BEAS-2B + PBS, sans EV (témoin)	447,85	6 061	0,07

Nous avons ensuite mesuré les niveaux de 18 miARN : miR-16, miR-19a, miR-21, miR-26b, miR-27a, miR-29a, miR-29b.1, miR-125a, miR-128, miR-146a, miR-155, miR-193b, miR-200c, miR-222, miR-223, miR-421, let-7a et let-7g. Nous avons testé 2 références : RNU48 et U6

Après qPCR, nous avons obtenu des valeurs de Ct pour les 2 petits ARN de référence mais pas pour les 18 miARN. Cette absence d'amplification pourrait être expliquée par le faible pourcentage de miARN par rapport aux petits ARN.

Nous avons ensuite analysé l'effet de l'exposition des BEAS-2B aux EV de macrophages exposés ou non sur la sécrétion de 10 cytokines (IL1β, IL1ra, IL2, IL4, IL6, IL8, IL10, IL12, IL13, TNFα). Nous observons une tendance à la hausse non significative pour IL6 et TNFα et une tendance à la baisse pour l'IL8, dans les BEAS-2B exposées aux EV libérées par des macrophages exposés aux PM_{2.5} par rapport à celles exposées aux EV libérées par des

macrophages dits témoins (figure 76). Les autres cytokines testées ne montrent pas de différences significatives entre les BEAS-2B exposées aux EV libérées ou non en réponse à l'exposition aux PM_{2.5} (Annexe V).

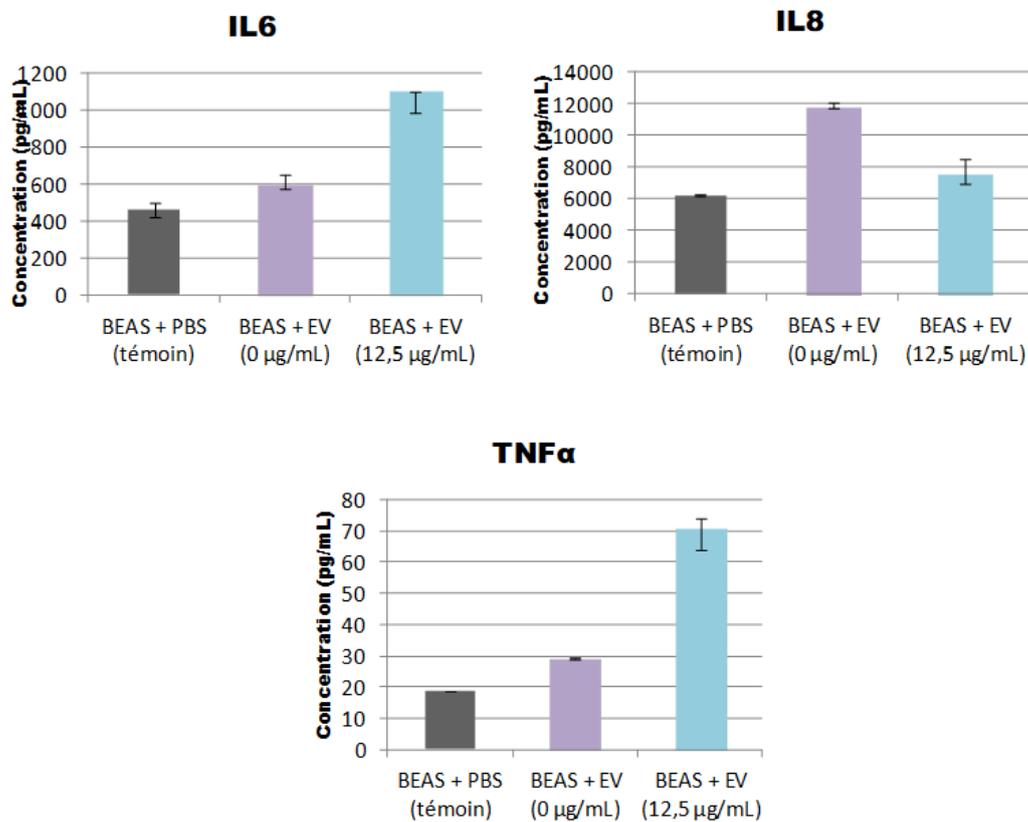


Figure 76 : Dosage de la sécrétion de cytokines dans le surnageant des BEAS-2B aux EV libérées par les macrophages primaires en réponse à l'exposition aux PM_{2.5}
 Dosage réalisé par *ELISA Multiplex*.
 Test de Mann-Whitney * significativité : $p \leq 0.05$
 IL6 : $p=0,1$; IL8 : $p=0,1$; TNFα : $p=0,1$

Les résultats obtenus dans cette partie de notre travail montrent une induction de l'apoptose dans les BEAS-2B exposées aux EV libérées par les THP1.

L'exposition des BEAS-2B aux EV libérées par les macrophages primaires ne met pas en avant de différences significatives dans l'expression génique entre les BEAS-2B exposées aux EV de macrophages exposés ou non aux PM_{2.5}. Cependant, et même si ces résultats ne sont qu'une tendance, nous observons un caractère pro-inflammatoire des EV libérées par les macrophages exposés aux PM_{2.5} sur les BEAS-2B.

CHAPITRE 4 :

Discussion

IV. DISCUSSION GENERALE

A. Effet de l'exposition des PM_{2.5} sur les macrophages

La composition des PM_{2.5} est un facteur important dans la toxicité cellulaire des particules fines.

A l'issue de la caractérisation physico-chimique des particules collectées au niveau du site industrialo-urbain de Dunkerque, nous avons montré que les PM_{0.3-2.5} présentait une composition chimique complexe. Ils renferment une variété de composés comme des éléments majeurs et traces, des ions inorganiques hydrosolubles et une fraction organique, incluant notamment, des hydrocarbures aromatiques polycycliques, des alcanes linéaires, des dioxines, des furanes et polychlorobiphényles (tableaux 10, 11, 12). La présence de ces composés résulte de la contribution de différentes sources naturelles et anthropiques et s'explique par des modes de formation différents (primaire ou secondaire) des particules.

Les métaux présents dans les PM_{2.5} (Al, Fe, Zn, Ba et Mn,...), peuvent être reliés à une diminution de la viabilité cellulaire, ce qui a été mis en avant dans une étude menée par Perrone et al (Perrone et al., 2013). Cette même étude, ainsi que celle de Zhao et al (Zhao et al., 2016), a également porté sur les ions inorganiques retrouvés dans les particules, notamment les ions SO₄²⁻, Ca²⁺, NO₃⁻ ou encore Mg²⁺, majoritaires dans nos échantillons. La présence de ces ions dans nos échantillons peut également être mise en relation avec une diminution de la viabilité cellulaire, observée dans notre étude sur les THP1 (figure 46), et la production de ERO (Perrone et al., 2013; Zhao et al., 2016). Ces résultats sont aussi en accord avec d'autres travaux, dans lesquels des effets dépendant de la dose des particules ont été observés sur des cellules épithéliales pulmonaires A 549 (Pavagadhi et al., 2013 ; Alessandria et al., 2014) et BEAS-2B (Gualtieri et al., 2011).

Nos travaux sur les macrophages primaires montrent la mise en place d'une réponse antioxydante suite à l'exposition aux PM_{2.5}, via l'induction de gènes tels que NRF2 et SOD2 (figure 61).

La présence de Fe, élément métallique majoritaire dans nos échantillons, peut également expliquer l'induction des gènes impliqués dans la réponse au stress oxydant, comme NRF2. Ce résultat a précédemment été mis en évidence dans des études menées par Shafer et al (Shafer et al., 2010) et par Gualtieri et al (Gualtieri et al., 2011).

La présence d'autres éléments métalliques dans nos échantillons tels que Cu, associé à l'usure des pièces de véhicules ou les éléments V et de Ni issus de la combustion du fioul lourd, peut expliquer l'induction de gènes impliqués dans la réponse au stress oxydant, comme précédemment reportée par Cavanagh et al en 2009 (Cavanagh et al., 2009). La production intracellulaire de ERO est liée à la présence de métaux adsorbés à la surface de nos particules et peut expliquer la mise en place de la réponse antioxydante que nous observons, notamment via l'induction de NRF2, comme mis en avant par Deng et al en 2013 (Deng et al., 2013c)

Les résultats montrant la mise en place d'une réponse antioxydante sont aussi en accord avec les travaux de Araujo et al qui ont mis en évidence une induction de SOD2 dans les macrophages suite au stress oxydant généré notamment par les HAP adsorbés à la surface des particules (Araujo et al., 2008). Dans les particules caractérisées dans notre travail, une influence du trafic routier a été montrée. Les particules diesel sont composées de microsphérules de carbone, sur lesquelles sont adsorbés des HAP, parmi lesquels l'indéno[1,2,3-c,d]pyrène, le benzo[g,h,i]pérylène et le dibenz[a,h]anthracène (tableau 12). Ces chaînes de carbone sont retrouvées dans nos échantillons de PM_{2.5} (figure 45) et peuvent contribuer à l'induction de NRF2 dans les macrophages primaires (figure 61). L'exposition aux PM_{2.5} va également mener à l'activation de l'ARE induisant alors l'expression de gènes codant pour des enzymes anti-oxydantes, tels que SOD2. Cette activation de ARE est dépendante de NRF2 et est retrouvée, par exemple, chez des patients asthmatiques exposés à la pollution de l'air (Li et al., 2003). L'induction de NRF2 va de plus induire NQO1, contribuant alors aux défenses mises en place dans les poumons après exposition aux particules fines (Cho et al., 2002). NQO1 est impliqué dans la réduction des quinones (Nioi and Hayes, 2004). Son induction peut être liée à la présence de HAP, notamment du B[a]P présent dans les PM_{2.5} (Hockley et al., 2007).

Nos résultats montrent également une induction importante de CYP1B1, protéine impliquée dans la phase I de métabolisation (figures 52 et 61). Ce résultat était attendu, en accord avec la littérature, comme montré par Van Winckle et al dans leur étude sur des macrophages issus de LBA de sujets exposés aux PM_{2.5} (Van Winkle et al., 2015). CYP1B1 joue un rôle central dans l'activation métabolique et l'élimination des diverses classes de molécules de type HAP, retrouvées adsorbées à la surface des PM_{2.5}, pouvant entraîner la cancérogenèse (Nebert et al., 2004). L'induction de CYP1B1 dans les macrophages, comme obtenue dans notre étude, peut suggérer que l'AhR est activé après exposition aux PM_{2.5}. En effet, il a été montré que l'AhR était activé par les HAP, les PCDD et/ou les PCB Dioxin-

like (Rushmore and Kong, 2002), dans différents modèles cellulaires, tels que les HepG2 (Rushmore and Kong, 2002), les macrophages alvéolaires (Saint-Georges et al., 2008) ou les BEAS-2B (Lauer et al., 2009).

Par ailleurs, l'exposition aux $PM_{2.5}$ entraîne une inflammation caractérisée par une libération de cytokines, telles que le $TNF\alpha$, l' $IL1\beta$ ou encore l' $IL6$, comme l'ont montré les résultats que nous avons obtenus sur les macrophages primaires (figure 63). Ceci est en accord avec l'étude de Zhao et al qui a montré que l'exposition des macrophages murins aux $PM_{2.5}$ entraînait une sécrétion plus importante de $TNF\alpha$ et d' $IL1\beta$, suivie d'une production d' $IL6$ (Zhao et al., 2016). Ces résultats ont également été mis en avant dans de nombreuses études cette fois sur des macrophages alvéolaires humains, montrant aussi une induction génique de l' $IL1\beta$, du $TNF\alpha$ et de l' $IL6$ (van Eeden et al., 2001; Hiraiwa and van Eeden, 2013; Hogg and van Eeden, 2009; Manzano-León et al., 2016). Une autre cytokine pro-inflammatoire, l' $IL8$ (figure 63), voit sa sécrétion augmentée dans notre étude. Hogg et al ont mis en avant que cette cytokine est sécrétée en plus grande quantité suite à une exposition à la pollution de l'air (Hogg and van Eeden, 2009). L' $IL-8$ est produite en réponse à la détection d'agents microbiologiques ou chimiques potentiellement pathogènes, comme la plupart des composés contenus dans nos échantillons de $PM_{2.5}$. Le principal rôle de cette cytokine est d'assurer le recrutement des polynucléaires neutrophiles sur le site de l'infection par la création d'un gradient chimiotactique qui guide les cellules phagocytaires (Modi et al., 1990).

Comme mentionné précédemment, les éléments Fe et Al sont les métaux majoritaires présents dans les échantillons, suivis par le Pb, le V, le Ni ou encore le Cd. Outre leur implication dans la réponse au stress oxydant, ces métaux sont connus pour induire une augmentation des cytokines inflammatoires comme l' $IL6$ ou l' $IL8$ (Gioda et al., 2011), comme nous l'avons observé sur les macrophages primaires après exposition aux $PM_{2.5}$ (figure 63).

L'augmentation de la production de cytokines inflammatoires telles que l' $IL6$, l' $IL8$ ou encore l' $IL12$ (figures 50, 62 et 63) peut aussi être liée à la présence des HAP. Des résultats allant dans ce sens ont précédemment été reportés dans des études portant sur différents modèles cellulaires exposés aux particules fines. Ainsi, Goulaouic et al ont montré que les HAP augmentaient la production d' $IL8$ et d' $IL12$ dans les THP1 après exposition aux $PM_{2.5}$ pendant 24h et 48h (Goulaouic et al., 2008, 2008) et de $TNF\alpha$, d' $IL6$ et d' $IL8$ dans les BEAS-2B (Lauer et al., 2009) (Billet et al., 2007). De même, Cavanagh et al ont confirmé que le benzo[a]pyrène, le pyrène ou encore le benzo[b]floranthène, trois HAP retrouvés

dans les échantillons de particules, augmentaient la sécrétion de cytokines inflammatoires (Cavanagh et al., 2009).

La majeure partie des études portant sur l'effet des $PM_{2.5}$ sur les macrophages montrent une augmentation de la production de cytokines proinflammatoires telles que l'IL1 β , le TNF α ou encore l'IL6. Nos résultats confirment ces études et montrent également une augmentation de la production de la cytokine anti-inflammatoire IL10 et de la cytokine pro-inflammatoire IL12 dans les macrophages primaires. . Lorsque les macrophages se polarisent, ils ne se trouvent pas tous en M1 ou M2, il y a un mélange des deux phénotypes (Bardi et al., 2018), avec un basculement dans l'équilibre vers un type de macrophages ou l'autre, défini par le microenvironnement cellulaire. Le ratio entre l'IL10 et l'IL12 montre que l'IL10 est produite en quantité plus importante que l'IL12 (figure 64) suggérant un basculement des macrophages exposés vers le phénotype M2. De plus, l'analyse des marqueurs de surface (Figure 65) montre une induction génique et protéique à la fois du CD86 et du CD16, caractéristiques du phénotype M1, et du CD206, caractéristique du phénotype M2. L'exposition de macrophages primaires aux $PM_{2.5}$ mène donc à un mélange phénotypique de macrophages, produisant plus de cytokines de type M2. Ce phénomène est retrouvé dans des contextes proinflammatoires comme la BPCO (cf Chapitre I.D.2). Néanmoins, Zhao et al ont montré que l'exposition des macrophages murins aux particules fines entraînait une modification de la balance M1/M2, mais à l'inverse vers un phénotype de type M1. L'une des hypothèses que nous pouvons proposer pour expliquer la différence entre leurs résultats et les nôtres pourrait s'appuyer sur le fait qu'ils ont exposé les macrophages pendant 6h et que dans notre étude, nous avons choisi de travailler sur une durée d'exposition de 48h. De plus, une étude menée par Shaykhiev et al montre que l'exposition à la fumée de cigarettes, composée de gaz et de particules fines, induit un changement de phénotype des macrophages issus de LBA de sujets fumeurs en macrophages M2 (Shaykhiev et al., 2009).

Notre étude s'est poursuivie par la mesure de l'expression des miARN dans les macrophages primaires. Lorsque ces derniers sont exposés aux $PM_{2.5}$, trois miARN sont significativement diminués : let-7g, miR-29a et miR-193 (figure 66).

