



HAL
open science

Effets de la pollution atmosphérique particulaire sur la circulation pulmonaire : rôles du stress oxydant et de la signalisation calcique.

Juliette Deweirdt

► To cite this version:

Juliette Deweirdt. Effets de la pollution atmosphérique particulaire sur la circulation pulmonaire : rôles du stress oxydant et de la signalisation calcique.. Biologie cellulaire. Université de Bordeaux, 2018. Français. NNT : 2018BORD0333 . tel-03035008

HAL Id: tel-03035008

<https://theses.hal.science/tel-03035008>

Submitted on 2 Dec 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE PRÉSENTÉE
POUR OBTENIR LE GRADE DE
DOCTEUR DE
L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ
SPÉCIALITÉ : BIOLOGIE CELLULAIRE ET PHYSIOPATHOLOGIE

Par **Juliette DEWEIRDT**

**EFFETS DE LA POLLUTION ATMOSPHERIQUE PARTICULAIRE
SUR LA CIRCULATION PULMONAIRE : ROLES DU STRESS
OXYDANT ET DE LA SIGNALISATION CALCIQUE**

Sous la direction du Docteur Isabelle BAUDRIMONT

Soutenue le 7 décembre 2018

Membres du jury:

Mme VIAN Laurence	Professeur	Université de Montpellier	Présidente Rapporteuse
M. GARCON Guillaume	Professeur	Université de Lille	Rapporteur
M. MOREL Jean-Luc	Chargé de recherche	Université de Bordeaux	Examinateur
Mme BAEZA-SQUIBAN Armelle	Professeur	Université de Paris-Diderot	Invitée
Mme BAUDRIMONT Isabelle	Maitre de conférences	Université de Bordeaux	Directrice

Effets de la pollution atmosphérique particulaire sur la circulation pulmonaire: rôles du stress oxydant et de la signalisation calcique

L'exposition humaine aux particules atmosphérique (PM) est une préoccupation majeure de santé publique. La pollution particulaire est constituée de particules grossières (PM₁₀ diamètre < 10 µm), de particules fines (PM_{2.5} diamètre < 2.5 µm) et de particules ultrafines (PUF ou PM_{0.1} diamètre < 100 nm). L'excès de mortalité constaté par les études épidémiologiques est principalement associé aux pathologies respiratoires et cardiovasculaires. Après inhalation, les particules les plus fines (PM_{2.5} et PUF) pénètrent profondément dans les voies respiratoires jusqu'aux alvéoles pulmonaires. Des études ont montré qu'elles peuvent franchir la barrière alvéolo-capillaire pour se retrouver dans la circulation systémique et y exercer leurs effets délétères sur les organes cibles tel que le système cardiovasculaire. La circulation pulmonaire constitue donc une cible privilégiée des particules inhalées, particulièrement les cellules endothéliales qui tapissent la lumière des vaisseaux. L'hypertension pulmonaire (HTP) est une pathologie de la circulation pulmonaire caractérisée par un remodelage des vaisseaux pulmonaires, une hyperréactivité et une inflammation. Des études récentes ont montré le rôle prépondérant du calcium et du stress oxydant dans la physiopathologie de cette maladie. Cependant, peu d'études mécanistiques visent à expliquer les effets des PM sur les cellules cibles vasculaires pulmonaires. Dans ce contexte, ce travail vise à mieux caractériser les effets cellulaires et moléculaires des particules sur les cellules endothéliales d'artères pulmonaires humaines (HPAEC).

L'impact des PM_{2.5} et des nanoparticules (NPs) noires de carbone (FW2) sur les cellules endothéliales d'artères pulmonaires humaines entraîne des dérégulations de l'homéostasie cellulaire. En effet, nos résultats montrent une augmentation significative du stress oxydant et, notamment, de la production d'anion superoxyde cytoplasmique et mitochondrial, des perturbations de la signalisation calcique, des dommages mitochondriaux, ainsi qu'un déséquilibre de la sécrétion de facteurs vasoactifs tels que le monoxyde d'azote (NO). Nous avons, également, étudié sur ces cellules cibles vasculaires pulmonaires humaines, dans des conditions physiologique et pathologique mimant l'HTP, les effets des particules sur la signalisation calcique ainsi que le rôle du stress oxydant dans les effets observés. Nous avons, dans un premier temps, développé et validé un modèle *in vitro* qui mime la dynamique vasculaire observée dans l'HTP. Dans une deuxième étape, nous avons observé les effets des NPs FW2, dans les deux conditions expérimentales. Nos résultats montrent, dans les cellules placées en conditions pathologiques, une augmentation significative de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) ainsi qu'une augmentation significative de la réponse pro-inflammatoire caractérisée par la sécrétion d'interleukines telles que l'IL-6 par rapport aux cellules placées en condition physiologique. De plus, la signalisation calcique semble également altérée dans les conditions pathologiques.

En conclusion, l'exposition humaine aux particules atmosphériques pourrait être un facteur de risque dans l'aggravation de pathologies cardiovasculaires telles que l'HTP.

Mots clés : pollution atmosphérique, PM_{2.5}, nanoparticules noires de carbone, stress oxydant, signalisation calcique, cellules endothéliales d'artères pulmonaires humaines, hypertension pulmonaire

Effects of airborne particulate matter on the pulmonary circulation: roles of oxidative stress and calcium signaling

Human exposure to airborne particulate matter (PM) is a health risk concern. Particulate air pollution is composed of different PM: coarse particles (PM₁₀ diameter < 10 μm), fine particles (PM_{2.5} diameter < 2.5 μm) and ultrafine particles (UFP) (PM_{0.1} diameter < 100 nm). The excess of mortality observed in several epidemiological studies is mainly associated with respiratory and cardiovascular diseases. After inhalation, the finest particles (PM_{2.5} and UFP) penetrate deeply into the airways, accumulate in pulmonary alveoli, cross the epithelial barrier to reach the pulmonary circulation and exert deleterious effects on the cardiovascular system. Inhaled particles are therefore observed in the pulmonary circulation, in direct contact with endothelial cells lining the inner surface of blood artery. Pulmonary Hypertension (PH) is the main disease of the pulmonary circulation characterized by remodeling of the pulmonary wall, changes in pulmonary vascular hyperactivity and inflammation. Oxidative stress and alteration in calcium signaling are also critical events involved in the physiopathology of PH. However, the effect of PM on these pulmonary vascular cellular targets is poorly described. In this context, the objectives of the present study are to assess the cellular and molecular effects of particle exposures in human pulmonary artery endothelial cells (HPAEC).

Our results highlighted various cellular homeostasis alterations of HPAEC in response to PM_{2.5} and black carbon nanoparticles (FW2 NPs). We observed a significant increase of oxidative stress including cytoplasmic and mitochondrial superoxide anion production in concentration dependent-manner. Moreover, we observed calcium signaling alterations, mitochondrial damages, as well as a deregulation of vasoactive factors secretion such as nitric oxide (NO). Finally, we studied these cellular targets under physiological and pathological conditions mimicking PH. We have first developed a new *in vitro* model that mimics the vascular dynamics observed in the PH. Then, we investigated the effects of FW2 NPs in both experimental conditions. Our results showed, in pathological conditions, a significant increase in reactive oxygen species (ROS) production and a significant increase in the pro-inflammatory response characterized by interleukin secretion such as IL-6 as compared to cells in physiological condition. In addition, the calcium signaling seemed also be impaired in pathological conditions.