La famille des let-7 est une famille de miARN hautement conservée à travers les espèces, composée chez l'Homme de 13 membres et possédant de nombreux rôles physiologiques, comme la régulation de la prolifération et de la différenciation cellulaire. Le niveau de ces miARN est difficilement détectable durant l'embryogénèse alors qu'ils sont fortement

exprimés dans les tissus adultes. Ces miARN sont des répresseurs de nombreux oncogènes, ce qui explique qu'on les retrouve très souvent diminués dans de nombreux cancers. Dans certaines tumeurs, il arrive que l'expression de presque tous les membres de la famille let-7 soit diminuée comme dans les cancers du poumon. C'est alors un marqueur de mauvais pronostic (Takamizawa et al., 2004). La famille des let-7 possède de nombreux gènes cibles, dont BAX et BCL-XL, cibles de let-7g (Bao et al., 2013). Ces deux gènes codent respectivement pour une protéine pro-apoptotique et une protéine anti-apoptotique. La diminution de l'expression de let-7g peut conduire à une augmentation de l'expression de ces gènes cibles. Dans notre étude, nous observons une diminution de l'expression de let-7g dans les macrophages exposés aux PM_{2.5}, corrélé à une augmentation de l'expression de BAX et BCL-XL (figure 67) après exposition aux PM_{2.5}. De plus, la famille des let-7 est connue pour inhiber de façon directe l'expression de l'IL6 (Iliopoulos et al., 2009). A nouveau, nous pouvons lier les résultats que nous avons obtenus. L'expression de let-7g dans les macrophages est diminuée quand celle de l'IL6 est augmentée (figure 62).

miR-29a agit comme un suppresseur de tumeur dans les cancers du poumon en inhibant la prolifération des cellules tumorales. (Liu et al., 2018b). Il est impliqué dans la régulation de la prolifération, la survie cellulaire et la migration. Comme tous les miARN, miR-29a inhibe l'expression de plusieurs gènes. L'une de ses cibles est VEGFA, facteur de croissance vasculaire impliqué dans le processus d'angiogenèse lié à la tumorigénèse. Une étude de Xu et al a montré que VEGFA était induit dans les BEAS-2B et dans les cellules épithéliales bronchiques primaires après exposition aux PM_{2.5}. Nos résultats montrent à la fois une diminution de l'expression de miR-29a, et une augmentation de l'expression de VEGFA dans les macrophages primaires après exposition aux PM_{2.5} (figure 68), nous permettant de suggérer la diminution de l'effet inhibiteur de miR-29a sur l'expression de VEGFA. PTEN est une autre cible de miR-29a (Shen et al., 2016). Tout comme VEGFA, l'expression de PTEN augmente après exposition aux PM_{2.5}, augmentation qui peut être liée à la diminution de l'expression de miR-29a (figure 68).

miR-193 est un miARN suppresseur de tumeur, que l'on retrouve fréquemment diminué dans les cancers du poumon. Ce miARN possède plusieurs gènes cibles parmi lesquels ERBB4, un récepteur à tyrosines kinases, impliqué dans les cancers du poumon (Liang et al., 2014) ou PTEN (Liu et al., 2017). Nos résultats montrent une induction de PTEN, cible de miR-193 (figure 68). Ce résultat est donc corrélé avec le fait que ce miARN voit son expression diminuée après exposition aux PM_{2.5}.

L'ensemble de ces résultats peut être interprété comme l'un des premiers signes d'initiation de la cancérogénèse après exposition aux PM_{2.5}.

B. Effets de l'exposition des PM_{2.5} sur les EV libérées en réponse

Les mesures faites sur les EV libérées en réponse à l'exposition aux PM_{2.5}, à la fois par les THP1 et par les macrophages primaires, montrent une augmentation de la quantité d'EV, de façon dépendante du temps et de la concentration en particules (figures 56 et 69). Ce résultat a déjà été montré mais dans le sang d'individus. Ainsi Bonzini et al ont montré que le nombre d'EV était plus important dans le sang de sujets exposés à la pollution atmosphérique que dans le sang de patients non exposés (Bonzini et al., 2017). Nos résultats sont les premiers à montrer l'augmentation du nombre d'EV libérées par des macrophages exposés à des PM_{2.5}.

Pour déterminer si, en plus d'une augmentation du nombre d'EV, l'exposition aux PM_{2.5} entraînait un changement de leur composition, nous avons continué nos travaux par l'analyse protéique et le profil en miARN des EV. Nos résultats montrent la présence de deux marqueurs protéiques spécifiques des exosomes, CD63 et CD81, après exposition aux PM_{2.5} (figures 57 et 71). La présence d'exosomes dans les échantillons d'EV est confirmée par la mesure de leur taille (Figures 69 et 71).

Plusieurs études mettent en avant qu'une exposition aux PM_{2.5} modifie le profil en miARN des EV. Rodosthenous et al ont observé une corrélation entre l'exposition aux PM_{2.5} et l'augmentation des niveaux en miARN dans les EV isolés du sérum des participants à l'étude (Rodosthenous et al., 2016), notamment une augmentation des niveaux de miR-19b, miR-126, miR-93, miR-150, miR-15 ou encore let-7a. Une étude de Bollati et al a également mis en évidence que plusieurs miARN, dont miR-128, étaient augmentés à la fois dans les EV circulant dans le sang de travailleurs exposés aux PM_{2.5} et dans les EV libérées par des cellules A549 en réponse à l'exposition aux particules fines. Dans notre étude, nos résultats montrent une modification des quantités des miARN testés dans les EV de THP1 en fonction du temps et de la dose de PM_{2.5} (figure 58) mais pas de différence significative de celles des EV libérées par les macrophages primaires après exposition aux PM_{2.5} (tableau 21). La différence dans les résultats obtenus pourrait venir du fait que nous n'avons pas travaillé sur les mêmes modèles cellulaires et que nous n'avons pas testé autant de miARN que dans ces études. Cependant, nous pouvons noter une tendance à la baisse dans les niveaux de let-7g, miR-30a et miR-378 dans les EV libérées par les macrophages primaires exposés versus non exposés. Une étude précédente menée au

laboratoire a mis en évidence que le niveau de let-7g est diminué dans les EV de sujets fumeurs (Héliot et al., 2016). La diminution de let-7g dans les macrophages exposés aux PM_{2.5} pourrait se traduire par la tendance à la baisse du niveau de ce miARN observée dans les EV libérées par les macrophages primaires en réponse à l'exposition aux PM_{2.5}.

C. Effets des EV libérées par les macrophages sur les BEAS-2B

Les EV sont des médiateurs de la communication cellulaire. Elles véhiculent un message jusqu'à leur cellule cible. Nos résultats montrent qu'après exposition des BEAS-2B aux EV de THP1, les cellules exposées présentent une mortalité cellulaire très importante, et ceci indépendamment du temps d'exposition et de la concentration en PM_{2.5}. Ce résultat a été confirmé par le dosage de Fas soluble (sFas) dans les surnageants de culture des BEAS-2B exposées aux EV de THP1. sFas inhibe la liaison Fas-FasL entraînant alors le blocage de l'apoptose médiée par Fas. sFas est un antagoniste de FasL et régule la liaison de ce dernier avec Fas. La diminution que nous observons de la quantité de sFas entrainerait l'augmentation de la liaison Fas-FasL et l'apoptose des cellules (Yasuda et al., 1998). Le même type de résultats a été obtenu par Zhu et al qui ont mis en évidence que les EV libérées par des cellules tumorales du poumon induisaient l'apoptose des lymphocytes NK (Zhu et al., 2017). Il a également été montré que les EV libérées par des cellules tumorales étaient positives à Fas ligand et avaient alors la capacité d'induire l'apoptose des lymphocytes T CD8⁺ (Kim et al., 2005). En reliant ces études à nos résultats, nous avons émis l'hypothèse que le phénotype cancéreux des THP1 pouvait être responsable de la mort cellulaire entraînée par leurs EV sur les BEAS-2B.

En revanche, nos analyses sur les BEAS-2B après exposition aux EV de macrophages (mesure de l'expression génique et de la sécrétion des cytokines) ne montrent pas de différences significatives entre les cellules exposées aux EV libérées en réponse à l'exposition par rapport aux EV libérées par des macrophages non exposés aux PM_{2.5}. Nous pouvons nous demander si le fait de ne pas observer de modifications dans les EV, notamment dans les niveaux de miARN, pouvait expliquer le fait de ne pas obtenir de effets significatifs sur les BEAS-2B. Même si l'induction de l'IL1 β , l'IL6, l'IL8 et de SOD2 dans les cellules exposées au témoin « particules » a permis de conclure que les cellules réagissent normalement à ce stimulus, nous n'observons pas de différences significatives pour celles exposées aux EV. Nous mesurons cependant une tendance à la hausse dans la production d'IL6 et de TNF α par les BEAS-2B exposées aux EV libérées en réponse à l'exposition par rapport à celles exposées aux EV de macrophages non exposés aux PM_{2.5}.

A l'heure actuelle, il n'existe que peu d'études portant sur les EV et les PM_{2.5}. Une étude précédemment menée au laboratoire a porté sur les EV de sujets fumeurs et de sujets non-fumeurs (Héliot et al., 2016). La fumée de cigarette est composée en partie de particules fines. Cette étude a montré que les EV de sujets fumeurs induisaient la production d'IL6 et de TNF α par les BEAS-2B par rapport aux EV de non-fumeurs. Cet effet pro-inflammatoire des EV a déjà été mis en évidence dans d'autres types cellulaires. Ainsi une étude de Neri et al a mis en avant que les EV libérées par les monocytes entraînait une inflammation via la libération d'IL8 et l'activation de NF-kB dans les A549 (Neri et al., 2011). De même les EV sécrétées par des macrophages infectés par des pathogènes portent des PAMPs et ces EV lorsqu'elles sont en contact avec d'autres macrophages induisent dans ces derniers la production de TNF α et d'IL12 (Bhatnagar et al., 2007). Une étude de Lee et al a montré que les EV libérées par les cellules épithéliales entraînaient une inflammation dans les macrophages pulmonaires suite au transfert dans ces cellules de miARN comme miR-223 ou miR-320a (Lee et al., 2016).

Dans notre cas, nous n'avons observé qu'une tendance à la hausse de la production d'IL6 et de TNF α entre les BEAS-2B exposées aux EV libérées en réponse aux PM_{2.5} par rapport aux BEAS-2B exposées aux EV libérées par les macrophages témoins. Par ailleurs, nous n'avons pas de différence significative dans le niveau des miARN des EV. Nous pouvons supposer que l'absence de modifications dans les EV soit la raison du peu d'effets observés sur les BEAS-2B.

La mise en place d'une démarche expérimentale permettant d'évaluer les effets des EV de macrophages sur les cellules épithéliales est délicate, notamment par le peu de matériel biologique disponible, ce qui nous a limités dans le nombre de conditions expérimentales que nous avons pu tester. Il sera important d'envisager des évolutions méthodologiques à cette étude, parmi lesquelles celles proposées en perspectives à ce travail.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Ce projet de thèse avait plusieurs objectifs :

- déterminer la composition physico-chimique des échantillons de $PM_{2.5}$ prélevés sur une période de 12 mois et évaluer la variabilité saisonnière sur la composition de ces particules ;
- Étudier l'impact de l'exposition aux $PM_{2.5}$ sur la réponse immunitaire en particulier celle des monocytes/macrophages infiltrants. Examiner si un effet se traduit au niveau de leur polarisation ;
- évaluer la nature du message potentiel véhiculé par les EV produites par les macrophages en réponse à l'exposition sur des cellules épithéliales pulmonaires afin de savoir si ces EV peuvent contenir des biomarqueurs d'exposition et être considérées comme des messagers d'effets suite à l'exposition aux $PM_{2.5}$.

Un échantillonnage et une caractérisation physico-chimique approfondie des particules $PM_{0.3-2.5}$ collectées un site industrialo-urbain à Dunkerque ont été réalisés. Une période d'échantillonnage couvrant une année entière (mars 2014-mars 2015) a été considérée de manière à disposer d'un échantillon représentatif intégrant l'ensemble des sources qui contribuent à la concentration en particules. Ainsi, l'échantillon moyen annuel est par conséquent représentatif des particules $PM_{0.3-2.5}$ auxquelles la population de ce site d'étude est exposée. Dans notre approche, des échantillons couvrant la période de chacune des saisons ont également été caractérisés de manière à mettre en évidence d'éventuelles différences de composition et de contributions de sources au cours d'une année.

Sur la période mars 2014-mars 2015, la concentration moyenne de $PM_{2.5}$ était de $16,6 \mu\text{g}/\text{m}^3$, valeur qui correspond aux normales relevées à Dunkerque au cours de ces dix dernières années. La valeur est en-dessous de la valeur limite annuelle réglementaire de $25 \mu\text{g}/\text{m}^3$. Les niveaux de concentration de $PM_{2.5}$ apparaissent très fluctuants au cours de l'année, avec des valeurs journalières inférieures à $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$ et à l'inverse d'autres nettement plus élevées (max : $68 \mu\text{g}/\text{m}^3$) enregistrées lors d'épisodes de pollution aux particules. En effet, durant cette période de 12 mois, les procédures d'information et de recommandation ont été déclenchées pour 51 jours, dont 20 jours durant le printemps. Ces épisodes de pollution sont survenus en parallèle de conditions météorologiques anticycloniques favorisant l'accumulation des polluants atmosphériques.

Les constituants majoritaires des $PM_{0.3-2.5}$ sont le carbone total (14,3%), les ions inorganiques hydrosolubles (anions 23,6% et cations 11,3%), les éléments fer (3,8%) et aluminium (2,8%), qui représentent à eux seuls 56% de la masse de l'échantillon moyen.

Les ions inorganiques hydrosolubles sont dominés par les ions NO_3^- , SO_4^{2-} et NH_4^+ qui représentent au global près de 20% de la masse des $PM_{0.3-2.5}$. Ils correspondent très majoritairement à des composés secondaires issus respectivement de la conversion des oxydes d'azote NO_x , du dioxyde de soufre SO_2 et de l'ammoniac NH_3 . Les sels marins (Na^+ , Cl^- et Mg^{2+}) comptent en moyenne pour 10% de la masse des $PM_{0.3-2.5}$ et conservent davantage une forme d'entités fraîchement émises en automne et en hiver, alors qu'ils correspondent à des espèces anthropisées en été, suite à leur réaction dans l'atmosphère avec les oxydes d'azote et le dioxyde de soufre.

Les teneurs en éléments majeurs et traces s'expliquent par des contributions de sources naturelle et anthropique. Les niveaux de concentration des éléments Ca et Ti (Al dans une moindre mesure) s'expliquent majoritairement par des contributions crustales alors que les éléments traces métalliques proviennent principalement de sources anthropiques : trafic routier hors échappement pour Cu, Cr, Pb et Zn ; combustion de fioul lourd pour Ni, V et Co ; activité sidérurgique pour Fe, Mn et Cd. Les différences de teneurs de ces éléments d'une saison à l'autre semblent être principalement reliées aux directions de vent rencontrées, qui favorisent ou non un impact plus fréquent du site d'échantillonnage par certaines sources de particules.

Au niveau de la fraction carbonée, les teneurs en dioxines, furanes et polychlorobiphényles relevées au cours de la période sont comparables à celles relevées dans le cadre d'études antérieures menées à Dunkerque et comparables à celles d'autres sites urbains en Europe. L'exploitation de rapports caractéristiques de teneurs a permis d'identifier l'origine des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP). Leurs teneurs s'expliquent notamment par l'influence du trafic routier et par la combustion de biomasses (bois) et d'autres combustibles fossiles (charbon, fioul lourd). Les teneurs en HAP sont 3 à 4 fois plus élevées en automne-hiver par rapport à la période printemps-été, en raison d'un impact plus fort des émissions liées à l'usage de moyens de chauffage et au trafic routier. Des similitudes de profils chimiques des alcanes linéaires (paraffines) ressortent également en automne-hiver, avec une contribution mixte des sources naturelles et anthropiques. Pour la période printemps-été, les alcanes linéaires présentent principalement une origine naturelle venant en particulier des végétaux.

Le grand nombre d'espèces chimiques (éléments majeurs et traces métalliques, ions inorganiques hydrosolubles et composés organiques de différentes familles : HAP, alcanes

linéaires, dioxines, furanes, polychlorobiphényles) identifiées témoigne du cumul de sources qui contribuent à la teneur en $PM_{0.3-2.5}$ et des différents modes de formation des particules.

Dans la deuxième partie de ce travail de thèse, nous nous sommes proposés, pour la première fois au laboratoire, d'étudier l'effet des $PM_{2.5}$ sur le système immunitaire et plus particulièrement sur la réponse de macrophages infiltrants et des EV produites en réponse à une exposition aux particules fines. Nous avons procédé à des tests *in vitro*, d'abord sur une lignée cellulaire, les THP1, puis sur des macrophages primaires isolés de poches de sang de donneurs anonymes. A l'issue de ce travail, il apparait que les $PM_{2.5}$ ont la capacité d'induire *in vitro* de multiples réponses cellulaires. L'exposition aux $PM_{2.5}$ induit la mise en place d'une réponse antioxydante avec l'induction de gènes comme NRF2 ou SOD2 ou encore l'induction d'un gène codant pour une EMX, CYP1B1. Elle se traduit également par une augmentation de la production des cytokines IL1 β , TNF α , IL8, IL1ra et IL8 par les THP1 et des cytokines IL1 β , TNF α , IL6, IL8, IL12p40, IL4, IL13 et IL10 par les macrophages primaires. L'exposition aux $PM_{2.5}$ entraîne également une augmentation de la granulosité des macrophages, témoin du processus de phagocytose des particules. Elle modifie leur polarisation, faisant pencher la balance M1/M2 vers un phénotype M2, comme le suggère la diminution du ratio IL12/IL10. Néanmoins leur population est hétérogène entre M1 et M2, comme le montre la quantification des marqueurs de surface CD86, CD16 et CD206 par cytométrie en flux.