In conclusion, human exposure to atmospheric particles may thus be a risk factor for the exacerbation of pre-existing cardiovascular diseases such as pulmonary hypertension.

Key words: air pollution, PM_{2.5}, black carbon nanoparticles, oxidative stress, calcium signaling, human pulmonary artery endothelial cells, pulmonary hypertension

Préface

Je me suis intéressée à la Toxicologie petit à petit au cours de mon cursus universitaire. Le stage effectué au sein de l'OMS à Genève, entre mars et août 2014, m'a ouvert les portes de la Toxicologie. J'ai eu l'opportunité de travailler dans le domaine des pesticides, et d'organiser une réunion avec des experts internationaux sur les résidus de pesticides à la FAO (Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture), à Rome. En revenant en France, j'ai suivi les cours du master 2 TES (Toxicologie, Environnement, Santé) dirigé par Mme Baeza-Squiban, à Paris. Ces cours m'ont offert un nombre illimité de préoccupations environnementales: la pollution atmosphérique, les perturbateurs endocriniens, les eaux et les sols pollués... et j'en passe. C'est donc, curieuse et motivée, que j'ai réalisé mon stage de M2 sur la pollution atmosphérique à Bordeaux, avec Isabelle Baudrimont. Par la suite, l'obtention d'une bourse de thèse a été une étape difficile dans mon parcours professionnel. Je voulais absolument continuer le projet débuté au cours de mon M2. Après la non-obtention de la bourse ministérielle, c'est avec détermination que j'ai postulé à différentes bourses au sein de fondations et d'organismes. Je remercie particulièrement la FRM (Fondation pour la Recherche Médicale) de m'avoir donné l'opportunité de réaliser cette thèse, de m'avoir permis de réaliser des publications scientifiques et d'approfondir mes connaissances dans le domaine de la Toxicologie. La cause environnementale me tient très à cœur aujourd'hui, cela est sûrement lié à ces trois années de travail. Ma thèse s'est donc très bien passée, mais elle a été mise à rude épreuve par les imprévus de la vie. Un mois après avoir commencé ma thèse, ma vie personnelle a été chamboulée par des épreuves difficiles. Mes parents ont dû, chacun, affronter des maladies graves. Je ne pourrais donc jamais oublier que ma thèse a été parsemée d'obstacles personnels. Mais comme on me le répète souvent, et comme l'a écrit F. Nietzsche « ce qui ne nous tue pas nous rend plus forts ».

*Bordeaux, le 21 oct. 2018,
Juliette Deweirdt*

Remerciements

Je remercie tout d'abord, Isabelle Baudrimont, qui a été bien plus que ma « simple » directrice de thèse. Je te remercie pour les connaissances que tu m'as transmises, tout ce que tu m'as apporté d'un point de vue scientifique et humain, l'autonomie que tu m'as laissée, ta disponibilité. Tu m'as laissée partir à plusieurs congrès, nous avons partagé celui à Milan où nous avons marché 14 km à travers la ville, à Antibes où nous avons mangé de bonnes soupes de poisson, à Tours où tu as pu rencontrer ma grand-mère ! Tu m'as donné l'opportunité d'avoir une expérience dans l'enseignement, je te remercie beaucoup car je commence à y prendre goût ! Merci pour tout Isabelle. Je ne trouverai pas les mots exacts mais je mesure la chance que j'ai eu de t'avoir comme directrice de thèse ! Nous avons bientôt finalisé quelques projets et il y en a encore... ! Merci de nous avoir fait partager ta passion en 2016, avec une virée dans le bassin d'Arcachon, merci d'avoir été présente dans les moments difficiles, merci de m'avoir soutenue, merci pour les after-repas de Noël, merci pour ces moments !

Je remercie M. Roger Marthan, directeur de l'Unité U1045, dans un premier temps, de m'avoir accueilli au sein du laboratoire CRCTB, Inserm, en janvier 2015 pour effectuer mon stage de M2. Dans un deuxième temps, je vous remercie de m'avoir soutenu dans mes démarches pour obtenir la bourse FRM. Et puis merci de m'avoir offert des opportunités (la remise des prix FRM à Cap Sciences, le dîner à la mairie de Bordeaux...), merci pour nos discussions.

Je remercie beaucoup la Fondation pour la Recherche Médical (FRM) qui m'a permis de réaliser cette thèse !

Je remercie les membres du jury d'avoir accepté de participer à ce jury de thèse. Je remercie Mme le Professeur Laurence Vian, M. le Professeur Guillaume Garçon, M. le Docteur Morel Jean-Luc. Je remercie également Mme le Professeur Baeza-Squiban Armelle, pour son soutien et son temps accordé à mes travaux de recherche. Merci pour votre Master 2 qui m'a ouvert beaucoup de portes.

Je remercie mes collègues de travail au sein du laboratoire U1045, en particulier l'équipe 1 et l'équipe 2. L'arrivée au sein de ce laboratoire n'a pas été facile début 2015, mais finalement tout s'est bien passé et j'ai fait de belles rencontres.

Je remercie M. Savineau Jean-Pierre pour son accueil au sein de son équipe, merci pour les conseils au cours des réunions de l'équipe 1 le vendredi midi. Merci pour nos discussions et de m'avoir soutenu pour l'obtention de la bourse FRM.

Je remercie Christelle Guibert, qui a repris le flambeau de la direction de l'équipe 1. Merci pour tes conseils, nos discussions et surtout de m'avoir donné l'opportunité de présenter mes travaux au Québec au Canada en octobre 2017 !

Je remercie JFQ, M. Quignard, Jean-François, peut-être que ta place est en dessous de celle d'Isabelle, ne m'en veux pas si « tu n'es que là ». Je t'ai vouvoyé de temps en temps car je sais à quel point tu tiens à ton titre de M. le Professeur ! Je te remercie pour beaucoup de choses Jean-François. Merci pour toutes les connaissances scientifiques que tu m'as transmises, merci d'avoir participé à mon projet de thèse. Merci pour nos discussions, nos échanges, nos coups de gueule et nos fous rires. Merci de m'avoir soutenu dans les moments difficiles. Je trinque à notre prochaine grenade !

Je remercie les autres membres de l'équipe 1, Bernard Muller, Thomas Ducret, Mathilde Dubois et Véronique Freund-Michel. Merci pour nos échanges scientifiques. Merci pour les bons moments partagés que ce soit en réunion, dans les couloirs du labo ou à Poitiers!

Je remercie Marianne, une belle compagnie côté pharma !
Je remercie Claude pour ses moments de douceur !
Je remercie également Paul Robillard. Des discussions dans le L2 bis (sur l'Espagne, sur les actualités et j'en passe) ! Une relève de cellules endothéliales ! Bref plein de bons moments !
Je remercie les renforts masculins qui sont arrivés récemment : Guillaume Cardouat et Baptiste Rodes ! Merci pour nos discussions scientifiques et nos échanges bien drôles à la cafète!
Je remercie Elizabeth Génot, Isabelle Frémaux, Florian Alonso. Je remercie Eric Dumas de la Roque et Laurent Renesme. Les électrons libres de l'équipe 1 !

Marilyne tu fais la transition entre les deux équipes ! Je te remercie beaucoup pour tout (voir plus loin).