Ensuite, l'expression des miARN dans les THP1 et les macrophages primaires a été mesurée après exposition aux particules. Dans les THP1, il y a une grande variation dans l'expression des 12 miARN testés, dépendante du temps d'exposition et de la concentration en $PM_{2.5}$. Dans les macrophages primaires, 3 miARN sont diminués de façon significative (let-7g, miR-29a et miR-193), cette diminution est corrélée à l'augmentation significative de certains de leurs gènes cibles.

Concernant la production de vésicules extracellulaires, il a été montré une augmentation de leur nombre en réponse à l'exposition aux particules fines, et également une augmentation de la quantité de protéines dans les EV de THP1 et de macrophages primaires après exposition aux $PM_{2.5}$. Dans le cas des vésicules de THP1, une augmentation de CD63 et de CD81 ainsi qu'une modification des niveaux en miARN, en fonction du temps d'exposition et de la concentration en $PM_{2.5}$, a été constatée. Ces résultats montrent que les EV libérées en réponse à l'exposition aux $PM_{2.5}$ ont un contenu protéique et en miARN différent des EV libérées par des cellules témoins.

En revanche dans les macrophages primaires, il n'est pas apparu de différences significatives entre les miARN des EV libérées par des macrophages exposés et ceux des EV libérés par des macrophages non exposés aux PM_{2.5}. Néanmoins, nous avons observé une tendance à la baisse de 3 mi-ARN, comme let-7g, dont la diminution pourrait être reliée à celle mise en évidence dans les macrophages primaires.

Ensuite, les effets potentiels des EV libérées par les macrophages exposés aux PM_{2.5} sur des cellules épithéliales pulmonaires ont été étudiés. Les EV libérées par les THP1 entraînent une mort cellulaire importante des BEAS-2B, potentiellement due à la diminution de sFas dans les surnageants de culture. Quant aux EV libérées par les macrophages primaires, il semble qu'elles induisent un caractère pro-inflammatoire sur les BEAS-2B, puisqu'elles ont tendance à augmenter la production d'IL6 et d'IL1β, sans toutefois entraîner de différence sur l'expression des gènes ou des miARN testés. Cela peut être dû au fait que nous n'observons pas de différences marquées dans les EV, laissant alors supposer qu'il n'y aurait pas ou peu d'effets sur ces cellules.

Les conclusions de ces travaux de thèse ouvrent sur différentes perspectives :

- Dans notre étude, les analyses de cytométrie en flux ont montré que la population cellulaire isolée des poches de sang et ayant adhéré dans les flasques de culture n'était pas constituée uniquement de macrophages. De manière à augmenter le degré de pureté de la population d'intérêt, il serait intéressant de tester une méthode d'isolement des monocytes/macrophages plus sélective. Il peut ainsi être envisagé de travailler avec des billes couplées à des anticorps anti-CD14, permettant la sélection positive des monocytes à partir d'une population de PBMC.
- Dans le cadre de notre étude, nous avons travaillé sur 16 miARN retenus d'après une recherche bibliographique, en raison de leur implication dans la polarisation ou encore leur modification suite à une exposition aux particules fines ou dans des maladies pulmonaires. Compte tenu des modèles cellulaires sur lesquels nous avons travaillé et de la complexité de composition chimique des polluants particuliers considérés pour l'exposition, il serait intéressant d'augmenter le nombre de miARN testés dans les macrophages après exposition par une analyse transcriptomique. Cette analyse permettrait de cribler plusieurs centaines de miARN. Elle pourrait être réalisée au moyen de puces Affymetrix® GeneChip®

miRNA Arrays. Cette approche permettrait de mettre en évidence les miARN dont l'expression est modifiée par l'exposition aux PM_{2.5}, d'identifier les gènes cibles de ces miARN afin de mettre en évidence des mécanismes impliqués dans la réponse cellulaire à l'exposition aux particules fines.

- Pour les mêmes raisons, il serait également intéressant de pouvoir établir le profil en miARN et le profil protéique des EV libérées en réponse à l'exposition aux PM_{2.5}. Il serait fait appel à la même analyse transcriptomique que celle proposée pour les macrophages. Des méthodes de chromatographie couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS) sont particulièrement adaptées pour déterminer les modifications du profil protéique. Ces analyses permettraient de mettre en évidence des biomarqueurs d'exposition que l'on pourrait par la suite tester dans le sang de sujets exposés à la pollution atmosphérique.

- Après avoir validé cette évolution méthodologique, il serait intéressant de se pencher plus spécifiquement sur le rôle des constituants chimiques des particules sur la réponse des macrophages et la composition des vésicules libérées après exposition aux particules. Les échantillons saisonniers présentent des différences de composition chimique marquées, en particulier quand on compare les saisons automne-hiver et printemps-été. Ceux-ci pourraient donc être considérés pour les expositions envisagées, ce qui permettrait de mettre en évidence l'existence de potentielles différences de réponses cellulaires en fonction des saisons.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abbas, I., Saint-Georges, F., Billet, S., Verdin, A., Mulliez, P., Shirali, P., and Garçon, G. (2009). Air pollution particulate matter (PM_{2.5})-induced gene expression of volatile organic compound and/or polycyclic aromatic hydrocarbon-metabolizing enzymes in an in vitro coculture lung model. *Toxicol In Vitro* 23, 37–46.
- Abbas, I., Garçon, G., Saint-Georges, F., Andre, V., Gosset, P., Billet, S., Goff, J.L., Verdin, A., Mulliez, P., Sichel, F., et al. (2013). Polycyclic aromatic hydrocarbons within airborne particulate matter (PM_{2.5}) produced DNA bulky stable adducts in a human lung cell coculture model. *J Appl Toxicol* 33, 109–119.
- Abbas, I., Badran, G., Verdin, A., Ledoux, F., Roumié, M., Courcot, D., and Garçon, G. (2018). Polycyclic aromatic hydrocarbon derivatives in airborne particulate matter: sources, analysis and toxicity. *Environ Chem Lett* 16, 439–475.
- Abd-El-Fattah, A.A., Sadik, N.A.H., Shaker, O.G., and Aboulftouh, M.L. (2013). Differential microRNAs expression in serum of patients with lung cancer, pulmonary tuberculosis, and pneumonia. *Cell Biochem. Biophys.* 67, 875–884.
- Abels, E.R., and Breakefield, X.O. (2016). Introduction to Extracellular Vesicles: Biogenesis, RNA Cargo Selection, Content, Release, and Uptake. *Cell. Mol. Neurobiol.* 36, 301–312.
- Al-Nedawi, K., Meehan, B., Micallef, J., Lhotak, V., May, L., Guha, A., and Rak, J. (2008). Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells. *Nat. Cell Biol.* 10, 619–624.
- Al-Nedawi, K., Meehan, B., and Rak, J. (2009). Microvesicles: messengers and mediators of tumor progression. *Cell Cycle* 8, 2014–2018.
- Ambrogio, M., Saracco, G., Specchia, V., van Gulijk, C., Makkee, M., and Moulijn, J.A. (2002). On the generation of aerosol for diesel particulate filtration studies. *Separation and Purification Technology* 27, 195–209.
- Andaloussi, S.E., Mäger, I., Breakefield, X.O., and Wood, M.J.A. (2013). Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities. *Nature Reviews Drug Discovery* 12, 347–357.
- Anderson, J.M., Rodriguez, A., and Chang, D.T. (2008). Foreign body reaction to biomaterials. *Semin. Immunol.* 20, 86–100.
- Araujo, J.A., Barajas, B., Kleinman, M., Wang, X., Bennett, B.J., Gong, K.W., Navab, M., Harkema, J., Sioutas, C., Lusic, A.J., et al. (2008). Ambient Particulate Pollutants in the Ultrafine Range Promote Early Atherosclerosis and Systemic Oxidative Stress. *Circulation Research* 102, 589–596.
- Bao, M.-H., Feng, X., Zhang, Y.-W., Lou, X.-Y., Cheng, Y., and Zhou, H.-H. (2013). Let-7 in Cardiovascular Diseases, Heart Development and Cardiovascular Differentiation from Stem Cells. *Int J Mol Sci* 14, 23086–23102.
- Bardi, G.T., Smith, M.A., and Hood, J.L. (2018). Melanoma exosomes promote mixed M1 and M2 macrophage polarization. *Cytokine* 105, 63–72.
- Bargagli, E., Olivieri, C., Bennett, D., Prasse, A., Muller-Quernheim, J., and Rottoli, P. (2009). Oxidative stress in the pathogenesis of diffuse lung diseases: a review. *Respir Med* 103, 1245–1256.

- Barrès, C., Blanc, L., Bette-Bobillo, P., André, S., Mamoun, R., Gabius, H.-J., and Vidal, M. (2010). Galectin-5 is bound onto the surface of rat reticulocyte exosomes and modulates vesicle uptake by macrophages. *Blood* *115*, 696–705.
- Bauer, H., Claeys, M., Vermeulen, R., Schueller, E., Weinke, G., Berger, A., and Puxbaum, H. (2008). Arabitol and mannitol as tracers for the quantification of airborne fungal spores. *Atmospheric Environment* *42*, 588–593.
- Bauer, M., Gräbsch, C., Gminski, R., Ollmann, A.I.H., Borm, P., Dietz, A., Herbarth, O., and Wichmann, G. (2012). Cement-related particles interact with proinflammatory IL-8 chemokine from human primary oropharyngeal mucosa cells and human epithelial lung cancer cell line A549. *Environ. Toxicol.* *27*, 297–306.
- Bell, M.L., Davis, D.L., and Fletcher, T. (2004). A retrospective assessment of mortality from the London smog episode of 1952: The role of influenza and pollution. *Environmental Health Perspectives* *112*, 6–8.
- Bellingham, S.A., Guo, B.B., Coleman, B.M., and Hill, A.F. (2012). Exosomes: vehicles for the transfer of toxic proteins associated with neurodegenerative diseases? *Front Physiol* *3*, 124.
- Benedikter, B.J., Wouters, E.F.M., Savelkoul, P.H.M., Rohde, G.G.U., and Stassen, F.R.M. (2018). Extracellular vesicles released in response to respiratory exposures: implications for chronic disease. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 1–19.
- Berlanga, P., Muñoz, L., Piqueras, M., Sirerol, J.A., Sánchez-Izquierdo, M.D., Hervás, D., Hernández, M., Llavador, M., Machado, I., Llombart-Bosch, A., et al. (2016). miR-200c and phospho-AKT as prognostic factors and mediators of osteosarcoma progression and lung metastasis. *Mol Oncol* *10*, 1043–1053.
- Besse, B., Charrier, M., Lapiere, V., Dansin, E., Lantz, O., Planchard, D., Le Chevalier, T., Livartoski, A., Barlesi, F., Laplanche, A., et al. (2016). Dendritic cell-derived exosomes as maintenance immunotherapy after first line chemotherapy in NSCLC. *Oncoimmunology* *5*, e1071008.
- Bhagirath, D., Yang, T.L., Bucay, N., Sekhon, K., Majid, S., Shahryari, V., Dahiya, R., Tanaka, Y., and Saini, S. (2018). microRNA-1246 Is an Exosomal Biomarker for Aggressive Prostate Cancer. *Cancer Res.* *78*, 1833–1844.
- Bhatnagar, S., Shinagawa, K., Castellino, F.J., and Schorey, J.S. (2007). Exosomes released from macrophages infected with intracellular pathogens stimulate a proinflammatory response in vitro and in vivo. *Blood* *110*, 3234–3244.
- Billet, S., Garçon, G., Dagher, Z., Verdin, A., Ledoux, F., Cazier, F., Courcot, D., Aboukais, A., and Shirali, P. (2007). Ambient particulate matter (PM_{2.5}): Physicochemical characterization and metabolic activation of the organic fraction in human lung epithelial cells (A549). *Environmental Research* *105*, 212–223.
- Bliefer, C., and Perraud, R. (2009). *Chimie de l'environnement* (De Boeck Université, Bruxelles).
- Bobrie, A., Krumeich, S., Rey, F., Recchi, C., Moita, L.F., Seabra, M.C., Ostrowski, M., and Théry, C. (2012). Rab27a supports exosome-dependent and -independent mechanisms that modify the tumor microenvironment and can promote tumor progression. *Cancer Res.* *72*, 4920–4930.
- Boeri, M., Verri, C., Conte, D., Roz, L., Modena, P., Facchinetti, F., Calabrò, E., Croce, C.M., Pastorino, U., and Sozzi, G. (2011). MicroRNA signatures in tissues and plasma predict development and

prognosis of computed tomography detected lung cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *108*, 3713–3718.

Bollati, V., Marinelli, B., Apostoli, P., Bonzini, M., Nordio, F., Hoxha, M., Pegoraro, V., Motta, V., Tarantini, L., Cantone, L., et al. (2010). Exposure to metal-rich particulate matter modifies the expression of candidate microRNAs in peripheral blood leukocytes. *Environ. Health Perspect.* *118*, 763–768.

Bollati, V., Angelici, L., Rizzo, G., Pergoli, L., Rota, F., Hoxha, M., Nordio, F., Bonzini, M., Tarantini, L., Cantone, L., et al. (2014). Microvesicle-associated microRNA expression is altered upon particulate matter exposure in healthy workers and in A549 cells: Particulate matter exposure and microvesicles. *Journal of Applied Toxicology* n/a-n/a.

Bonzini, M., Pergoli, L., Cantone, L., Hoxha, M., Spinazzè, A., Del Buono, L., Favero, C., Carugno, M., Angelici, L., Broggi, L., et al. (2017). Short-term particulate matter exposure induces extracellular vesicle release in overweight subjects. *Environmental Research* *155*, 228–234.

Buesseler, K.O., Bauer, J.E., Chen, R.F., Eglinton, T.I., Gustafsson, O., Landing, W., Mopper, K., Moran, S.B., Santschi, P.H., VernonClark, R., et al. (1996). An intercomparison of cross-flow filtration techniques used for sampling marine colloids: Overview and organic carbon results. *Marine Chemistry* *55*, 1–31.

Bui, P.H., Hsu, E.L., and Hankinson, O. (2009). Fatty acid hydroperoxides support cytochrome P450 2S1-mediated bioactivation of benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol. *Mol. Pharmacol.* *76*, 1044–1052.

Busch, B., Bley, N., Müller, S., Glaß, M., Misiak, D., Lederer, M., Vetter, M., Strauß, H.-G., Thomssen, C., and Hüttelmaier, S. (2016). The oncogenic triangle of HMGA2, LIN28B and IGF2BP1 antagonizes tumor-suppressive actions of the let-7 family. *Nucleic Acids Res* *44*, 3845–3864.

Buzas, E.I., György, B., Nagy, G., Falus, A., and Gay, S. (2014). Emerging role of extracellular vesicles in inflammatory diseases. *Nat Rev Rheumatol* *10*, 356–364.

Cao, R., Wu, W., Zhou, X., Liu, K., Li, B., Huang, X., Zhang, Y., and Liu, H. (2015). Let-7g induces granulosa cell apoptosis by targeting MAP3K1 in the porcine ovary. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *68*, 148–157.

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. *Experimental and Toxicologic Pathology* *57*, 189–204.

Cavanagh, J.-A.E., Trought, K., Brown, L., and Duggan, S. (2009). Exploratory investigation of the chemical characteristics and relative toxicity of ambient air particulates from two New Zealand cities. *Sci. Total Environ.* *407*, 5007–5018.

Cazzoli, R., Buttitta, F., Di Nicola, M., Malatesta, S., Marchetti, A., Rom, W.N., and Pass, H.I. (2013). microRNAs Derived from Circulating Exosomes as Noninvasive Biomarkers for Screening and Diagnosing Lung Cancer: *Journal of Thoracic Oncology* *8*, 1156–1162.

Chae, D.-K., Ban, E., Yoo, Y.S., Kim, E.E., Baik, J.-H., and Song, E.J. (2017). MIR-27a regulates the TGF- β signaling pathway by targeting SMAD2 and SMAD4 in lung cancer. *Mol. Carcinog.* *56*, 1992–1998.

Chen, J., Hu, C., and Pan, P. (2017). Extracellular Vesicle MicroRNA Transfer in Lung Diseases. *Front Physiol* *8*, 1028.

- Chen, L., Xiao, H., Wang, Z.-H., Huang, Y., Liu, Z.-P., Ren, H., and Song, H. (2014). miR-29a suppresses growth and invasion of gastric cancer cells in vitro by targeting VEGF-A. *BMB Rep* 47, 39–44.
- Chen, R., Li, H., Cai, J., Wang, C., Lin, Z., Liu, C., Niu, Y., Zhao, Z., Li, W., and Kan, H. (2018). Fine Particulate Air Pollution and the Expression of microRNAs and Circulating Cytokines Relevant to Inflammation, Coagulation, and Vasoconstriction. *Environ. Health Perspect.* 126, 017007.
- Cho, H.-Y., Jedlicka, A.E., Reddy, S.P.M., Kensler, T.W., Yamamoto, M., Zhang, L.-Y., and Kleeberger, S.R. (2002). Role of NRF2 in protection against hyperoxic lung injury in mice. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 26, 175–182.
- Coakley, G., Maizels, R.M., and Buck, A.H. (2015). Exosomes and Other Extracellular Vesicles: The New Communicators in Parasite Infections. *Trends Parasitol.* 31, 477–489.
- Cobos Jiménez, V., Bradley, E.J., Willemsen, A.M., van Kampen, A.H.C., Baas, F., and Kootstra, N.A. (2014). Next-generation sequencing of microRNAs uncovers expression signatures in polarized macrophages. *Physiol. Genomics* 46, 91–103.
- Cocucci, E., and Meldolesi, J. (2015). Ectosomes and exosomes: shedding the confusion between extracellular vesicles. *Trends in Cell Biology* 25, 364–372.
- Colombo, M., Raposo, G., and Théry, C. (2014). Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 30, 255–289.
- Corcoran, C., Rani, S., and O’Driscoll, L. (2014). miR-34a is an intracellular and exosomal predictive biomarker for response to docetaxel with clinical relevance to prostate cancer progression. *Prostate* 74, 1320–1334.
- Cyrus, J., Stölzel, M., Heinrich, J., Kreyling, W.G., Menzel, N., Wittmaack, K., Tuch, T., and Wichmann, H.-E. (2003). Elemental composition and sources of fine and ultrafine ambient particles in Erfurt, Germany. *Sci. Total Environ.* 305, 143–156.
- Dai, J., Chen, W., Lin, Y., Wang, S., Guo, X., and Zhang, Q.-Q. (2017). Exposure to Concentrated Ambient Fine Particulate Matter Induces Vascular Endothelial Dysfunction via miR-21. *Int. J. Biol. Sci.* 13, 868–877.
- Dall’Osto, M., Booth, M.J., Smith, W., Fisher, R., and Harrison, R.M. (2008). A Study of the Size Distributions and the Chemical Characterization of Airborne Particles in the Vicinity of a Large Integrated Steelworks. *Aerosol Science and Technology* 42, 981–991.
- Demetriou, C.A., Raaschou-Nielsen, O., Loft, S., Møller, P., Vermeulen, R., Palli, D., Chadeau-Hyam, M., Xun, W.W., and Vineis, P. (2012). Biomarkers of ambient air pollution and lung cancer: a systematic review. *Occup Environ Med* 69, 619–627.
- Deng, X., Zhang, F., Rui, W., Long, F., Wang, L., Feng, Z., Chen, D., and Ding, W. (2013a). PM2.5-induced oxidative stress triggers autophagy in human lung epithelial A549 cells. *Toxicol In Vitro* 27, 1762–1770.
- Deng, X., Zhang, F., Rui, W., Long, F., Wang, L., Feng, Z., Chen, D., and Ding, W. (2013b). PM2.5-induced oxidative stress triggers autophagy in human lung epithelial A549 cells. *Toxicol In Vitro* 27, 1762–1770.

- Deng, X., Rui, W., Zhang, F., and Ding, W. (2013c). PM_{2.5} induces Nrf2-mediated defense mechanisms against oxidative stress by activating PIK3/AKT signaling pathway in human lung alveolar epithelial A549 cells. *Cell Biol Toxicol* 29, 143–157.
- Dergham, M., Lepers, C., Verdin, A., Billet, S., Cazier, F., Courcot, D., Shirali, P., and Garçon, G. (2012). Prooxidant and proinflammatory potency of air pollution particulate matter (PM_{2.5-0.3}) produced in rural, urban, or industrial surroundings in human bronchial epithelial cells (BEAS-2B). *Chem. Res. Toxicol.* 25, 904–919.
- Di, Q., Wang, Y., Zanobetti, A., Wang, Y., Koutrakis, P., Choirat, C., Dominici, F., and Schwartz, J.D. (2017). Air Pollution and Mortality in the Medicare Population. *N. Engl. J. Med.* 376, 2513–2522.
- Ding, and Kaminsky (2003). Human Extrahepatic Cytochromes P450: Function in Xenobiotic Metabolism and Tissue-Selective Chemical Toxicity in the Respiratory and Gastrointestinal Tracts | *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*.
- Doherty, G.J., and McMahon, H.T. (2009). Mechanisms of endocytosis. *Annu. Rev. Biochem.* 78, 857–902.
- Edgar, J.R. (2016). Q&A: What are exosomes, exactly? *BMC Biol.* 14, 46.
- Edwards, J.P., Zhang, X., Frauwirth, K.A., and Mosser, D.M. (2006). Biochemical and functional characterization of three activated macrophage populations. *J. Leukoc. Biol.* 80, 1298–1307.
- van Eeden, S.F., Tan, W.C., Suwa, T., Mukae, H., Terashima, T., Fujii, T., Qui, D., Vincent, R., and Hogg, J.C. (2001). Cytokines involved in the systemic inflammatory response induced by exposure to particulate matter air pollutants (PM(10)). *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 164, 826–830.
- Ehrchen, J., Steinmuller, L., Barczyk, K., Tenbrock, K., Nacken, W., Eisenacher, M., Nordhues, U., Sorg, C., Sunderkotter, C., and Roth, J. (2006). Glucocorticoids induce differentiation of a specifically activated, anti-inflammatory subtype of human monocytes. *Blood* 109, 1265–1274.
- Emmrechts, J., Jacobs, L., Van Kerckhoven, S., Loyen, S., Mathieu, C., Fierens, F., Nemery, B., Nawrot, T.S., and Hoylaerts, M.F. (2012). Air pollution-associated procoagulant changes: the role of circulating microvesicles. *J. Thromb. Haemost.* 10, 96–106.
- Evelyn, J. (1661). *Fumifugium, or, The inconveniencie of the aer and smoak of London dissipated together with some remedies humbly proposed / by J.E. esq. to His Sacred Majestie, and to the Parliament now assembled.*
- Fahy, O., Sénéchal, S., Pène, J., Scherpereel, A., Lassalle, P., Tonnel, A.-B., Yssel, H., Wallaert, B., and Tsicopoulos, A. (2002). Diesel exposure favors Th2 cell recruitment by mononuclear cells and alveolar macrophages from allergic patients by differentially regulating macrophage-derived chemokine and IFN-gamma-induced protein-10 production. *J. Immunol.* 168, 5912–5919.
- Fathi, M., Johansson, A., Lundborg, M., Orre, L., Sköld, C.M., and Camner, P. (2001). Functional and morphological differences between human alveolar and interstitial macrophages. *Exp. Mol. Pathol.* 70, 77–82.
- Feng, D., Zhao, W.-L., Ye, Y.-Y., Bai, X.-C., Liu, R.-Q., Chang, L.-F., Zhou, Q., and Sui, S.-F. (2010). Cellular internalization of exosomes occurs through phagocytosis. *Traffic* 11, 675–687.
- Fevrier, B., Vilette, D., Archer, F., Loew, D., Faigle, W., Vidal, M., Laude, H., and Raposo, G. (2004). Cells release prions in association with exosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 9683–9688.

- Fitzner, D., Schnaars, M., van Rossum, D., Krishnamoorthy, G., Dibaj, P., Bakhti, M., Regen, T., Hanisch, U.-K., and Simons, M. (2011). Selective transfer of exosomes from oligodendrocytes to microglia by macropinocytosis. *J. Cell. Sci.* *124*, 447–458.
- Fong, M.Y., Zhou, W., Liu, L., Alontaga, A.Y., Chandra, M., Ashby, J., Chow, A., O'Connor, S.T.F., Li, S., Chin, A.R., et al. (2015). Breast-cancer-secreted miR-122 reprograms glucose metabolism in premetastatic niche to promote metastasis. *Nat. Cell Biol.* *17*, 183–194.
- Fortoul, T.I., Rodriguez-Lara, V., Gonzalez-Villalva, A., Rojas-Lemus, M., Colin-Barenque, L., Bizarro-Nevarés, P., García-Peláez, I., Ustarroz-Cano, M., López-Zepeda, S., Cervantes-Yépez, S., et al. (2015). Health Effects of Metals in Particulate Matter. *Current Air Quality Issues*.
- Frühbeis, C., Fröhlich, D., Kuo, W.P., Amphornrat, J., Thilemann, S., Saab, A.S., Kirchhoff, F., Möbius, W., Goebels, S., Nave, K.-A., et al. (2013). Neurotransmitter-triggered transfer of exosomes mediates oligodendrocyte-neuron communication. *PLoS Biol.* *11*, e1001604.
- Frydrychowicz, M., Kolecka-Bednarczyk, A., Madejczyk, M., Yasar, S., and Dworacki, G. (2014). Exosomes - structure, biogenesis and biological role in non small cell lung cancer. *Scandinavian Journal of Immunology* n/a-n/a.
- Fubini, B., and Hubbard, A. (2003). Reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) generation by silica in inflammation and fibrosis. *Free Radical Biology and Medicine* *34*, 1507–1516.
- van Furth, R., and Cohn, Z.A. (1968). The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. *J. Exp. Med.* *128*, 415–435.
- Galli, S.J., Borregaard, N., and Wynn, T.A. (2011). Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity: macrophages, mast cells and neutrophils. *Nat. Immunol.* *12*, 1035–1044.
- Gardes-Albert, M, Bonnefont-Rousselot, D, Abedinzadeh, Z, and Jore, D (2003). Espèces réactives de l'oxygène : comment l'oxygène peut-il devenir toxique ? - L'Actualité Chimique.
- Gawda, A., Majka, G., Nowak, B., Śróttek, M., Walczewska, M., and Marcinkiewicz, J. (2018). Air particulate matter SRM 1648a primes macrophages to hyperinflammatory response after LPS stimulation. *Inflamm. Res.*
- Gee, H.E., Buffa, F.M., Camps, C., Ramachandran, A., Leek, R., Taylor, M., Patil, M., Sheldon, H., Betts, G., Homer, J., et al. (2011). The small-nucleolar RNAs commonly used for microRNA normalisation correlate with tumour pathology and prognosis. *Br J Cancer* *104*, 1168–1177.
- Gibbins, D.J., Ciaudo, C., Erhardt, M., and Voinnet, O. (2009). Multivesicular bodies associate with components of miRNA effector complexes and modulate miRNA activity. *Nat. Cell Biol.* *11*, 1143–1149.
- Gietl, J.K., Lawrence, R., Thorpe, A.J., and Harrison, R.M. (2010). Identification of brake wear particles and derivation of a quantitative tracer for brake dust at a major road. *Atmospheric Environment* *44*, 141–146.
- Gioda, A., Fuentes-Mattei, E., and Jimenez-Velezb, B. (2011). Evaluation of cytokine expression in BEAS cells exposed to fine particulate matter (PM2.5) from specialized indoor environments. *Int J Environ Health Res* *21*, 106–119.

- Goto, Y., Ishii, H., Hogg, J.C., Shih, C.-H., Yatera, K., Vincent, R., and van Eeden, S.F. (2004). Particulate Matter Air Pollution Stimulates Monocyte Release from the Bone Marrow. *Am J Respir Crit Care Med* 170, 891–897.
- Goulaouic, S., Foucaud, L., Bennasroune, A., Laval-Gilly, P., and Falla, J. (2008). Effect of polycyclic aromatic hydrocarbons and carbon black particles on pro-inflammatory cytokine secretion: impact of PAH coating onto particles. *J Immunotoxicol* 5, 337–345.
- Graff, J.W., Dickson, A.M., Clay, G., McCaffrey, A.P., and Wilson, M.E. (2012). Identifying functional microRNAs in macrophages with polarized phenotypes. *J. Biol. Chem.* 287, 21816–21825.
- Grimmer, G., Brune, H., Dettbarn, G., Jacob, J., Misfeld, J., Mohr, U., Naujack, K.-W., Timm, J., and Wenzel-Hartung, R. (1991). Relevance of polycyclic aromatic hydrocarbons as environmental carcinogens. *Fresenius J Anal Chem* 339, 792–795.
- Gu, Y., Liu, S., Zhang, X., Chen, G., Liang, H., Yu, M., Liao, Z., Zhou, Y., Zhang, C.-Y., Wang, T., et al. (2017). Oncogenic miR-19a and miR-19b co-regulate tumor suppressor MTUS1 to promote cell proliferation and migration in lung cancer. *Protein Cell* 8, 455–466.
- Gualtieri, M., Ovrevik, J., Mollerup, S., Asare, N., Longhin, E., Dahlman, H.-J., Camatini, M., and Holme, J.A. (2011). Airborne urban particles (Milan winter-PM2.5) cause mitotic arrest and cell death: Effects on DNA, mitochondria, AhR binding and spindle organization. *Mutat. Res.* 713, 18–31.
- Gualtieri, M., Ledoux, F., Verdin, A., Billet, S., Martin, P., and Courcot, D. (2017). Particulate Matter Physico-Chemical Characterization and in vitro Toxicological Effects. p.
- Hagiwara, K., Ochiya, T., and Kosaka, N. (2014). A paradigm shift for extracellular vesicles as small RNA carriers: from cellular waste elimination to therapeutic applications. *Drug Deliv Transl Res* 4, 31–37.
- Hamad, S.H., Schauer, J.J., Antkiewicz, D.S., Shafer, M.M., and Kadhim, A.K. (2016). ROS production and gene expression in alveolar macrophages exposed to PM2.5 from Baghdad, Iraq: Seasonal trends and impact of chemical composition. *Science of The Total Environment* 543, 739–745.
- Han, M., Wang, F., Gu, Y., Pei, X., Guo, G., Yu, C., Li, L., Zhu, M., Xiong, Y., and Wang, Y. (2016). MicroRNA-21 induces breast cancer cell invasion and migration by suppressing smad7 via EGF and TGF- β pathways. *Oncol. Rep.* 35, 73–80.
- He, L., and Hannon, G.J. (2004). MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat. Rev. Genet.* 5, 522–531.
- He, M., Ichinose, T., Yoshida, S., Ito, T., He, C., Yoshida, Y., Arashidani, K., Takano, H., Sun, G., and Shibamoto, T. (2017). PM2.5-induced lung inflammation in mice: Differences of inflammatory response in macrophages and type II alveolar cells. *J Appl Toxicol* 37, 1203–1218.
- He, Y., Deng, F., Yang, S., Wang, D., Chen, X., Zhong, S., Zhao, J., and Tang, J. (2018). Exosomal microRNA: a novel biomarker for breast cancer. *Biomark Med* 12, 177–188.
- Héliot, A., Landkocz, Y., Roy Saint-Georges, F., Gosset, P., Billet, S., Shirali, P., Courcot, D., and Martin, P.J. (2016). Smoker extracellular vesicles influence status of human bronchial epithelial cells. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*.