Je remercie les collègues de l'équipe 2 également, même si nous n'avons jamais eu de réunion ensemble, j'ai passé de trop bons moments avec vous.

Je remercie particulièrement Elise Maurat, Isabelle Dupin et Marilyne Campagnac. Toutes les trois vous avez été mes bouffées d'oxygène au quotidien pendant cette thèse ! Sans oublier Claire Bouvard et Marielle Dubreuil ! Des trop bons moments : déjeuners, cafés, goûters, restau (tiens ça parle encore de manger !) Nos discussions sur la politique, sur l'actualité, de tous les jours ! De bouffe (encore !), de voyages, de chaussures... et j'en passe ! Merci les filles ! On ne se voyait pas forcément tous les jours et pas très longtemps, mais parfois je me demande comment j'aurai tenu sans vous !

Benoit, Bendou, Benito, sacrée rencontre ! Tellement contente que nos chemins se soient croisés ! Je te remercie d'avoir été là au cours de la dernière moitié de ma thèse ! Scientifiquement, personnellement, j'ai adoré nos échanges ! Merci merci !

Je remercie Thomas Trian pour ses drôles d'humeur. Qu'il est marrant (ou pas) ! Je n'oublierai pas ton « ça casse un mythe » mémorable !

Je remercie également Patrick Berger, directeur de l'équipe 2.

Je remercie ma tchote Hannah ! Un an et demi à Boston pendant nos thèses mais trop contente de te retrouver pour finir ce challenge ensemble !

Je remercie à Pauline, Alexis, et la team champignons : Raphaël, Noémie, Louise-Eva, Laurence pour nos discussions du quotidien au loft, nos brain-storming, nos rires, nos éclats et nos cafés !

Je remercie Olga pour nos échanges sur la Russie et la Crimée ! J'espère t'avoir aidé avec le microscope confocal !

Je remercie Fabienne Estelat et Franck pour leurs bonjours et sourires au quotidien !

Je remercie Mimi (Armelle) et Céline, nos supers gestionnaires de l'U1045 ! Merci pour les moments partagés dans votre bureau. Merci Mimi pour ton écoute, ta tendresse et tes phrases réconfortantes !

Je remercie tous ceux qui sont passés au labo pendant cette thèse, tous ceux qui ont ponctué ces trois années riches en rencontre ! Ainsi que les différents agents d'entretiens que nous avons rencontrés : Djamila, Rose, Etiennette, Anne-Marie !

Je remercie les stagiaires M2, SIR et L2 que j'ai co-encadré : Tiare, Manon, Pauline, Jean, Lucille, Olivier, Souriya !

Je remercie Nafiisha, GG, Thibaut, Florence team bureau 15, Laure-Anne, Amandine, Claire, Jennifer, Lebna, Célia, Matthieu, Audrey, Valérie, Valentin, Nichi, Manel, Léo, Claire, Sophie, Clémence, Eline, Fabien et peut-être que j'en ai oublié et j'en suis désolée.

Je remercie l'équipe d'enseignants de Toxicologie de l'UFR de pharmacie de m'accueillir au sein de leur équipe : Arnaud Courtois, Isabelle Passage, Mireille Canal-Raffin, Angelo Contarino. Merci de me former à l'enseignement avec le poste d'ATER.

Je souhaite également remercier les personnes qui ont été avec moi au quotidien pendant cette thèse mais hors des murs du laboratoire.

Je remercie mon copain, Cyprien, qui a enduré mon quotidien tout le long. Un précieux soutien pendant ces trois années. Non pas que ma thèse a été difficile à vivre, mais pour toutes les difficultés rencontrées à côté, tu as toujours été là. Je te remercie d'avoir été présent ! Et je remercie sa grande famille également, ses parents tout particulièrement.

Je remercie mes sœurs : Alice et Emma, mes tchotes soeurette, la vie n'a pas été tendre avec nous. Vous êtes merveilleuses et courageuses ! Vous m'avez été d'un énorme soutien ! Merci merci mes sœurs d'amour !

Je remercie ma mère qui a toujours été présente ! Disponible et un soutien infailible ! Tu as traversé des choses difficiles au début de ma thèse, tu as mené un vrai combat, bravo ! Merci d'être présente au quotidien ! Merci ma moman !

Je voudrais remercier mon père qui m'a poussée et soutenue durant toutes mes études ! Malheureusement tu ne seras pas là le jour de ma soutenance. Tu es toujours de ce monde mais pas dans un bon état de santé. J'ai essayé de faire au mieux pour toi en parallèle de cette thèse. Cela n'a pas été facile tous les jours, mais je suis arrivée au bout !

Je remercie mes grands-parents Line et Gérard Chabaud ! Toujours là quand j'en ai eu besoin et quel soutien quotidien ! Merci infiniment pour tout, votre aide, votre soutien, votre présence ! Je ne vous remercierais jamais assez !

Je remercie ma famille proche comme éloignée : Tonton, Tatie, Cloclo, Matmat, Mumu, Titi, Pierre, Manu, Arthur, Jocelyne & Bernard, mais également, Coco & Lolo, Anne-Claude & Francesco, Sylvie & Bertrand, Dominique & Nadine, Anne L.

Je remercie nos amis bordelais et nantais : Méli & Oli, Fanny, Aymeric & Hélène, Carlos & Julie, Mathieu & Luce, Xav, Théo, Alban, et tous les autres !

Je remercie mes amis du ch'nord : Julie et Galou, Victor, Charles, M@rie, Mary, Anthony & Mathieu.

Je remercie mes amis qui sont à Paris, à Marseille, un peu partout en France ou dans le monde et qui ont été présents : Raquel (& Thomas), Rafiki (& Marie) les anciens bordelais, Cricri d'Amour & Andréa, Sarah & Maxime, Esther, Juliane, Toto, PG, Dadou, Adeline, Samira, Amélie, Séverin & Mathilde, Amalia & Clara, Agathe & Zoé.

Je remercie Hélène Gras pour tout ce qu'elle a fait pour moi et mes sœurs ! Ton soutien, ton aide et ton amitié ont été tellement important pour nous, tu nous as aidées à traverser certaines épreuves de la vie.

Je remercie mon psychologue, M. C***** sans qui le quotidien aurait pu être plus difficile qu'il ne l'était déjà.