- Héliot, A., Landkocz, Y., Roy Saint-Georges, F., Gosset, P., Billet, S., Shirali, P., Courcot, D., and Martin, P.J. (2017). Smoker extracellular vesicles influence status of human bronchial epithelial cells. *Int J Hyg Environ Health* 220, 445–454.
- Hiraiwa, K., and van Eeden, S.F. (2013). Contribution of lung macrophages to the inflammatory responses induced by exposure to air pollutants. *Mediators Inflamm.* 2013, 619523.
- Hleis, D., Fernández-Olmo, I., Ledoux, F., Kfoury, A., Courcot, L., Desmots, T., and Courcot, D. (2013). Chemical profile identification of fugitive and confined particle emissions from an integrated iron and steelmaking plant. *Journal of Hazardous Materials* 250–251, 246–255.
- Hockley, S.L., Arlt, V.M., Brewer, D., Te Poele, R., Workman, P., Giddings, I., and Phillips, D.H. (2007). AHR- and DNA-damage-mediated gene expression responses induced by benzo(a)pyrene in human cell lines. *Chem. Res. Toxicol.* 20, 1797–1810.
- Hodgson, E (2004). *A Textbook of Modern Toxicology* | Wiley Online Books.
- Hogg, J.C., and van Eeden, S. (2009). Pulmonary and systemic response to atmospheric pollution. *Respirology* 14, 336–346.
- Holian, A., Hamilton, R.F., Morandi, M.T., Brown, S.D., and Li, L. (1998). Urban particle-induced apoptosis and phenotype shifts in human alveolar macrophages. *Environ. Health Perspect.* 106, 127–132.
- Hou, T., Liao, J., Zhang, C., Sun, C., Li, X., and Wang, G. (2018). Elevated expression of miR-146, miR-139 and miR-340 involved in regulating Th1/Th2 balance with acute exposure of fine particulate matter in mice. *Int. Immunopharmacol.* 54, 68–77.
- Huang, S.-H., Li, Y., Zhang, J., Rong, J., and Ye, S. (2013). Epidermal growth factor receptor-containing exosomes induce tumor-specific regulatory T cells. *Cancer Invest.* 31, 330–335.
- Huang-Doran, I., Zhang, C.-Y., and Vidal-Puig, A. (2017). Extracellular Vesicles: Novel Mediators of Cell Communication In Metabolic Disease. *Trends Endocrinol. Metab.* 28, 3–18.
- Ilacqua, V., Hänninen, O., Saarela, K., Katsouyanni, K., Künzli, N., and Jantunen, M. (2007). Source apportionment of population representative samples of PM_{2.5} in three European cities using structural equation modelling. *Science of The Total Environment* 384, 77–92.
- Iliopoulos, D., Hirsch, H.A., and Struhl, K. (2009). An epigenetic switch involving NF- κ B, Lin28, Let-7 MicroRNA, and IL6 links inflammation to cell transformation. *Cell* 139, 693–706.
- INERIS (2011). *Données technico-économiques sur les substances chimiques en France : Les polyChloroBiphenyles.*
- Iraci, N., Gaude, E., Leonardi, T., Costa, A.S.H., Cossetti, C., Peruzzotti-Jametti, L., Bernstock, J.D., Saini, H.K., Gelati, M., Vescovi, A.L., et al. (2017). Extracellular vesicles are independent metabolic units with asparaginase activity. *Nat. Chem. Biol.* 13, 951–955.
- Jaguin, M., Fardel, O., and Lecureur, V. (2015). Exposure to diesel exhaust particle extracts (DEPe) impairs some polarization markers and functions of human macrophages through activation of AhR and Nrf2. *PLoS ONE* 10, e0116560.
- Janssen, N.A.H., Yang, A., Strak, M., Steenhof, M., Hellack, B., Gerlofs-Nijland, M.E., Kuhlbusch, T., Kelly, F., Harrison, R., Brunekreef, B., et al. (2014). Oxidative potential of particulate matter collected at sites with different source characteristics. *Science of The Total Environment* 472, 572–581.

- Jia, Y.-Y., Wang, Q., and Liu, T. (2017). Toxicity Research of PM_{2.5} Compositions in Vitro. *Int J Environ Res Public Health* *14*.
- Jin, X., Xue, B., Zhou, Q., Su, R., and Li, Z. (2018). Mitochondrial damage mediated by ROS incurs bronchial epithelial cell apoptosis upon ambient PM_{2.5} exposure. *J Toxicol Sci* *43*, 101–111.
- Kahlert, C., and Kalluri, R. (2013). Exosomes in tumor microenvironment influence cancer progression and metastasis. *J. Mol. Med.* *91*, 431–437.
- Kalra, H., Drummen, G.P.C., and Mathivanan, S. (2016). Focus on Extracellular Vesicles: Introducing the Next Small Big Thing. *International Journal of Molecular Sciences* *17*, 170.
- Kanaoka, R., Iinuma, H., Dejima, H., Sakai, T., Uehara, H., Matsutani, N., and Kawamura, M. (2018). Usefulness of Plasma Exosomal MicroRNA-451a as a Noninvasive Biomarker for Early Prediction of Recurrence and Prognosis of Non-Small Cell Lung Cancer. *Oncology* *94*, 311–323.
- Kawanaka, Y., Tsuchiya, Y., Yun, S.-J., and Sakamoto, K. (2009). Size Distributions of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Atmosphere and Estimation of the Contribution of Ultrafine Particles to Their Lung Deposition. *Environ. Sci. Technol.* *43*, 6851–6856.
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H., and Currie, A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* *26*, 239–257.
- Kfoury, A., Ledoux, F., Roche, C., Delmaire, G., Roussel, G., and Courcot, D. (2016a). PM_{2.5} source apportionment in a French urban coastal site under steelworks emission influences using constrained non-negative matrix factorization receptor model. *Journal of Environmental Sciences* *40*, 114–128.
- Kfoury, A., Ledoux, F., Roche, C., Delmaire, G., Roussel, G., and Courcot, D. (2016b). PM_{2.5} source apportionment in a French urban coastal site under steelworks emission influences using constrained non-negative matrix factorization receptor model. *J Environ Sci (China)* *40*, 114–128.
- Kim, J.W., Wieckowski, E., Taylor, D.D., Reichert, T.E., Watkins, S., and Whiteside, T.L. (2005). Fas ligand-positive membranous vesicles isolated from sera of patients with oral cancer induce apoptosis of activated T lymphocytes. *Clin. Cancer Res.* *11*, 1010–1020.
- Kim, M., Chen, X., Chin, L.J., Paranjape, T., Speed, W.C., Kidd, K.K., Zhao, H., Weidhaas, J.B., and Slack, F.J. (2014). Extensive sequence variation in the 3' untranslated region of the KRAS gene in lung and ovarian cancer cases. *Cell Cycle* *13*, 1030–1040.
- Kocbach, A., Namork, E., and Schwarze, P.E. (2008). Pro-inflammatory potential of wood smoke and traffic-derived particles in a monocytic cell line. *Toxicology* *247*, 123–132.
- Kowal, J., Tkach, M., and Théry, C. (2014). Biogenesis and secretion of exosomes. *Current Opinion in Cell Biology* *29*, 116–125.
- Krichevsky, A.M., and Gabriely, G. (2009). miR-21: a small multi-faceted RNA. *J Cell Mol Med* *13*, 39–53.
- Kumar, S., Sinha, N., Gerth, K.A., Rahman, M.A., Yallapu, M.M., and Midde, N.M. (2017). Specific packaging and circulation of cytochromes P450, especially 2E1 isozyme, in human plasma exosomes and their implications in cellular communications. *Biochem Biophys Res Commun* *491*, 675–680.
- van de Laar, L., Saelens, W., De Prijck, S., Martens, L., Scott, C.L., Van Isterdael, G., Hoffmann, E., Beyaert, R., Saeys, Y., Lambrecht, B.N., et al. (2016). Yolk Sac Macrophages, Fetal Liver, and Adult

Monocytes Can Colonize an Empty Niche and Develop into Functional Tissue-Resident Macrophages. *Immunity* 44, 755–768.

Lacey, D.C., Achuthan, A., Fleetwood, A.J., Dinh, H., Roiniotis, J., Scholz, G.M., Chang, M.W., Beckman, S.K., Cook, A.D., and Hamilton, J.A. (2012). Defining GM-CSF- and macrophage-CSF-dependent macrophage responses by in vitro models. *J. Immunol.* 188, 5752–5765.

Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W., and Tuschl, T. (2001). Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* 294, 853–858.

Lakhdar, R., Denden, S., Kassab, A., Leban, N., Knani, J., Lefranc, G., Miled, A., Chibani, J.B., and Khelil, A.H. (2011). Update in chronic obstructive pulmonary disease: role of antioxidant and metabolizing gene polymorphisms. *Exp. Lung Res.* 37, 364–375.

Lauer, F.T., Mitchell, L.A., Bedrick, E., McDonald, J.D., Lee, W.-Y., Li, W.-W., Olvera, H., Amaya, M.A., Berwick, M., Gonzales, M., et al. (2009). Temporal-spatial analysis of U.S.-Mexico border environmental fine and coarse PM air sample extract activity in human bronchial epithelial cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 238, 1–10.

Laulagnier, K., Motta, C., Hamdi, S., Roy, S., Fauvelle, F., Pageaux, J.-F., Kobayashi, T., Salles, J.-P., Perret, B., Bonnerot, C., et al. (2004). Mast cell- and dendritic cell-derived exosomes display a specific lipid composition and an unusual membrane organization. *Biochem J* 380, 161–171.

Le Bègue de Presle, A.-G. (1763). Achille-Guillaume Le Bègue de Presle (1735-1807).

Ledoux, F., Kfoury, A., Delmaire, G., Roussel, G., El Zein, A., and Courcot, D. (2017). Contributions of local and regional anthropogenic sources of metals in PM_{2.5} at an urban site in northern France. *Chemosphere* 181, 713–724.

Lee, H., Zhang, D., Zhu, Z., Dela Cruz, C.S., and Jin, Y. (2016). Epithelial cell-derived microvesicles activate macrophages and promote inflammation via microvesicle-containing microRNAs. *Sci Rep* 6, 35250.

Lee, R.C., Feinbaum, R.L., and Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75, 843–854.

Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K.-H., Lee, S., Baek, S.H., and Kim, V.N. (2004). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J* 23, 4051–4060.

Levänen, B., Bhakta, N.R., Torregrosa Paredes, P., Barbeau, R., Hiltbrunner, S., Pollack, J.L., Sköld, C.M., Svartengren, M., Grunewald, J., Gabrielsson, S., et al. (2013). Altered microRNA profiles in bronchoalveolar lavage fluid exosomes in asthmatic patients. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 131, 894-903.e8.

Lewis, B.P., Burge, C.B., and Bartel, D.P. (2005). Conserved Seed Pairing, Often Flanked by Adenosines, Indicates that Thousands of Human Genes are MicroRNA Targets. *Cell* 120, 15–20.

Li, J., Fu, R., Yang, L., and Tu, W. (2015). miR-21 expression predicts prognosis in diffuse large B-cell lymphoma. *Int J Clin Exp Pathol* 8, 15019–15024.

Li, N., Hao, M., Phalen, R.F., Hinds, W.C., and Nel, A.E. (2003). Particulate air pollutants and asthma: A paradigm for the role of oxidative stress in PM-induced adverse health effects. *Clinical Immunology* 109, 250–265.

- Li, R., Zhou, R., and Zhang, J. (2018). Function of PM2.5 in the pathogenesis of lung cancer and chronic airway inflammatory diseases. *Oncol Lett* 15, 7506–7514.
- Li, X., Lv, Y., Hao, J., Sun, H., Gao, N., Zhang, C., Lu, R., Wang, S., Yin, L., Pu, Y., et al. (2016a). Role of microRNA-4516 involved autophagy associated with exposure to fine particulate matter. *Oncotarget* 7, 45385–45397.
- Li, Y.-L., Wang, J., Zhang, C.-Y., Shen, Y.-Q., Wang, H.-M., Ding, L., Gu, Y.-C., Lou, J.-T., Zhao, X.-T., Ma, Z.-L., et al. (2016b). MiR-146a-5p inhibits cell proliferation and cell cycle progression in NSCLC cell lines by targeting CCND1 and CCND2. *Oncotarget* 7, 59287–59298.
- Liang, H., Liu, M., Yan, X., Zhou, Y., Wang, W., Wang, X., Fu, Z., Wang, N., Zhang, S., Wang, Y., et al. (2014). miR-193a-3p functions as a tumor suppressor in lung cancer by downregulating ERBB4. *J. Biol. Chem. jbc.M114.621409*.
- Lichtnekert, J., Kawakami, T., Parks, W.C., and Duffield, J.S. (2013). Changes in macrophage phenotype as the immune response evolves. *Curr Opin Pharmacol* 13, 555–564.
- Liu, C.-W., Lee, T.-L., Chen, Y.-C., Liang, C.-J., Wang, S.-H., Lue, J.-H., Tsai, J.-S., Lee, S.-W., Chen, S.-H., Yang, Y.-F., et al. (2018a). PM2.5-induced oxidative stress increases intercellular adhesion molecule-1 expression in lung epithelial cells through the IL-6/AKT/STAT3/NF- κ B-dependent pathway. *Part Fibre Toxicol* 15, 4.
- Liu, F., Huang, Y., Zhang, F., Chen, Q., Wu, B., Rui, W., Zheng, J.C., and Ding, W. (2015). Macrophages treated with particulate matter PM2.5 induce selective neurotoxicity through glutaminase-mediated glutamate generation. *J. Neurochem.* 134, 315–326.
- Liu, L., Li, Y., Liu, S., Duan, Q., Chen, L., Wu, T., Qian, H., Yang, S., and Xin, D. (2017). Downregulation of miR-193a-3p inhibits cell growth and migration in renal cell carcinoma by targeting PTEN. *Tumour Biol.* 39, 1010428317711951.
- Liu, X., Lv, X., Yang, Q., Jin, H., Zhou, W., and Fan, Q. (2018b). MicroRNA-29a Functions as a Tumor Suppressor and Increases Cisplatin Sensitivity by Targeting NRAS in Lung Cancer. *Technol. Cancer Res. Treat.* 17, 1533033818758905.
- Logozzi, M., Mizzoni, D., Angelini, D.F., Di Raimo, R., Falchi, M., Battistini, L., and Fais, S. (2018). Microenvironmental pH and Exosome Levels Interplay in Human Cancer Cell Lines of Different Histotypes. *Cancers (Basel)* 10.
- Longhin, E., Pezzolato, E., Mantecca, P., Holme, J.A., Franzetti, A., Camatini, M., and Gualtieri, M. (2013). Season linked responses to fine and quasi-ultrafine Milan PM in cultured cells. *Toxicol In Vitro* 27, 551–559.
- Luga, V., Zhang, L., Vitoria-Petit, A.M., Ogunjimi, A.A., Inanlou, M.R., Chiu, E., Buchanan, M., Hosein, A.N., Basik, M., and Wrana, J.L. (2012a). Exosomes mediate stromal mobilization of autocrine Wnt-PCP signaling in breast cancer cell migration. *Cell* 151, 1542–1556.
- Luga, V., Zhang, L., Vitoria-Petit, A.M., Ogunjimi, A.A., Inanlou, M.R., Chiu, E., Buchanan, M., Hosein, A.N., Basik, M., and Wrana, J.L. (2012b). Exosomes mediate stromal mobilization of autocrine Wnt-PCP signaling in breast cancer cell migration. *Cell* 151, 1542–1556.
- Ma, Q.-Y., Huang, D.-Y., Zhang, H.-J., Wang, S., and Chen, X.-F. (2017). Exposure to particulate matter 2.5 (PM2.5) induced macrophage-dependent inflammation, characterized by increased Th1/Th17 cytokine secretion and cytotoxicity. *Int. Immunopharmacol.* 50, 139–145.

- Ma, X., Yan, W., Zheng, H., Du, Q., Zhang, L., Ban, Y., Li, N., and Wei, F. (2015). Regulation of IL-10 and IL-12 production and function in macrophages and dendritic cells. *F1000Res* 4.
- Maess, M.B., Sendelbach, S., and Lorkowski, S. (2010). Selection of reliable reference genes during THP-1 monocyte differentiation into macrophages. *BMC Mol. Biol.* 11, 90.
- Mandalakis, M., Tsapakis, M., Tsoga, A., and Stephanou, E.G. (2002). Gas-particle concentrations and distribution of aliphatic hydrocarbons, PAHs, PCBs and PCDD/Fs in the atmosphere of Athens (Greece). *Atmospheric Environment* 36, 4023–4035.
- Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A., and Locati, M. (2004). The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends in Immunology* 25, 677–686.
- Manzano-León, N., Serrano-Lomelin, J., Sánchez, B.N., Quintana-Belmares, R., Vega, E., Vázquez-López, I., Rojas-Bracho, L., López-Villegas, M.T., Vadillo-Ortega, F., De Vizcaya-Ruiz, A., et al. (2016). TNF α and IL-6 Responses to Particulate Matter in Vitro: Variation According to PM Size, Season, and Polycyclic Aromatic Hydrocarbon and Soil Content. *Environ. Health Perspect.* 124, 406–412.
- Martinez, F.O., Sica, A., Mantovani, A., and Locati, M. (2008). Macrophage activation and polarization. *Front. Biosci.* 13, 453–461.
- Masè, M., Grasso, M., Avogaro, L., D’Amato, E., Tessarolo, F., Graffigna, A., Denti, M.A., and Ravelli, F. (2017). Selection of reference genes is critical for miRNA expression analysis in human cardiac tissue. A focus on atrial fibrillation. *Scientific Reports* 7, 41127.
- Mazzei, F., D’Alessandro, A., Lucarelli, F., Nava, S., Prati, P., Valli, G., and Vecchi, R. (2008). Characterization of particulate matter sources in an urban environment. *Science of The Total Environment* 401, 81–89.
- MEDDE, 2010 Décret n°2010-1250 du 21 octobre 2010 relatif à la qualité de l’air.
- Melo, S.A., Sugimoto, H., O’Connell, J.T., Kato, N., Villanueva, A., Vidal, A., Qiu, L., Vitkin, E., Perelman, L.T., Melo, C.A., et al. (2014). Cancer exosomes perform cell-independent microRNA biogenesis and promote tumorigenesis. *Cancer Cell* 26, 707–721.
- Meyer, B., Loeschke, S., Schultze, A., Weigel, T., Sandkamp, M., Goldmann, T., Vollmer, E., and Bullerdiek, J. (2007). HMGA2 overexpression in non-small cell lung cancer. *Mol. Carcinog.* 46, 503–511.
- Miao, W., Hu, L., Scrivens, P.J., and Batist, G. (2005). Transcriptional regulation of NF-E2 p45-related factor (NRF2) expression by the aryl hydrocarbon receptor-xenobiotic response element signaling pathway: direct cross-talk between phase I and II drug-metabolizing enzymes. *J. Biol. Chem.* 280, 20340–20348.
- Mills, C.D. (2015). Anatomy of a Discovery: M1 and M2 Macrophages. *Front Immunol* 6.
- Mills, R.A., Millis, C.D., Dannan, G.A., Guengerich, F.P., and Aust, S.D. (1985). Studies on the structure-activity relationships for the metabolism of polybrominated biphenyls by rat liver microsomes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 78, 96–104.
- Mimura, J., and Fujii-Kuriyama, Y. (2003). Functional role of AhR in the expression of toxic effects by TCDD. *Biochim. Biophys. Acta* 1619, 263–268.