Sommaire

Préface.....	4
Remerciements.....	6
Sommaire.....	10
Liste des figures.....	14
Liste des tableaux.....	17
Liste des abréviations.....	19
Valorisations scientifiques.....	22
Formations.....	25
Contexte.....	27
Introduction.....	30
1. La pollution atmosphérique.....	31
1.1 Les différents polluants de l'air.....	31
1.1.a Les polluants primaires.....	31
1.1.b Les polluants secondaires.....	33
1.2 La pollution particulaire.....	33
1.2.a Les différentes sources.....	36
1.2.b Les caractéristiques chimiques.....	37
1.2.c Les caractéristiques physiques : la réactivité de surface.....	40
1.3 Réglementations et prélèvements.....	41
1.3.a La réglementation.....	41
1.3.b Les prélèvements en France.....	44
2. L'appareil respiratoire : voie d'entrée des particules atmosphériques.....	47
2.1 L'appareil respiratoire.....	47
2.1.a La muqueuse respiratoire.....	48
2.1.b Les alvéoles pulmonaires.....	48
2.1.c Epuration des voies aériennes.....	49
2.2 Le dépôt des particules dans l'appareil respiratoire.....	50
2.2.a Les mécanismes de dépôt.....	50
2.2.b La clearance des particules.....	51
2.3 Passage de la barrière capillo-alvéolaire.....	54
3. Le système cardio-vasculaire.....	56
3.1 La circulation pulmonaire.....	57
3.1.a Rôle et organisation.....	57
3.1.b Structure de la paroi artérielle pulmonaire.....	58
3.2 L'endothélium.....	59
3.2.a Généralités.....	59
3.2.b Les cellules endothéliales.....	61

3.3 L'Hypertension pulmonaire (HTP)	69
3.3.a Définition et généralités	69
3.3.b La classification.....	69
3.3.c Signes cliniques et diagnostics	72
3.4 Les mécanismes physiopathologiques	72
3.4.a L'hyperréactivité ou vasoréactivité	72
3.4.b Le remodelage artériel.....	73
3.4.c L'inflammation.....	74
3.4.d Le rôle du stress oxydant dans la dysfonction endothéliale	77
4. Effets des particules sur la santé humaine.....	86
4.1 Etudes épidémiologiques.....	86
4.1.a Etudes à court terme	87
4.1.b Etudes à long terme	88
4.1.c Effets de la pollution sur le système cardiovasculaire.....	89
4.1.d La pollution particulaire et l'hypertension	91
4.1.f Effets de la diminution de la pollution atmosphérique	91
4.2 Etudes <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> : mécanismes d'action des particules de la pollution atmosphérique	93
4.2.a Internalisation des particules	93
4.2.b Les particules et le stress oxydant	95
4.2.c Les particules et la réponse pro-inflammatoire	102
4.2.d Les particules et l'apoptose	105
Matériels et méthodes.....	111
1 Les milieux de culture et les réactifs	112
2. Les particules étudiées	114
2.a Les particules atmosphériques PM _{2.5}	114
2.b Les nanoparticules noires de carbone FW2: NPs FW2.....	116
3. La culture cellulaire.....	117
3.a Cellules endothéliales d'artères pulmonaires humaines.....	117
3.b Condition de culture cellulaire	117
3.c Modèle <i>in vitro</i> qui mime l'hypertension pulmonaire: culture cellulaire dans les chambres d'étirements et en hypoxie.....	118
3.d Comptage des cellules (chambres en silicone).....	119
3.e Exposition des cellules avec les différentes particules.....	119
4. Internalisation des particules (MET).....	120
5. Evaluation de la cytotoxicité	120
6. Evaluation du stress oxydant acellulaire	121
6.a Evaluation du stress oxydant acellulaire par la sonde CM-H ₂ DCFDA.....	121

6.b Evaluation du stress oxydant acellulaire par résonance paramagnétique électronique	122
7. Evaluation du stress oxydant cellulaire	124
7.a Evaluation globale des ERO par la sonde CM-H ₂ DCFDA	124
7.b Dosage de l'anion superoxyde cytoplasmique intracellulaire par résonance paramagnétique électronique.....	126
7.c Dosage de l'anion superoxyde mitochondrial par microscopie confocale.....	128
8. Evaluation de la sécrétion de cytokines et de facteurs de croissance.....	128
8.a Quantification des cytokines pro-inflammatoires IL-6 et IL-8	128
8.b Dosage du facteur de croissance des fibroblastes-2 (FGF-2).....	129
9. Mesures du calcium au microscope confocal.....	130
9.a Mesure du calcium cytoplasmique	130
9.b Mesure du calcium mitochondrial.....	131
9.c Mesure du calcium du réticulum endoplasmique (RE)	132
10. Mesure du potentiel membranaire des mitochondries.....	133
11. Mesure de la dynamique mitochondriale	133
12. Mesure du monoxyde d'azote et des peroxy-nitrites.....	134
12.a Mesure du monoxyde d'azote (NO) au microscope confocal	134
12.b Dosage du NO et des peroxy-nitrites (ONOO ⁻) par le Réactif de Griess.....	135
13. Analyses statistiques	136
Résultats et Discussion.....	137
1. Implication du stress oxydant et de la signalisation calcique dans les dommages causés par les PM _{2.5} sur des cellules endothéliales de l'artère pulmonaire humaine.	139
2. Effets des nanoparticules de noires de carbone (NPs FW2) sur les cellules endothéliales de l'artère pulmonaire humaine: rôle du stress oxydatif sur la signalisation calcique et la fonction mitochondriale”.....	143
3. Effets des nanoparticules noires de carbone sur des cellules endothéliales d'artères pulmonaires humaines en condition physiologique et pathologique mimant l'HTP <i>in vitro</i>	147
Conclusion générale	157
Perspectives.....	161
Références	162

Liste des figures

Figure 1 : Echelle de la taille des particules atmosphériques.....	36
Figure 2 : Sources d'émission des PM _{2.5} en Europe entre 1990 et 2016.....	37
Figure 3 : Les trois principaux mécanismes de formation des particules secondaires de la pollution atmosphérique	39
Figure 4 : L'importance de la taille des particules	41
Figure 5 : L'importance de la surface des particules	41
Figure 6 : Comparaison de la distribution d'une particule en fonction du nombre, de leur surface ou de leur volume selon leur taille	41
Figure 7 : Représentation schématique des principaux textes de la réglementation relative à la qualité de l'air en Europe et en France	43
Figure 8 : Evolution des concentrations moyennes annuelles de PM _{2.5} en France	43
Figure 9 : Station de mesure de l'AASQA à Bordeaux, mars 2018.....	45
Figure 10 : Station fixe de proximité, périphérique de Paris Porte d'Auteuil (Projet POTOX).....	46
Figure 11 : Structure de l'appareil respiratoire	47
Figure 12 : Représentation schématique d'une alvéole pulmonaire tapissées de deux types de cellules épithéliales : les pneumocytes de type I et de type II	49
Figure 13 : Déposition dans l'appareil respiratoire des particules atmosphériques inhalées en fonction de leur diamètre	51
Figure 14 : Voies de translocation des particules dans et hors les voies respiratoires	52
Figure 15 : Translocation des particules à travers les jonctions cellulaires	53
Figure 16 : Schéma de la barrière capillo-alvéolaire	55
Figure 17 : La circulation sanguine.....	56
Figure 18 : La circulation pulmonaire	57
Figure 19 : Schéma de la paroi artérielle pulmonaire	58
Figure 20 : Forces mécaniques agissant sur l'artère pulmonaire	60
Figure 21 : Schéma de la signalisation calcique	62
Figure 22 : Schéma de la voie de l'inositol 1,4,5-triphosphate (IP ₃) dans une cellule	63
Figure 23 : Schéma de la chaîne respiratoire mitochondriale	65
Figure 24 : Régulation du calcium au niveau des mitochondries	66
Figure 25 : Schéma de la sécrétion des facteurs vasodilatateurs (PGI ₂ , NO et EDHF) des cellules endothéliales et leurs effets sur les cellules musculaires lisses	68
Figure 26 : Le remodelage artériel dans une artère pulmonaire saine et dans le cas de l'HTAP ..	74
Figure 27 : Les trois principaux mécanismes, étroitement liés, retrouvés dans l'HTP expliquant l'augmentation des RPV	77
Figure 28 : Production des ERO par la réduction progressive de l'O ₂ en H ₂ O	78
Figure 29 : Schéma des différentes sources intracellulaires de la formation des ERO	79
Figure 30 : Le système antioxydant enzymatique cellulaire	79
Figure 31 : Effets des ERO dans la dysfonction endothéliale sur les CE et les CML	83
Figure 32 : Effets des ERO dans l'HTP	84
Figure 33 : Les différents effets cardiovasculaires après exposition à la pollution particulaire des PM _{2.5} et PM ₁₀	90
Figure 34 : Schéma des différentes voies d'internalisation cellulaire	93
Figure 35 : Potentiel oxydant des particules en condition acellulaire et cellulaire	95
Figure 36 : Les différentes sources des ERO extra et intracellulaire après exposition avec les particules	100
Figure 37 : Schéma des effets du stress oxydant en fonction de la quantité d'ERO produite	101
Figure 38 : Mécanismes des PM qui induisent des dommages sur des cellules endothéliales	103
Figure 39 : Prélèvements des particules PM _{2.5} sur un site à proximité du trafic	110
Figure 40 : Photographie des filtres en Téflon avec des PM _{2.5} , récupérés après 24 h sur la station AIRPARIF	111
Figure 41 : Images obtenues au microscope électronique à transmission	111
Figure 42 : HPAEC en culture, images obtenues au microscope à contraste de phase	112
Figure 43 : Appareil d'étirement STREX® commercialisé par B-bridge International	113
Figure 44 : Réaction spontanée entre la sonde CMH et l'O ₂ formant le radical nitroxyde	117