- Möbius, W., Ohno-Iwashita, Y., van Donselaar, E.G., Oorschot, V.M.J., Shimada, Y., Fujimoto, T., Heijnen, H.F.G., Geuze, H.J., and Slot, J.W. (2002). Immunoelectron microscopic localization of cholesterol using biotinylated and non-cytolytic perfringolysin O. *J. Histochem. Cytochem.* *50*, 43–55.
- Modi, W.S., Dean, M., Seuanez, H.N., Mukaida, N., Matsushima, K., and O'Brien, S.J. (1990). Monocyte-derived neutrophil chemotactic factor (MDNCF/IL-8) resides in a gene cluster along with several other members of the platelet factor 4 gene superfamily. *Hum. Genet.* *84*, 185–187.
- Møller, P., Folkmann, J.K., Forchhammer, L., Bräuner, E.V., Danielsen, P.H., Risom, L., and Loft, S. (2008). Air pollution, oxidative damage to DNA, and carcinogenesis. *Cancer Lett.* *266*, 84–97.
- Møller, P., Danielsen, P.H., Karotki, D.G., Jantzen, K., Roursgaard, M., Klingberg, H., Jensen, D.M., Christophersen, D.V., Hemmingsen, J.G., Cao, Y., et al. (2014). Oxidative stress and inflammation generated DNA damage by exposure to air pollution particles. *Mutat Res Rev Mutat Res* *762*, 133–166.
- Moloi, K., Chimidza, S., Lindgren, E.S., Viksna, A., and Standzenieks, P. (2002). Black carbon, mass and elemental measurements of airborne particles in the village of Serowe, Botswana. *Atmospheric Environment* *36*, 2447–2457.
- Monn, C., and Becker, S. (1999). Cytotoxicity and induction of proinflammatory cytokines from human monocytes exposed to fine (PM_{2.5}) and coarse particles (PM_{10-2.5}) in outdoor and indoor air. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* *155*, 245–252.
- Moolgavkar, S.H. (2000). Air pollution and hospital admissions for diseases of the circulatory system in three U.S. metropolitan areas. *J Air Waste Manag Assoc* *50*, 1199–1206.
- Morelli, A.E., Larregina, A.T., Shufesky, W.J., Sullivan, M.L.G., Stolz, D.B., Papworth, G.D., Zahorchak, A.F., Logar, A.J., Wang, Z., Watkins, S.C., et al. (2004). Endocytosis, intracellular sorting, and processing of exosomes by dendritic cells. *Blood* *104*, 3257–3266.
- Moreno, T., Querol, X., Alastuey, A., Viana, M., Salvador, P., Sánchez de la Campa, A., Artiñano, B., de la Rosa, J., and Gibbons, W. (2006). Variations in atmospheric PM trace metal content in Spanish towns: Illustrating the chemical complexity of the inorganic urban aerosol cocktail. *Atmospheric Environment* *40*, 6791–6803.
- Mueller, T.D., Zhang, J.-L., Sebald, W., and Duschl, A. (2002). Structure, binding, and antagonists in the IL-4/IL-13 receptor system. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* *1592*, 237–250.
- Mulcahy, L.A., Pink, R.C., and Carter, D.R.F. (2014). Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. *J Extracell Vesicles* *3*.
- Murray, P.J., and Wynn, T.A. (2011). Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat. Rev. Immunol.* *11*, 723–737.
- Nana-Sinkam, S.P., Acunzo, M., Croce, C.M., and Wang, K. (2017). Extracellular Vesicle Biology in the Pathogenesis of Lung Disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *196*, 1510–1518.
- Neri, T., Armani, C., Pegoli, A., Cordazzo, C., Carmazzi, Y., Brunelleschi, S., Bardelli, C., Breschi, M.C., Paggiaro, P., and Celi, A. (2011). Role of NF-kappaB and PPAR-gamma in lung inflammation induced by monocyte-derived microparticles. *Eur. Respir. J.* *37*, 1494–1502.

- Nioi, P., and Hayes, J.D. (2004). Contribution of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 to protection against carcinogenesis, and regulation of its gene by the Nrf2 basic-region leucine zipper and the arylhydrocarbon receptor basic helix-loop-helix transcription factors. *Mutat. Res.* *555*, 149–171.
- Nolte-’t Hoen, E.N.M., Buermans, H.P.J., Waasdorp, M., Stoorvogel, W., Wauben, M.H.M., and ’t Hoen, P.A.C. (2012). Deep sequencing of RNA from immune cell-derived vesicles uncovers the selective incorporation of small non-coding RNA biotypes with potential regulatory functions. *Nucleic Acids Res.* *40*, 9272–9285.
- Oberdörster, G., Oberdörster, E., and Oberdörster, J. (2005). Nanotoxicology: An Emerging Discipline Evolving from Studies of Ultrafine Particles. *Environ Health Perspect* *113*, 823–839.
- Obot, C.J., Morandi, M.T., Beebe, T.P., Hamilton, R.F., and Holian, A. (2002). Surface components of airborne particulate matter induce macrophage apoptosis through scavenger receptors. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* *184*, 98–106.
- OMS (2013). Communiqué de presse n°221.
- Oravisjärvi, K., Timonen, K.L., Wiikinkoski, T., Ruuskanen, A.R., Heinänen, K., and Ruuskanen, J. (2003). Source contributions to PM_{2.5} particles in the urban air of a town situated close to a steel works. *Atmospheric Environment* *37*, 1013–1022.
- Ostro, B., Malig, B., Broadwin, R., Basu, R., Gold, E.B., Bromberger, J.T., Derby, C., Feinstein, S., Greendale, G.A., Jackson, E.A., et al. (2014). Chronic PM_{2.5} exposure and inflammation: determining sensitive subgroups in mid-life women. *Environ. Res.* *132*, 168–175.
- Park, E.-J., Roh, J., Kim, Y., Park, K., Kim, D.-S., and Yu, S.-D. (2011). PM 2.5 collected in a residential area induced Th1-type inflammatory responses with oxidative stress in mice. *Environ. Res.* *111*, 348–355.
- Peinado, H., Alečković, M., Lavotshkin, S., Matei, I., Costa-Silva, B., Moreno-Bueno, G., Hergueta-Redondo, M., Williams, C., García-Santos, G., Ghajar, C., et al. (2012a). Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nat. Med.* *18*, 883–891.
- Peinado, H., Alečković, M., Lavotshkin, S., Matei, I., Costa-Silva, B., Moreno-Bueno, G., Hergueta-Redondo, M., Williams, C., García-Santos, G., Ghajar, C., et al. (2012b). Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nat. Med.* *18*, 883–891.
- Pergoli, L., Cantone, L., Favero, C., Angelici, L., Iodice, S., Pinatel, E., Hoxha, M., Dioni, L., Letizia, M., Albetti, B., et al. (2017). Extracellular vesicle-packaged miRNA release after short-term exposure to particulate matter is associated with increased coagulation. *Particle and Fibre Toxicology* *14*, 32.
- Perrone, M.G., Gualtieri, M., Consonni, V., Ferrero, L., Sangiorgi, G., Longhin, E., Ballabio, D., Bolzacchini, E., and Camatini, M. (2013). Particle size, chemical composition, seasons of the year and urban, rural or remote site origins as determinants of biological effects of particulate matter on pulmonary cells. *Environ. Pollut.* *176*, 215–227.
- Peters, L., and Meister, G. (2007). Argonaute Proteins: Mediators of RNA Silencing. *Molecular Cell* *26*, 611–623.
- Petersen, C.P., Bordeleau, M.-E., Pelletier, J., and Sharp, P.A. (2006). Short RNAs Repress Translation after Initiation in Mammalian Cells. *Molecular Cell* *21*, 533–542.

- Pillai, R.S., Artus, C.G., and Filipowicz, W. (2004). Tethering of human Ago proteins to mRNA mimics the miRNA-mediated repression of protein synthesis. *RNA* 10, 10, 1518–1525.
- Poutsika, D.D., Schroder, E.W., Taylor, D.D., Levy, E.M., and Black, P.H. (1985). Membrane vesicles shed by murine melanoma cells selectively inhibit the expression of Ia antigen by macrophages. *J. Immunol.* 134, 138–144.
- Pozzi, R., De Berardis, B., Paoletti, L., and Guastadisegni, C. (2003). Inflammatory mediators induced by coarse (PM2.5-10) and fine (PM2.5) urban air particles in RAW 264.7 cells. *Toxicology* 183, 243–254.
- Provost, and Heyman (2016). Impact de l'exposition chronique à la pollution de l'air sur la mortalité en France : point sur la région Nord – Pas-de-Calais – Picardie / 2016 / Environnement et santé / Rapports et synthèses / Publications et outils / Accueil.
- Qazi, K.R., Paredes, P.T., Dahlberg, B., Grunewald, J., Eklund, A., and Gabrielsson, S. (2010). Proinflammatory exosomes in bronchoalveolar lavage fluid of patients with sarcoidosis. *Thorax* 65, 1016–1024.
- Qin, X., Xu, H., Gong, W., and Deng, W. (2015). The Tumor Cytosol miRNAs, Fluid miRNAs, and Exosome miRNAs in Lung Cancer. *Front Oncol* 4.
- Rahman, I., Biswas, S.K., and Kode, A. (2006). Oxidant and antioxidant balance in the airways and airway diseases. *Eur. J. Pharmacol.* 533, 222–239.
- Rajendran, L., Honsho, M., Zahn, T.R., Keller, P., Geiger, K.D., Verkade, P., and Simons, K. (2006). Alzheimer's disease beta-amyloid peptides are released in association with exosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 11172–11177.
- Rampazzo, G., Masiol, M., Visin, F., Rampado, E., and Pavoni, B. (2008). Geochemical characterization of PM10 emitted by glass factories in Murano, Venice (Italy). *Chemosphere* 71, 2068–2075.
- Raposo, G., and Stoorvogel, W. (2013a). Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol* 200, 373–383.
- Raposo, G., and Stoorvogel, W. (2013b). Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol* 200, 373–383.
- Raposo, G., Nijman, H.W., Stoorvogel, W., Liejendekker, R., Harding, C.V., Melief, C.J., and Geuze, H.J. (1996). B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J. Exp. Med.* 183, 1161–1172.
- Ratajczak, J., Wysoczynski, M., Hayek, F., Janowska-Wieczorek, A., and Ratajczak, M.Z. (2006). Membrane-derived microvesicles: important and underappreciated mediators of cell-to-cell communication. *Leukemia* 20, 1487–1495.
- Rice, M.B., Ljungman, P.L., Wilker, E.H., Dorans, K.S., Gold, D.R., Schwartz, J., Koutrakis, P., Washko, G.R., O'Connor, G.T., and Mittleman, M.A. (2015). Long-term exposure to traffic emissions and fine particulate matter and lung function decline in the Framingham heart study. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 191, 656–664.
- Risom, L., Møller, P., and Loft, S. (2005). Oxidative stress-induced DNA damage by particulate air pollution. *Mutat. Res.* 592, 119–137.

- Roche, C. (2016). Etude des concentrations et de la composition des PM sur le littoral du nord de la France - Evaluation des contributions maritimes de l'espace Manche - Mer du Nord.
- Rodosthenous, R.S., Coull, B.A., Lu, Q., Vokonas, P.S., Schwartz, J.D., and Baccarelli, A.A. (2016). Ambient particulate matter and microRNAs in extracellular vesicles: a pilot study of older individuals. *Part Fibre Toxicol* 13, 13.
- Rószter, T. (2015). Understanding the Mysterious M2 Macrophage through Activation Markers and Effector Mechanisms. *Mediators Inflamm.* 2015, 816460.
- Rushmore, T.H., and Kong, A.-N.T. (2002). Pharmacogenomics, regulation and signaling pathways of phase I and II drug metabolizing enzymes. *Curr. Drug Metab.* 3, 481–490.
- Sadeghi, K., Wisgrill, L., Wessely, I., Diesner, S.C., Schüller, S., Dürr, C., Heinle, A., Sachet, M., Pollak, A., Förster-Waldl, E., et al. (2016). GM-CSF Down-Regulates TLR Expression via the Transcription Factor PU.1 in Human Monocytes. *PLoS ONE* 11, e0162667.
- Sáenz-Cuesta, M., Osorio-Querejeta, I., and Otaegui, D. (2014). Extracellular Vesicles in Multiple Sclerosis: What are They Telling Us? *Front. Cell. Neurosci.* 8.
- Saint-Georges, F., Abbas, I., Billet, S., Verdin, A., Gosset, P., Mulliez, P., Shirali, P., and Garçon, G. (2008). Gene expression induction of volatile organic compound and/or polycyclic aromatic hydrocarbon-metabolizing enzymes in isolated human alveolar macrophages in response to airborne particulate matter (PM_{2.5}). *Toxicology* 244, 220–230.
- Salimian, J., Mirzaei, H., Moridikia, A., Harchegani, A.B., Sahebkar, A., and Salehi, H. (2018). Chronic obstructive pulmonary disease: MicroRNAs and exosomes as new diagnostic and therapeutic biomarkers. *J Res Med Sci* 23, 27–27.
- Saman, S., Kim, W., Raya, M., Visnick, Y., Miro, S., Saman, S., Jackson, B., McKee, A.C., Alvarez, V.E., Lee, N.C.Y., et al. (2012). Exosome-associated tau is secreted in tauopathy models and is selectively phosphorylated in cerebrospinal fluid in early Alzheimer disease. *J. Biol. Chem.* 287, 3842–3849.
- Santacatalina, M., Reche, C., Minguillón, M.C., Escrig, A., Sanfelix, V., Carratalá, A., Nicolás, J.F., Yubero, E., Crespo, J., Alastuey, A., et al. (2010). Impact of fugitive emissions in ambient PM levels and composition: A case study in Southeast Spain. *Science of The Total Environment* 408, 4999–5009.
- Santé Publique France (2016). Impacts de l'exposition chronique aux particules fines sur la mortalité en France continentale et analyse des gains en santé de plusieurs scénarii de réduction de la pollution atmosphérique.
- Sarvothaman, S., Undi, R.B., Pasupuleti, S.R., Gutti, U., and Gutti, R.K. (2015). Apoptosis: role in myeloid cell development. *Blood Res* 50, 73–79.
- Sawyer, K., Mundandhara, S., Ghio, A.J., and Madden, M.C. (2010). The effects of ambient particulate matter on human alveolar macrophage oxidative and inflammatory responses. *J. Toxicol. Environ. Health Part A* 73, 41–57.
- Schmittgen, T.D., and Livak, K.J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc* 3, 1101–1108.
- Segura, E., Guérin, C., Hogg, N., Amigorena, S., and Théry, C. (2007). CD8⁺ dendritic cells use LFA-1 to capture MHC-peptide complexes from exosomes in vivo. *J. Immunol.* 179, 1489–1496.