Figure 45 : Mesure de l'amplitude des 3 pics correspondant au spectre d'absorption du radical nitroxyde CM•	118
Figure 46 : Principe de la réaction du test d'évaluation du stress oxydant par la sonde CM-H ₂ DCFDA	119
Figure 47 : : Courbe d'émission de fluorescence de la sonde Fluo-4 lors d'une excitation à 488 nm	125
Figure A : Production globale d'ERO après 20 h dans les différentes conditions expérimentales	143
Figure B: Sécrétion d'interleukines IL-6 après 20 h dans les différentes conditions expérimentales	144
Figure C : Production du facteur FGF-2 après 20 h dans deux conditions expérimentales (normoxie 0% et hypoxie + étirement à 20 %, respectivement)	145
Figure D : Production globale d'ERO dans les cellules HPAEC après 4 h d'exposition avec les NPs FW2 (5 ; 7,5 et 10 µg/cm ²) dans les conditions physiologique et pathologique	146
Figure E : Sécrétion d'interleukines IL-6 et IL-8 dans les cellules HPAEC après 6 h d'exposition avec les NPs FW2 (5 ; 7,5 et 10 µg/cm ²) dans les conditions physiologique et pathologique	147
Figure F : Niveau de calcium basal dans les cellules HPAEC après 4 h d'exposition avec les NPs FW2 (10 µg/cm ²) dans les conditions physiologique et pathologique	148
Figure G : Signalisation calcique en réponse aiguë à l'ATP dans les cellules HPAEC après 4 h d'exposition avec les NPs FW2 (10 µg/cm ²) dans les conditions physiologique et pathologique	149
Figure H : Internalisation dans les cellules HPAEC des NPs FW2 (7.5 µg/cm ²) dans les conditions physiologique (X5000 et X7000) et pathologique (X4000 et X10000) après 4 h d'exposition (Microscopie électronique à transmission	150

Liste des tableaux

Tableau 1 : Les différents polluants (et leur pourcentage d'émission en France) en fonction de leurs sources.	37
Tableau 2 : Les différentes méthodes d'analyses en fonction des polluants	46
Tableau 3 : Classification des hypertensions pulmonaires (http)	71
Tableau 4 : Différence entre une population vulnérable et une population sensible.....	89
Tableau 5 : Composition du Krebs-HEPES bicarbonate (KHB)	113
Tableau 6: Composition de la solution de HBSS.....	114
Tableau 7: Composition du MAC/Krebs	114
Tableau 8: Détection des organites de la cellule par sonde fluorescente	114
Tableau 9: Les différentes réactions de transformation du NO en nitrates (NO_3^-) et en nitrites (NO_2^-)	136

Liste des abréviations

[Ca²⁺]_e : concentration calcique extracellulaire
[Ca²⁺]_i : concentration calcique intracellulaire
[Ca²⁺]_m : concentration calcique mitochondriale
[Ca²⁺]_{re} : concentration calcique du réticulum endoplasmique
5-HT : 5-hydroxytryptamine ou sérotonine

AASQUA : Association Agréée de Surveillance de la Qualité de l'Air
ADEME : Agence De l'Environnement et de la Maîtrise d'Energie
AIP : Artère intrapulmonaire
ANSES: Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
ATP: Adénosine TriPhosphate
BPCO : Broncho-Pneumopathie Chronique Obstructive
BSA : Bovine Serum Albumine
Ca²⁺ : Ion calcium
CCDV : Canaux Calciques Dépendants du Voltage
CE : Cellules Endothéliales
CITEPA : Centre Interprofessionnel Technique d'Etude de la Pollution Atmosphérique
CML: Cellules Musculaires Lisses
CO₂ : Dioxyde de carbone
DAG : Diacylglycérol
DLS: Diffusion dynamique de la lumière
EC: Carbone Élémentaire
ECGM: Endothelial Cell Growth Medium
EDHF: Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor
EGTA: Acide egtazique
ELISA: Enzyme Linked Immonusorbent Assay
eNOS : Oxyde nitrique synthase endothéliale
ERO: Espèces Réactives de l'Oxygène
ET-1 : Endothéline-1
FW2 : Nanoparticules de noires de carbone
GSH : Glutathion peroxydase
H₂O₂: Peroxyde d'hydrogène
HAP : Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques
HBSS : Hank's Balanced Salt Solution
HPAEC : Cellules endothéliales d'artères pulmonaires humaines
HTAP : Hypertension artérielle pulmonaire
HTP : Hypertension pulmonaire
HUVEC : Cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine
IL-x : Interleukine x
IP₃: Inositol triphosphate
IP₃R: Récepteur à l'inositol triphosphate
MBC : Milieu Blanc Complet
MCU : Uniport calcique mitochondrial
MET : Microscopie Electronique à Transmission
MRC: Milieu Rouge Complet
NH₄: Ammonium
NO: Monoxyde d'azote
NO₃: Nitrate

NPs : Nanoparticules
O₂: Oxygène
O₂⁻ : Anion superoxyde
OC : Carbone organique
OH[·]: radical hydroxyle
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
ONOO⁻ : Peroxynitrites
PAPm: Pression Artérielle Pulmonaire moyenne
PBS : Phosphate Buffer Saline
PIP2 : Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate
PM: Particulate Matter
PM₁₀ : Particulate Matter (diamètre <10 µm)
PM_{2.5} : Particulate Matter (diamètre <2.5 µm)
PMM: potentiel membranaire mitochondrial
PUF : Particules UltraFines (diamètre <100 nm)
RE: Réticulum Endoplasmique
RPE : Résonance Paramagnétique Electronique
RVP : Résistance Vasculaire Périphérique
RyR : Récepteur à la ryanodine
SERCA: Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca²⁺ ATPase
TG : Thapsigargine
TRP : Transient Receptor Potential
SO₄: Sulfate
SOD : Superoxyde dismutase
TMRM : Tétraméthylrhodamine, méthyl ester

Valorisations scientifiques

Articles:

1/ "Involvement of oxidative stress and calcium signaling in airborne particulate matter - induced damages in human pulmonary artery endothelial cells". Deweirdt J., Quignard J.F., Crobeddu B., Baeza-Squiban A., Sciare J., Courtois A., Lacomme S., Gontier E., Muller B., Savineau J.P., Marthan R., Guibert C., Baudrimont I. *Toxicol In Vitro*. 2017 Dec;45(Pt 3):340-350. doi: 10.1016/j.tiv.2017.07.001. Epub 2017 Jul 5.