- Seinfeld, and Pandis (2006). Atmospheric chemistry and physics : from air pollution to climate change in SearchWorks catalog.
- Seitz, H., and Zamore, P.D. (2006). Rethinking the Microprocessor. *Cell* 125, 827–829.
- Semenza, G.L. (2003). Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* 3, 721–732.
- Serban, K.A., Reznica, S., Petrusca, D.N., Poirier, C., Cao, D., Justice, M.J., Patel, M., Tsvetkova, I., Kamocki, K., Mikosz, A., et al. (2016). Structural and functional characterization of endothelial microparticles released by cigarette smoke. *Scientific Reports* 6, 31596.
- Shafer, M.M., Perkins, D.A., Antkiewicz, D.S., Stone, E.A., Quraishi, T.A., and Schauer, J.J. (2010). Reactive oxygen species activity and chemical speciation of size-fractionated atmospheric particulate matter from Lahore, Pakistan: an important role for transition metals. *J Environ Monit* 12, 704–715.
- Shaykhiev, R., Krause, A., Salit, J., Strulovici-Barel, Y., Harvey, B.-G., O'Connor, T.P., and Crystal, R.G. (2009). Smoking-dependent reprogramming of alveolar macrophage polarization: implication for pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *J. Immunol.* 183, 2867–2883.
- Shell, S., Park, S.-M., Radjabi, A.R., Schickel, R., Kistner, E.O., Jewell, D.A., Feig, C., Lengyel, E., and Peter, M.E. (2007). Let-7 expression defines two differentiation stages of cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 11400–11405.
- Shen, H., Li, L., Yang, S., Wang, D., Zhong, S., Zhao, J., and Tang, J. (2016). MicroRNA-29a contributes to drug-resistance of breast cancer cells to adriamycin through PTEN/AKT/GSK3 β signaling pathway. *Gene* 593, 84–90.
- Shimada, T. (2006). Xenobiotic-metabolizing enzymes involved in activation and detoxification of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. *Drug Metab. Pharmacokinet.* 21, 257–276.
- Shimizu, S., Takehara, T., Hikita, H., Kodama, T., Miyagi, T., Hosui, A., Tatsumi, T., Ishida, H., Noda, T., Nagano, H., et al. (2010). The let-7 family of microRNAs inhibits Bcl-xL expression and potentiates sorafenib-induced apoptosis in human hepatocellular carcinoma. *J. Hepatol.* 52, 698–704.
- Shyamasundar, S., Ong, C., Yung, L.-Y.L., Dheen, S.T., and Bay, B.H. (2018). miR-128 Regulates Genes Associated with Inflammation and Fibrosis of Rat Kidney Cells In Vitro. *Anat Rec (Hoboken)* 301, 913–921.
- Singh, R., Pochampally, R., Watabe, K., Lu, Z., and Mo, Y.-Y. (2014). Exosome-mediated transfer of miR-10b promotes cell invasion in breast cancer. *Molecular Cancer* 13, 256.
- Soeda, S., Ohyashiki, J.H., Ohtsuki, K., Umezumi, T., Setoguchi, Y., and Ohyashiki, K. (2013). Clinical relevance of plasma miR-106b levels in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Int. J. Mol. Med.* 31, 533–539.
- Sørensen, M., Autrup, H., Møller, P., Hertel, O., Jensen, S.S., Vinzents, P., Knudsen, L.E., and Loft, S. (2003). Linking exposure to environmental pollutants with biological effects. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 544, 255–271.
- Stein, M., Keshav, S., Harris, N., and Gordon, S. (1992). Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *Journal of Experimental Medicine* 176, 287–292.

- Sun, Q., Yue, P., Deiuliis, J.A., Lumeng, C.N., Kampfrath, T., Mikolaj, M.B., Cai, Y., Ostrowski, M.C., Lu, B., Parthasarathy, S., et al. (2009). Ambient air pollution exaggerates adipose inflammation and insulin resistance in a mouse model of diet-induced obesity. *CIRCULATION, Circulation*. *119*, 538–546.
- Sun, Q., Liu, L., Wang, H., Mandal, J., Khan, P., Hostettler, K.E., Stolz, D., Tamm, M., Molino, A., Lardinois, D., et al. (2017). Constitutive high expression of protein arginine methyltransferase 1 in asthmatic airway smooth muscle cells is caused by reduced microRNA-19a expression and leads to enhanced remodeling. *J. Allergy Clin. Immunol.* *140*, 510-524.e3.
- Takahashi, R.-U., Prieto-Vila, M., Hironaka, A., and Ochiya, T. (2017). The role of extracellular vesicle microRNAs in cancer biology. *Clin. Chem. Lab. Med.*
- Takamizawa, J., Konishi, H., Yanagisawa, K., Tomida, S., Osada, H., Endoh, H., Harano, T., Yatabe, Y., Nagino, M., Nimura, Y., et al. (2004). Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer Res.* *64*, 3753–3756.
- Takeda, Y., Tachibana, I., Miyado, K., Kobayashi, M., Miyazaki, T., Funakoshi, T., Kimura, H., Yamane, H., Saito, Y., Goto, H., et al. (2003). Tetraspanins CD9 and CD81 function to prevent the fusion of mononuclear phagocytes. *The Journal of Cell Biology* *161*, 945–956.
- Tang, M.K.S., and Wong, A.S.T. (2015). Exosomes: Emerging biomarkers and targets for ovarian cancer. *Cancer Lett.* *367*, 26–33.
- Tao, Y., Mi, S., Zhou, S., Wang, S., and Xie, X. (2014). Air pollution and hospital admissions for respiratory diseases in Lanzhou, China. *Environ. Pollut.* *185*, 196–201.
- Teubner, W., Meinel, W., and Glatt, H. (2002). Stable expression of rat sulfotransferase 1B1 in V79 cells: activation of benzylic alcohols to mutagens. *Carcinogenesis* *23*, 1877–1884.
- Turbica, I., Gallais, Y., Gueguen, C., Tharinger, H., Al Sabbagh, C., Gorges, R., Gary-Gouy, H., Kerdine-Römer, S., Pallardy, M., Mascarell, L., et al. (2015). Exosomes from neutrophil-like cells down-regulate nickel-induced dendritic cell maturation and promote Th2 polarization. *J. Leukoc. Biol.* *97*, 737–749.
- Upadhyay, D., Panduri, V., Ghio, A., and Kamp, D.W. (2003). Particulate matter induces alveolar epithelial cell DNA damage and apoptosis: role of free radicals and the mitochondria. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* *29*, 180–187.
- Valadi, H., Ekström, K., Bossios, A., Sjöstrand, M., Lee, J.J., and Lötvall, J.O. (2007). Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat. Cell Biol.* *9*, 654–659.
- Valenzuela, M.M.A., Ferguson Bennit, H.R., Gonda, A., Diaz Osterman, C.J., Hibma, A., Khan, S., and Wall, N.R. (2015). Exosomes Secreted from Human Cancer Cell Lines Contain Inhibitors of Apoptosis (IAP). *Cancer Microenviron.*
- Van Winkle, L.S., Bein, K., Anderson, D., Pinkerton, K.E., Tablin, F., Wilson, D., and Wexler, A.S. (2015). Biological Dose Response to PM2.5: Effect of Particle Extraction Method on Platelet and Lung Responses. *Toxicol Sci* *143*, 349–359.
- Veranth, J.M., Reilly, C.A., Veranth, M.M., Moss, T.A., Langelier, C.R., Lanza, D.L., and Yost, G.S. (2004). Inflammatory Cytokines and Cell Death in BEAS-2B Lung Cells Treated with Soil Dust, Lipopolysaccharide, and Surface-Modified Particles. *Toxicol Sci* *82*, 88–96.

- Verreck, F.A.W., de Boer, T., Langenberg, D.M.L., van der Zanden, L., and Ottenhoff, T.H.M. (2006). Phenotypic and functional profiling of human proinflammatory type-1 and anti-inflammatory type-2 macrophages in response to microbial antigens and IFN-gamma- and CD40L-mediated costimulation. *J. Leukoc. Biol.* *79*, 285–293.
- Villarroya-Beltri, C., Gutiérrez-Vázquez, C., Sánchez-Cabo, F., Pérez-Hernández, D., Vázquez, J., Martín-Cofreces, N., Martínez-Herrera, D.J., Pascual-Montano, A., Mittelbrunn, M., and Sánchez-Madrid, F. (2013). Sumoylated hnRNP A2B1 controls the sorting of miRNAs into exosomes through binding to specific motifs. *Nat Commun* *4*, 2980.
- Visalli, G., Baluce, B., Bertuccio, M., Picerno, I., and Di Pietro, A. (2015). Mitochondrial-mediated apoptosis pathway in alveolar epithelial cells exposed to the metals in combustion-generated particulate matter. *J. Toxicol. Environ. Health Part A* *78*, 697–709.
- Wagner, J.G., Morishita, M., Keeler, G.J., and Harkema, J.R. (2012). Divergent effects of urban particulate air pollution on allergic airway responses in experimental asthma: a comparison of field exposure studies. *Environ Health* *11*, 45.
- Wakabayashi, N., Slocum, S.L., Skoko, J.J., Shin, S., and Kensler, T.W. (2010). When NRF2 talks, who's listening? *Antioxid. Redox Signal.* *13*, 1649–1663.
- Waked, A., Favez, O., Alleman, L.Y., Piot, C., Petit, J.-E., Delaunay, T., Verlinden, E., Golly, B., Besombes, J.-L., Jaffrezo, J.-L., et al. (2013). Source apportionment of PM10 in a North-Western Europe regional urban background site (Lens, France) using Positive Matrix Factorization and including primary biogenic emissions. *Atmospheric Chemistry & Physics Discussions* *13*, 25325–25385.
- Wang, C., and Youle, R.J. (2009). The role of mitochondria in apoptosis*. *Annu. Rev. Genet.* *43*, 95–118.
- Wang, H., Song, L., Ju, W., Wang, X., Dong, L., Zhang, Y., Ya, P., Yang, C., and Li, F. (2017a). The acute airway inflammation induced by PM2.5 exposure and the treatment of essential oils in Balb/c mice. *Sci Rep* *7*, 44256.
- Wang, J., Zhang, Q., Wang, D., Yan, W., Sha, H., Zhao, J., Yang, S., Zhang, H., Hou, J., Xu, H., et al. (2018). MiR-29a: a potential therapeutic target and promising biomarker in tumors. *Bioscience Reports* *38*, BSR20171265.
- WANG, X., CAO, L., WANG, Y., WANG, X., LIU, N., and YOU, Y. (2012). Regulation of let-7 and its target oncogenes (Review). *Oncol Lett* *3*, 955–960.
- Wang, Y.-S., Hsi, E., Cheng, H.-Y., Hsu, S.-H., Liao, Y.-C., and Juo, S.-H.H. (2017b). Let-7g suppresses both canonical and non-canonical NF-κB pathways in macrophages leading to anti-atherosclerosis. *Oncotarget* *8*, 101026–101041.
- Wang, Z.-X., Bian, H.-B., Wang, J.-R., Cheng, Z.-X., Wang, K.-M., and De, W. (2011). Prognostic significance of serum miRNA-21 expression in human non-small cell lung cancer. *J Surg Oncol* *104*, 847–851.
- Wessel, N. (2010). Étude des voies de bioactivation du benzo[a]pyrène et du fluoranthène chez la sole commune (*Solea solea*) : Profil métabolique et génotoxicité.

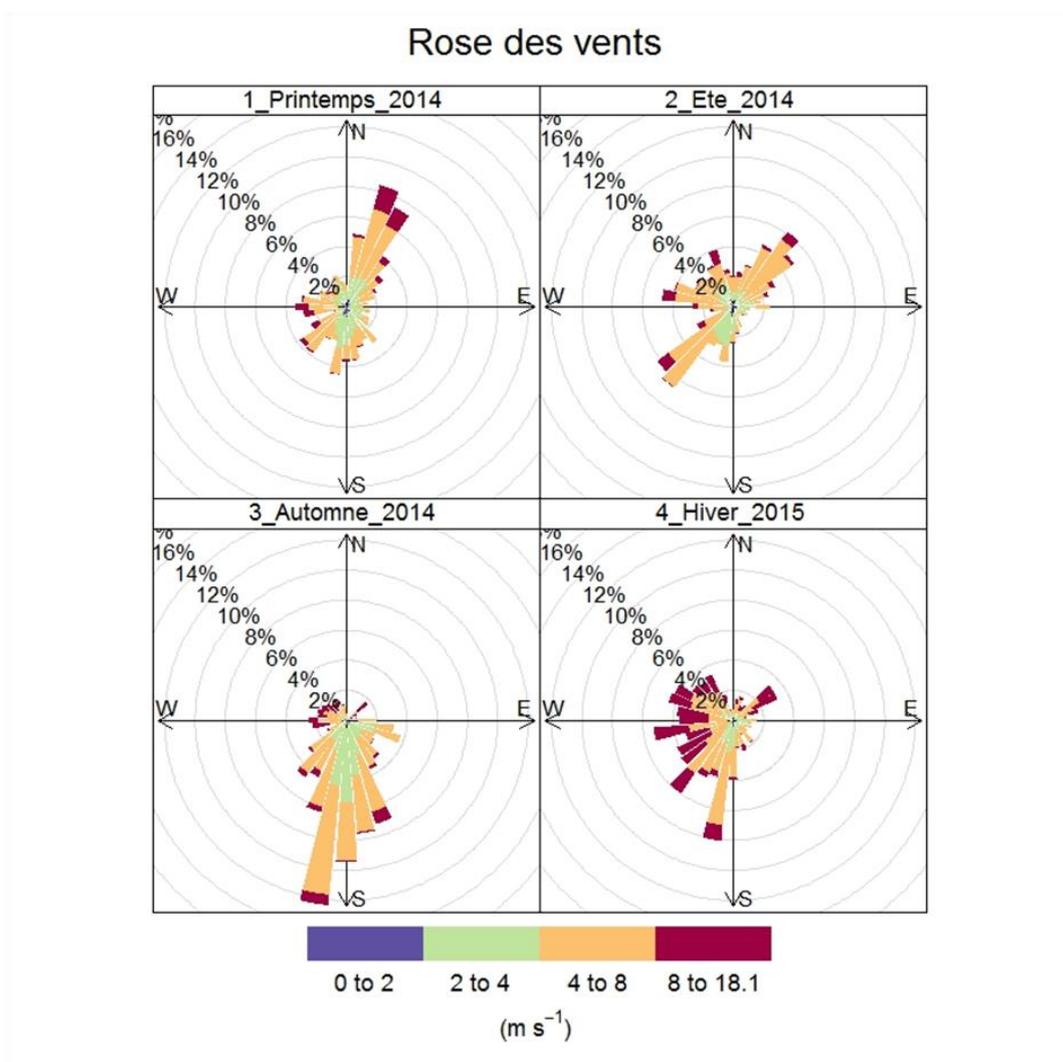
- Wu, C., Larson, T.V., Wu, S., Williamson, J., Westberg, H.H., and Liu, L.-J.S. (2007). Source apportionment of PM_{2.5} and selected hazardous air pollutants in Seattle. *Science of The Total Environment* 386, 42–52.
- Wu, H., Zhou, J., Mei, S., Wu, D., Mu, Z., Chen, B., Xie, Y., Ye, Y., and Liu, J. (2016). Circulating exosomal microRNA-96 promotes cell proliferation, migration and drug resistance by targeting LMO7. *J. Cell. Mol. Med.*
- Wu, L., WANG, Q., YAO, J., JIANG, H., XIAO, C., and WU, F. (2015). MicroRNA let-7g and let-7i inhibit hepatoma cell growth concurrently via downregulation of the anti-apoptotic protein B-cell lymphoma-extra large. *Oncol Lett* 9, 213–218.
- Wubbolts, R., Leckie, R.S., Veenhuizen, P.T.M., Schwarzmann, G., Möbius, W., Hoernschemeyer, J., Slot, J.-W., Geuze, H.J., and Stoorvogel, W. (2003). Proteomic and biochemical analyses of human B cell-derived exosomes. Potential implications for their function and multivesicular body formation. *J. Biol. Chem.* 278, 10963–10972.
- Xu, C., Li, C.Y.-T., and Kong, A.-N.T. (2005). Induction of phase I, II and III drug metabolism/transport by xenobiotics. *Arch. Pharm. Res.* 28, 249–268.
- Xu, F., Qiu, X., Hu, X., Shang, Y., Pardo, M., Fang, Y., Wang, J., Rudich, Y., and Zhu, T. (2018). Effects on IL-1 β signaling activation induced by water and organic extracts of fine particulate matter (PM_{2.5}) in vitro. *Environmental Pollution* 237, 592–600.
- Yamasaki, K., and Eeden, S.F. van (2018). Lung Macrophage Phenotypes and Functional Responses: Role in the Pathogenesis of COPD. *Int J Mol Sci* 19.
- Yanaihara, N., Caplen, N., Bowman, E., Seike, M., Kumamoto, K., Yi, M., Stephens, R.M., Okamoto, A., Yokota, J., Tanaka, T., et al. (2006). Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Cell* 9, 189–198.
- Yang MicroRNA let-7: Regulation, single nucleotide polymorphism, and therapy in lung cancer.
- Yang, D., Ma, M., Zhou, W., Yang, B., and Xiao, C. (2017). Inhibition of miR-32 activity promoted EMT induced by PM_{2.5} exposure through the modulation of the Smad1-mediated signaling pathways in lung cancer cells. *Chemosphere* 184, 289–298.
- Yang, J., Zhang, L., Yu, C., Yang, X.-F., and Wang, H. (2014). Monocyte and macrophage differentiation: circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases. *Biomark Res* 2, 1.
- Yao, F., Yu, Y., Feng, L., Li, J., Zhang, M., Lan, X., Yan, X., Liu, Y., Guan, F., Zhang, M., et al. (2017). Adipogenic miR-27a in adipose tissue upregulates macrophage activation via inhibiting PPAR γ of insulin resistance induced by high-fat diet-associated obesity. *Exp. Cell Res.* 355, 105–112.
- Yao, Y., Li, G., Wu, J., Zhang, X., and Wang, J. (2015). Inflammatory response of macrophages cultured with *Helicobacter pylori* strains was regulated by miR-155. *Int J Clin Exp Pathol* 8, 4545–4554.
- Yasuda, N., Gotoh, K., Minatoguchi, S., Asano, K., Nishigaki, K., Nomura, M., Ohno, A., Watanabe, M., Sano, H., Kumada, H., et al. (1998). An increase of soluble Fas, an inhibitor of apoptosis, associated with progression of COPD. *Respir Med* 92, 993–999.

- Ying, X., Wu, Q., Wu, X., Zhu, Q., Wang, X., Jiang, L., Chen, X., and Wang, X. (2016). Epithelial ovarian cancer-secreted exosomal miR-222-3p induces polarization of tumor-associated macrophages. *Oncotarget* 7, 43076–43087.
- Yoon, Y.J., Kim, O.Y., and Gho, Y.S. (2014). Extracellular vesicles as emerging intercellular communicasomes. *BMB Rep* 47, 531–539.
- You, Y., Shan, Y., Chen, J., Yue, H., You, B., Shi, S., Li, X., and Cao, X. (2015). Matrix metalloproteinase 13-containing exosomes promote nasopharyngeal carcinoma metastasis. *Cancer Sci* 106, 1669–1677.
- Zhang, B., Yin, Y., Lai, R.C., and Lim, S.K. (2014). Immunotherapeutic potential of extracellular vesicles. *Front Immunol* 5, 518.
- Zhang, X., Pei, Z., Chen, J., Ji, C., Xu, J., Zhang, X., and Wang, J. (2016). Exosomes for Immunoregulation and Therapeutic Intervention in Cancer. *J Cancer* 7, 1081–1087.
- Zhang, Y., Chen, N., Zhang, J., and Tong, Y. (2013a). Hsa-Let-7g miRNA Targets Caspase-3 and Inhibits the Apoptosis Induced by ox-LDL in Endothelial Cells. *Int J Mol Sci* 14, 22708–22720.
- Zhang, Y., Zhang, M., Zhong, M., Suo, Q., and Lv, K. (2013b). Expression profiles of miRNAs in polarized macrophages. *Int. J. Mol. Med.* 31, 797–802.
- Zhang, Y., Wang, S., Zhu, J., Li, C., Zhang, T., Liu, H., Xu, Q., Ye, X., Zhou, L., and Ye, L. (2018). Effect of Atmospheric PM2.5 on Expression Levels of NF-κB Genes and Inflammatory Cytokines Regulated by NF-κB in Human Macrophage. *Inflammation* 1–11.
- Zhao, D., Han, W., Liu, X., Cui, D., and Chen, Y. (2017). MicroRNA-128 promotes apoptosis in lung cancer by directly targeting NIMA-related kinase 2. *Thorac Cancer* 8, 304–311.
- Zhao, Q., Chen, H., Yang, T., Rui, W., Liu, F., Zhang, F., Zhao, Y., and Ding, W. (2016). Direct effects of airborne PM2.5 exposure on macrophage polarizations. *Biochim. Biophys. Acta* 1860, 2835–2843.
- Zhou, D., Chen, L., Yang, K., Jiang, H., Xu, W., and Luan, J. (2017). SOCS molecules: the growing players in macrophage polarization and function. *Oncotarget* 8, 60710–60722.
- Zhu, M.-C., Xiong, P., Li, G.-L., and Zhu, M. (2017). Could lung cancer exosomes induce apoptosis of natural killer cells through the p75NTR-proNGF-sortilin axis? *Med. Hypotheses* 108, 151–153.
- Zitvogel, L., Regnault, A., Lozier, A., Wolfers, J., Flament, C., Tenza, D., Ricciardi-Castagnoli, P., Raposo, G., and Amigorena, S. (1998). Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell derived exosomes. *Nat Med* 4, 594–600.
- Zou, W., He, F., Liu, S., Pu, J., Hu, J., Sheng, Q., Zhu, T., Zhu, T., Li, B., and Ran, P. (2018). PM2.5 Induced the Expression of Fibrogenic Mediators via HMGB1-RAGE Signaling in Human Airway Epithelial Cells. *Can Respir J* 2018.

ANNEXES

ANNEXE I

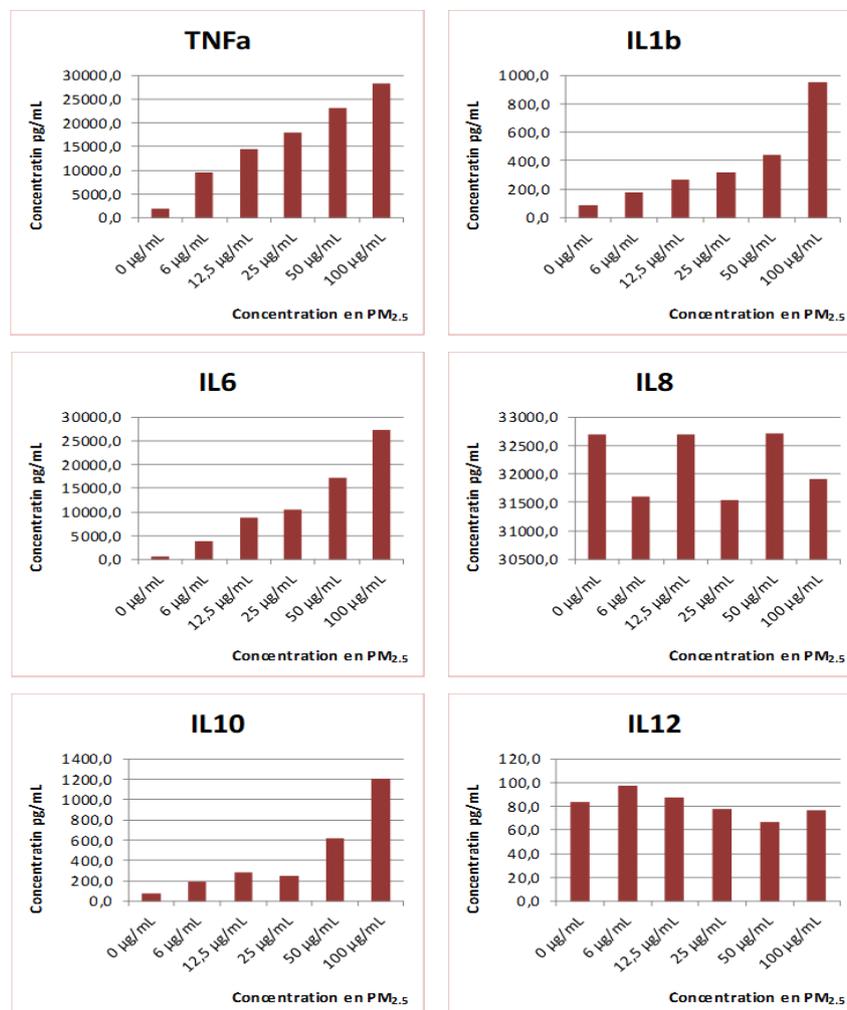
ROSE DES VENTS POUR CHACUNE DES SAISONS DE LA CAMPAGNE ANNUELLE D'ECHANTILLONNAGE



La rose des vents met en évidence sous quelles directions les vents ont été enregistrés, et à quelle fréquence, pendant une période donnée. Dans notre cas, les représentations précisent également la vitesse du vent. Au cours du printemps 2014, les vents venaient majoritairement du secteur Nord- Nord-Est avec une vitesse comprise entre 4 et 8 $m.s^{-1}$. Durant l'été 2014, cette tendance est partiellement conservée mais la rose présente fait apparaitre également des vents de secteur Sud-Ouest, et Nord-Ouest, dans une moindre mesure. En automne 2014, les vents provenaient très majoritairement de secteur Sud-Sud-Est à Sud-Sud-Ouest avec une vitesse comprise entre 2 et 8 $m.s^{-1}$. L'hiver 2015 est principalement caractérisé par des vents de secteur Sud à Nord-Nord-Ouest, avec une vitesse comprise entre 4 et 8 $m.s^{-1}$, voire supérieure.

ANNEXE II

OPTIMISATION DE LA CONCENTRATION EN PM_{2.5} POUR L'EXPOSITION DES MONOCYTES PRIMAIRES



Pour déterminer la concentration en PM_{2.5}, nous avons exposé en plaque 6 puits des monocytes à 6 concentrations de PM_{2.5} : 0 μg/mL, 6 μg/mL, 12,5 μg/mL, 25 μg/mL, 50 μg/mL et 100 μg/mL. Les cellules ont été exposées pendant 48h. Nous avons dosé différentes cytokines dans les surnageants de culture. Les résultats montrent une augmentation croissante avec la concentration en PM_{2.5} pour le TNFα, l'IL1β, l'IL6 et l'IL10. En rapportant nos résultats avec ceux obtenus sur les THP1, mais également en nous basant sur une étude précédente menée sur les BEAS-2B dans laquelle les cellules avaient été exposées à 3 μg/cm² de PM, nous avons choisi d'exposer les macrophages primaires à 12,5 μg/mL, correspondant à 2,66 μg/cm² de PM_{2.5}.

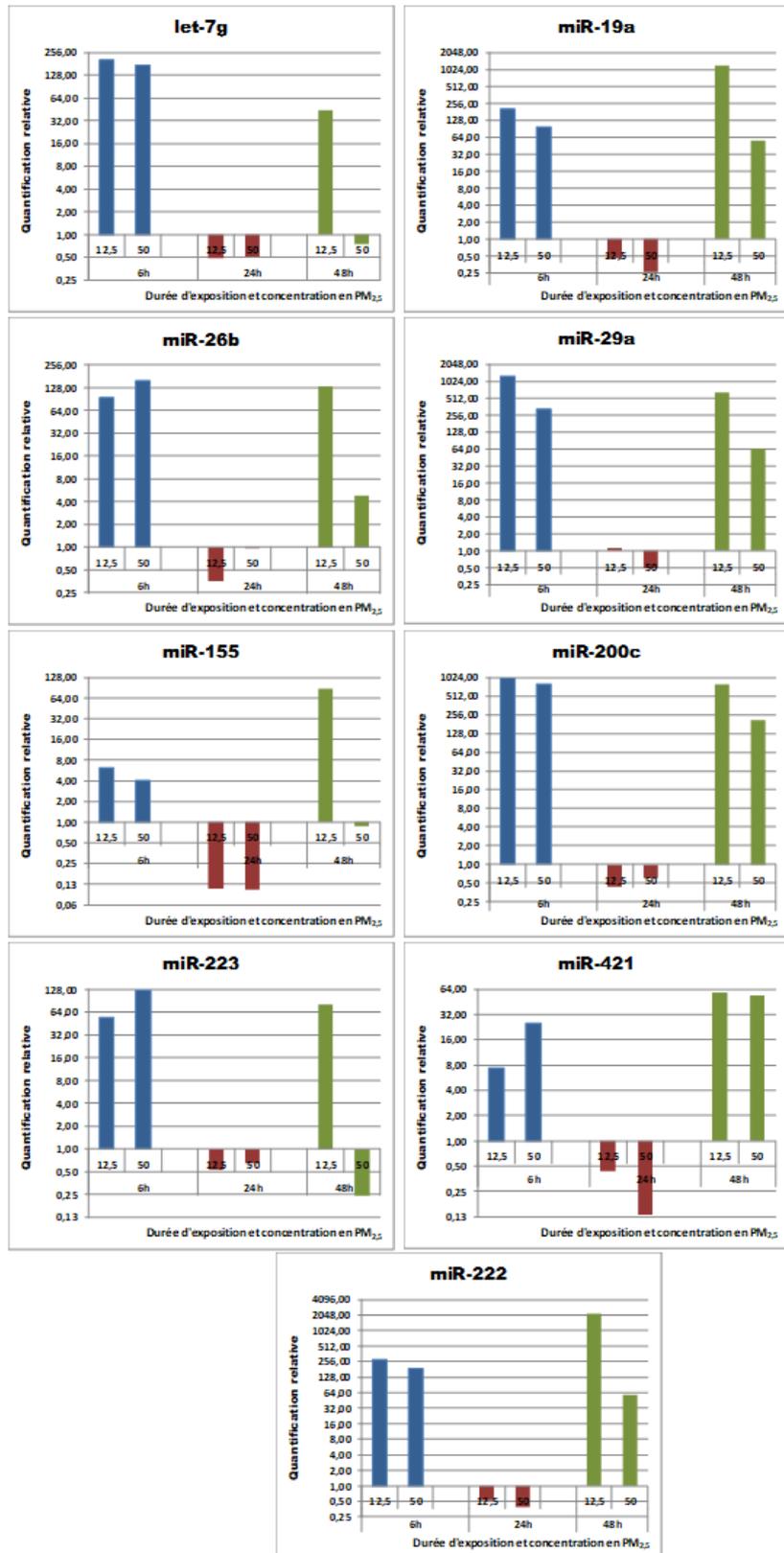
ANNEXE III

FONCTIONS DES MIARN CHOISIS POUR L'ENSEMBLE DES ETUDES

Let-7a / Let-7e / Let-7g	Régulent négativement de multiples oncogènes et promoteurs de cycle cellulaire, sont utilisés comme marqueur de diagnostic dans les cancers du poumon	(Qin et al., 2015; Shell et al., 2007)
miR-16	Utilisé comme miARN de référence dans une étude sur les EV de fumeurs vs non-fumeurs	(Héliot et al., 2016)
miR-19a	OncomiR impliqué dans la régulation de gènes suppresseurs de tumeurs dans les cancers du poumon, altéré chez des patients asthmatiques, impliqué dans la polarisation des macrophages en ciblant la voie de STAT3	(Gu et al., 2017; Sun et al., 2017)
miR-21	Altéré chez les patients asthmatiques (à partir d'exosomes de LBA), surexprimé dans les cancers du poumon	(Levänen et al., 2013; Wang et al., 2011)
miR-26a	Profil différent entre sujets fumeurs et non-fumeurs ; Altéré chez les patients asthmatiques (à partir d'exosomes de LBA),	(Levänen et al., 2013; Takahashi et al., 2017)
miR-26b	Diminué chez les patients atteints de BPCO et dans les cancers du poumon	(Soeda et al., 2013)
miR-27a	Surexprimé dans les cancers du poumon, régule la voie de signalisation du TGFβ, impliqué dans la polarisation des macrophages en ciblant PPARγ	(Chae et al., 2017; Yao et al., 2017)
miR-29a	Agit comme suppresseur de tumeurs dans les cancers du poumon	(Liu et al., 2018b)
miR-29b.1	Impliqué dans la polarisation des macrophages	(Graff et al., 2012)
miR-30a	Diminué dans les cancers du poumon	(Yanaihara et al., 2006)
miR-125	Impliqué dans la polarisation des macrophages, cible IRF4	(Cobos Jiménez et al., 2014; Graff et al., 2012; Zhang et al., 2013b)
miR-128	Induit l'apoptose dans les cancers du poumon, régule les gènes impliqués dans l'inflammation et la fibrose pulmonaire	(Shyamasundar et al., 2018; Zhao et al., 2017)
miR-146a	Inhibe la prolifération cellulaire et la progression du cycle cellulaire dans les cancers du poumon, élevé dans les LBA de rats exposés aux PM _{2.5}	(Hou et al., 2018; Li et al., 2016b)
miR-155	Impliqué dans la polarisation des macrophages, cible SOCS1	(Zhou et al., 2017)
miR-193c	Impliqué dans la polarisation des macrophages	(Cobos Jiménez et al., 2014)
miR-197	Signature d'agressivité des cancers du poumon, marqueur de diagnostic dans les cancers du poumon vs sujets sains	(Boeri et al., 2011; Qin et al., 2015)
miR-200c	Facteur de pronostic dans la progression et la métastase des cancers du poumon	(Berlanga et al., 2016)
miR-222	Impliqué dans la polarisation des macrophages, cible SOCS3	(Ying et al., 2016)
miR-223	Dans les cancers du poumon, module l'invasion cellulaire en ciblant EPB41L3 ; Augmenté chez les patients NSCLC vs sujets sains	(Liang et al., 2014)
miR-331	Profil différent entre sujets fumeurs et non-fumeurs	(Takahashi et al., 2017)
miR-378a	Utilisé dans le diagnostic du cancer du poumon	(Cazzoli et al., 2013)

ANNEXE IV

EXPRESSION GENIQUE DES miARN DES EV DE THP1 APRES EXPOSITION AUX PM_{2.5}



ANNEXE V

MESURE DE LA PRODUCTION DE CYTOKINES DANS LE SURNAGEANT DES BEAS-2B APRES EXPOSITION AUX PM_{2.5}