2/ "Effect of carbon black nanoparticles on human pulmonary artery endothelial cells: role of oxidative stress on calcium signaling and mitochondrial function". **Juliette Deweirdt**, Jean-François Quignard, Sabrina Lacomme, Etienne Gontier, Jean-Pierre Savineau, Roger Marthan, Christelle Guibert and Isabelle Baudrimont. *Particle and Fibre Toxicology*. **En soumission**.

Congrès (communications orales):

1/ Congrès RSRQ 2018 (Réseau en Santé Respiratoire du Québec), Montréal 21-23 novembre 2018. « Rôle du stress oxydatif induit par les nanoparticules de noires de carbone (FW2) sur la signalisation calcique et les mitochondries dans les cellules endothéliales d'artères pulmonaires humaines. **J. Deweirdt**, J.F. Quignard, Ducret T., J.P. Savineau, R. Marthan, C. Guibert, I. Baudrimont.

2/ Journée de l'école doctorale de Bordeaux (18th doctoral school of Health and Life Sciences Day), Talence 18 avril 2018. "Effect of NPs FW2 on oxidative stress and intracellular calcium signaling in HPAEC in physiological and pathological conditions" **Deweirdt J.**, Quignard J.F., Ducret T., Guibert C., Savineau J.P., Baudrimont I.

3/ Congrès de la Biennale de Pneumologie, Québec 12-14 octobre 2017. "Effets de nanoparticules de noires de carbone (FW2) sur des cellules endothéliales d'artères pulmonaires humaines en condition physiologique et pathologique ". **Deweirdt J.**, Quignard J.F., Guibert C., Savineau J.P., Baudrimont I.

Prix de la meilleure communication orale: dont l'invitation au Congrès RSRQ 2018.

4/ Congrès EAC 2017 (European aerosol conference), Zurich 27-30 août 2017. "Effect of nanoparticles on oxidative stress and intracellular calcium signaling in pulmonary artery endothelial cells in physiological and pathological conditions" **Deweirdt J.**, Quignard J.F., Guibert C., Savineau J.P., Baudrimont I.

Congrès (Posters):

1/ Congrès Français sur les Aérosols (CFA), Paris janvier 2018. « Développement d'un nouveau modèle *in vitro* pour l'étude de l'impact des particules atmosphériques sur des cellules endothéliales d'artères pulmonaires ». **Deweirdt J.**, Quignard J.F., Ducret T., Guibert C., Savineau J.P., Baudrimont I.

2/ Congrès ESTIV 2016, Juan-les-pins 17-20 octobre 2016, subventionnée par une bourse de la SFT (Société Française de Toxicologie). "Oxidative stress and calcium signaling play an important role in airborne particulate matter and nanoparticles-induced damages in pulmonary artery endothelial cell". **J. Deweirdt**, M.B. Crobeddu, J. Sciare, A. Baeza-Squiban, C. Guibert, J.P. Savineau, J.F. Quignard I. Baudrimont.

3/ Congrès EAC 2016, Tours 5-9 septembre 2016. « Effect of airborne particulate matter on oxidative stress, pro-inflammatory response and intracellular calcium signaling in human pulmonary artery endothelial cells". **Deweirdt J.**, Guibert C., Savineau J.P., Quignard J.F. Baudrimont I. Présentation orale préparée en cas de désistement, imposée par le comité scientifique (Reserve paper).

4/Journée scientifique de la Fédération de Recherche “Technologies pour la Santé”, le 14 juin 2016 à l’auditorium de l’IECB, Pessac. “Oxidative stress and calcium signaling play an important role in particles - induced damages in pulmonary artery endothelial cells” **Deweirdt J.**, Guibert C., Savineau J.P., Quignard J.F. Baudrimont I.

5/ Congrès stressOX Adebitech: Modulation du stress oxydant, Romainville 31 mai et 1er juin 2016. “Oxidative stress plays an important role in airborne particulate matter and nanoparticles - induced damages”. **J. Deweirdt**, M. B. Crobeddu, J. Sciare, A. Baeza-Squiban, C. Guibert, J.P. Savineau, J.F. Quignard I. Baudrimont.

6/ Congrès EAC 2015, Milan 6-11 septembre 2015. Présentation des résultats obtenus en Master2: “Effect of airborne particulate pollution on calcium signaling in human pulmonary artery endothelial cells”. **J. Deweirdt**, M. B. Crobeddu, J. Sciare, A. Baeza-Squiban, C. Guibert, J.P. Savineau, J.F. Quignard I. Baudrimont.

Participation à différents événements et colloques:

1/ Participation en tant qu’intervenant à une formation pour les assistants de prévention de l’INSERM : Les NANOMatériaux au laboratoire

2/ Participation à la soirée Pessac-Léognan organisée par la FRM (M. Claude Cassagne) le 22 septembre 2016 à la mairie de Bordeaux. Promouvoir la recherche auprès des donateurs.

3/ Reportage par France3 Aquitaine au CRCTB (INSERM U1045) sur la thématique de thèse, le 30 mai 2016, à Bordeaux (diffusion JT 19/20 Aquitaine le 30 mai 2016).

4/ Participation à la remise des soutiens annuels de la FRM aux chercheurs d’Aquitaine, le 25 mai 2016 à Cap Sciences, Bordeaux.

5/ Participation au colloque des jeunes chercheurs d’Aquitaine, le 6 avril 2016 au palais des congrès d’Arcachon.

6/ Participation au colloque ANTIOPES, Paris 14-15 janvier 2016.

Formations

- « Expression écrite, fondamentaux des écrits professionnels » le 3 avril 2017 (7 h)
- *StressOX Adebitech*, Romainville 31 mai et 1^{er} juin 2016, Modulation du stress oxydant (14 h)
- Les nanomatériaux à l'Inserm: usages et risques. Jeudi 18 mai 2017 (7 h)
Les nanomatériaux à l'Inserm: présentation des mesures de prévention mises en place dans le laboratoire (Inserm U1045) pour des assistants de prévention Inserm (unité pilote) le mardi 30 mai 2017 (7 h)
- Inscription « Quelles opportunités après mon doctorat? » du 14 au 16 Juin 2017 (18 h)
- Formation Médicale continue : Biennale de l'espace francophone de pneumologie en octobre 2017 (17 h)
- Ma thèse en 180 secondes en janvier/février 2018 (10 h)
- Enseignements de toxicologie (TP), UFR pharmacie, Université de Bordeaux en octobre-décembre 2018 (30 h)

Total : 110 heures.

Contexte

La pollution atmosphérique particulaire est une préoccupation majeure de santé publique. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, la pollution atmosphérique cause en moyenne chaque année la mort prématurée de 7 millions de personnes dans le monde, dont plus de 500 000 en Europe et autour de 48 000 en France. De plus, elle est incriminée, en France, dans la réduction de l'espérance de vie d'environ 9 mois à l'âge de 30 ans, liée aux pathologies pulmonaires et cardiovasculaires. Les jeunes enfants, les personnes âgées ou les personnes souffrant de pathologies respiratoires et cardiovasculaires préexistantes font partie des populations les plus sensibles. Les fortes concentrations en polluants atmosphérique retrouvées dans l'air ont d'importantes répercussions sur la santé, on distingue les effets à court terme et à long terme. A court terme, les jours de pic de pollution, les services d'urgences médicales reçoivent des patients souffrant de maladies cardiovasculaires, et dans les jours suivant le pic, ceux souffrant d'asthme et de broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO). A long terme (sur plusieurs mois mais surtout plusieurs années), la pollution est incriminée dans les pathologies respiratoires, cardiovasculaires et dans les cancers. Parmi les différents polluants, on distingue des particules (PM), des polluants gazeux (l'ozone, le dioxyde d'azote et de soufre) à cause de leur toxicité élevée vis-à-vis des organismes. Les particules atmosphériques sont des agrégats de matières liquides ou solides, dont la taille et les caractéristiques physico-chimiques vont dépendre de leur source d'émission. Elles peuvent être d'origine naturelle (incendies, éruptions volcaniques, érosion...) ou anthropique (le trafic routier, les chauffages, les incinérateurs, les centrales thermiques et les procédés agricoles et industriels). On distingue trois grands types de particules : les particules grossières ou PM₁₀, les particules fines ou PM_{2.5} et les particules ultrafines (PUF) ou PM_{0.1}. Les premières ont un diamètre \leq à 10 micromètres. Les particules fines ont un diamètre \leq à 2,5 micromètres et les PUF ont un diamètre \leq à 0,1 μm . La préoccupation actuelle de santé publique concerne particulièrement les PM_{2.5} et les PUF, car ce seraient les plus nocives pour la santé humaine. Les PM_{2.5} sont généralement constituées d'un noyau carboné, sur lequel sont adsorbés à leur surface des composés organiques et/ou inorganiques, des métaux, etc. Récemment, avec l'accélération des nanotechnologies, les risques d'exposition aux PUF, et plus particulièrement les nanoparticules NPs (diamètre < 100 nm), dans la population générale mais également dans les milieux professionnels, augmentent de façon exponentielle. Les NPs font donc l'objet d'études scientifiques suite à la découverte d'impacts néfastes sur la santé humaine dû à leurs propriétés physico-chimiques. Des NPs sont également présentes dans l'air, et proviennent essentiellement de tous les processus de combustion. L'excès de morbidité et mortalité, constaté par des études épidémiologiques, est principalement associé aux pathologies respiratoires et cardiovasculaires (1). En 2016, des relevés de l'OMS, ont montré que 75 % de la mortalité liée à la pollution de l'air correspond aux maladies cardiovasculaires (2). En effets, des études ont montré que, après inhalation, les particules les plus fines, caractérisées par une forte réactivité de surface, pénètrent profondément dans les voies respiratoires jusqu'aux alvéoles pulmonaires. Les PM_{2.5} et les NPs, pourraient franchir la barrière alvéolo-capillaire, se retrouver dans la circulation générale et y exercer des effets délétères par des interactions directes avec le

système cardiovasculaire et, notamment, les cellules endothéliales qui tapissent la lumière des vaisseaux et qui contrôlent l'activité vasculaire (3). Des études menées au laboratoire ont pu montrer qu'une exposition aux NPs et aux PM modifiait la réactivité vasculaire d'artères pulmonaires de rats (4-7). Par ailleurs, il est connu que l'inhalation de NPs d'oxyde de titane entraîne, chez le rat, une dysfonction au niveau microvasculaire (8). Enfin, il a été montré une corrélation entre l'exposition aux particules et une augmentation des pressions artérielles pulmonaires (caractéristique de l'hypertension pulmonaire-HTP) (9).

L'HTP est une maladie rare, multifactorielle et mortelle. Elle est définie par une augmentation de la pression artérielle pulmonaire moyenne (PAPm) supérieure à 25 mmHg au repos (10). Cette pathologie est caractérisée par la diminution de la production de facteurs vasodilatateurs et l'augmentation de facteurs vasoconstricteurs qui conduisent à une hyperréactivité vasculaire, un remodelage artériel dû à la prolifération des cellules musculaires lisses (CML) et endothéliales (CE), souvent accompagnée d'une inflammation. Les mécanismes moléculaires impliqués dans l'HTP sont peu connus mais des travaux récents ont montré que l'altération de la signalisation calcique joue un rôle majeur dans la physiopathologie de cette maladie (11). Le stress oxydant (avec la surproduction d'espèces réactives de l'oxygène: ERO) joue, également, un rôle important, dans le développement de l'HTP (12). La circulation pulmonaire pourrait donc constituer une cible privilégiée des particules issues de la pollution atmosphérique. Cependant, peu d'études mécanistiques visent à expliquer les effets directs cellulaires et moléculaires des PM_{2.5} et des NPs sur l'endothélium vasculaire pulmonaire.

Introduction

1. La pollution atmosphérique

D'après l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), la pollution de l'air est définie comme « la contamination de l'environnement intérieur ou extérieur par un agent chimique, physique ou biologique qui modifie les caractéristiques naturelles de l'atmosphère ». La pollution atmosphérique est composée de différents polluants, principalement des gaz et des particules, mais également, des agents biologiques. Les polluants les plus dangereux et les plus préoccupants, d'un point de vue de la santé publique, sont, notamment, les particules et les gaz. Les polluants peuvent provenir, d'une part, d'émissions naturelles ou d'émissions anthropiques (d'origine humaine). Les sources sont donc multiples et la propagation des polluants est sans frontières. En effet, une fois émis dans l'atmosphère, les polluants sont transportés sous l'effet du vent, de la pluie et des gradients de températures jusqu'à des milliers de kilomètres de la source d'émission. Les polluants peuvent également subir des transformations chimiques d'une part, sous l'effet de certaines conditions météorologiques (chaleur, lumière, humidité...) et, d'autre part, en interagissant entre eux, par réactions dans l'air. Il en résulte l'apparition d'autres polluants. Selon différents organismes de Santé (l'OMS, l'Agence Européenne pour l'Environnement (AEE) et le Ministère de l'environnement en France) la pollution serait responsable de la mort prématurée de 7 millions de personnes dans le monde, de plus de 400 000 personnes en Europe dont 48 000 personnes en France. La pollution particulaire est, également, incriminée dans la diminution de l'espérance de vie d'environ 9 mois en France. La qualité de l'air extérieur constitue donc un enjeu majeur de santé publique (13, 14).

1.1 Les différents polluants de l'air

Les polluants atmosphériques sont classés en 2 catégories (15-17):

1.1.a Les polluants primaires

Ils sont émis directement dans l'atmosphère et proviennent de différentes sources, le plus souvent de phénomènes de combustions incomplètes: les oxydes d'azote (NO_x), le dioxyde de soufre (SO₂), le monoxyde de carbone (CO), les particules (ou poussières), les métaux lourds, les composés organiques volatiles (COV), les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), les pesticides.

-Les oxydes d'azote (NO_x): regroupent le monoxyde d'azote (NO) et le dioxyde d'azote (NO₂). Ils sont émis essentiellement de manière anthropique lors de processus de combustion (chauffage, moteurs thermiques des véhicules...). L'industrie est également une source émettrice (la fabrication de nitrate d'ammonium, verrerie...). Par ailleurs, l'agriculture avec l'utilisation des engrais azotés entraîne des rejets de NO_x dans l'atmosphère. Une fois émis dans l'air, le NO se transforme en NO₂, gaz irritant pour les bronches et favorisant les crises d'asthmes et des infections pulmonaires. Les personnes

à risque (asthmatiques, jeunes enfants et personnes âgées) sont plus sensibles à ce polluant. Les NO_x sont également des précurseurs d'autres polluants dits secondaires tels que l'ozone (O₃) troposphérique ou l'ammoniac (NH₃).

-Le dioxyde de soufre (SO₂): est produit de manière anthropique à partir de la combustion d'énergies fossiles (charbon, gazole, fioul...). Certains procédés industriels, tel que le raffinage de pétrole, émet, également, des oxydes de soufre. Ils peuvent également provenir d'émissions naturelles (volcanisme). Ce polluant provoque une irritation des muqueuses, de la peau et des voies respiratoires (toux, gêne respiratoire, troubles asthmatiques). Le SO₂ est également un précurseur de polluants secondaires tel que l'acide sulfurique (H₂SO₄).

-Les composés organiques volatils (COV): constituent une famille très large de molécules comme le benzène, l'acétone... qui peuvent se trouver à l'état de gaz ou s'évaporer facilement dans les conditions classiques de température et de pression lors de leur utilisation. Ils proviennent essentiellement des activités humaines dans trois principaux secteurs d'activités (secteur tertiaire 46%, industrie manufacturière 36%, et les transports 8%). Les COV peuvent provoquer des irritations, une diminution de la capacité respiratoire et des nuisances olfactives. Ils réagissent avec d'autres polluants de l'atmosphère et sont ainsi des précurseurs de l'O₃ troposphérique ou de particules secondaires. Les COV participent à l'effet de serre additionnel et sont considérés comme des gaz à effet de serre (GES).

-Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP): sont issus des processus de combustions incomplètes (d'origine anthropique), de l'utilisation de solvants, de dégraissants, etc. Ils provoquent des irritations, une diminution de la capacité respiratoire et des nuisances olfactives, certains sont considérés comme cancérigènes (par exemple le benzène et le benzo-(a)pyrène B[a]P). Ils sont également les précurseurs de l'O₃ troposphérique.

-Les métaux lourds: sont, pour la plupart, des éléments constitutifs de la croûte terrestre. Ils proviennent principalement de sources naturelles (érosion, éruptions volcaniques ou de feux de forêts). Les sources anthropiques sont principalement liées aux activités métallurgiques (extraction minière, aciérie...), de combustion (incinération de déchets) et aux transports. Le secteur routier a connu une diminution spectaculaire de ses émissions de plomb au cours des deux dernières décennies suite à l'interdiction des essences au plomb au niveau européen. Les métaux lourds sont généralement inhalés directement par l'homme ou ingérés via l'alimentation lors de contamination de la chaîne alimentaire (sols, eau, aliments). Ils s'accumulent dans les organismes vivants et ont des effets toxiques, spécifiques à chaque espèce chimique, à court et long termes. Chez l'homme, ils peuvent affecter les voies respiratoires, le système nerveux, le foie et les fonctions rénales. Il a été montré que certains de ces métaux lourds sont cancérigènes (le cadmium, l'arsenic, le nickel).

1.1.b Les polluants secondaires

Ces polluants sont formés dans l'atmosphère et sont issus de transformations physico-chimiques entre les différents polluants de l'air sous l'effet de conditions météorologiques particulières.

Ils sont essentiellement constitués de l'O₃ troposphérique, de composés inorganiques, comme l'ammoniac, les nitrates et les sulfates, et de polluants particuliers.

-L'ozone (O₃): est un gaz indispensable à la vie terrestre. Naturellement présent dans l'atmosphère, il forme une couche dans la stratosphère qui protège des rayons ultraviolets. Dans la troposphère, l'O₃ est en revanche un polluant atmosphérique nocif pour la santé humaine, les animaux et les végétaux, à cause de son caractère très oxydant. L'O₃ est un polluant secondaire, résultant de transformations photochimiques complexes entre certains polluants comme les NO_x, le CO et les COV. Il est irritant pour l'appareil respiratoire et les yeux et s'associe à l'augmentation du taux de mortalité durant les épisodes de pollution (particulièrement en période estivale).

-L'Ammoniac (NH₃): est lié aux activités agricoles (volatilisation lors des épandages d'engrais minéraux). C'est un gaz irritant qui possède une odeur piquante et qui brûle les yeux et les poumons. Il s'avère toxique quand il est inhalé à des concentrations importantes dans l'atmosphère et sont, en partie, responsable du phénomène des pluies acides qui perturbent les écosystèmes. Il provoque également une acidification des eaux et des sols. C'est également un gaz précurseur de particules secondaires, en se combinant avec d'autres substances il peut former des particules fines qui auront un impact sur l'environnement et la santé.

-Nitrates (NO₃⁻) et Sulfates (SO₄²⁻): les émissions de nitrates sont essentiellement d'origine anthropique, issus de processus de combustion à partir d'oxyde d'azote et de peroxydes d'azote. Les nitrates peuvent s'adsorber sur les particules. Les sulfates se forment dans l'atmosphère par oxydation de dérivés du soufre (H₂SO₄). Produits en excès, ils contribuent aux phénomènes des pluies acides.

La pollution atmosphérique est également constituée de polluants particuliers. Ces derniers font l'objet de notre étude, en raison de leurs effets toxiques sur la santé. Parmi les différents polluants, les particules seraient particulièrement les plus nocives pour la santé, en particulier sur les maladies cardiovasculaires (18, 19).

1.2 La pollution particulaire

Le terme de "particule" regroupe différentes définitions :

-Les aérosols. Ils sont formés de particules solides ou liquides (gouttes) de dimension inférieure à 100 µm, également appelés particules atmosphériques totales (TSP pour « *Total Suspended Particles* »). La définition stricte d'un aérosol est la "suspension, dans

un milieu gazeux, de particules solides ou liquides présentant une vitesse de chute négligeable."

-Les poussières. Ce sont de grosses particules solides inférieures à 75 µm en suspension dans l'air et sédimentables.

-Les "fumées noires". Ce sont des petites particules carbonées en suspension dans l'air de diamètre compris entre 0.1 et 5 µm qui proviennent de processus de combustion.

La pollution particulaire est composée de différents types de particules solides microscopiques tels que les PM (de l'anglais « *Particulate Matter* » qui signifie « matières particulaires ») et des gouttelettes liquides en suspension dans l'air.

Ces particules atmosphériques constituent des mélanges hétérogènes, dont les caractéristiques physico-chimiques varient en fonction des sources et du moment de prélèvement. On définit les particules, essentiellement en fonction de leur diamètre aérodynamique. Le diamètre aérodynamique est défini comme le diamètre d'une sphère à la densité normalisée de 1 g/cm³ qui a la même vitesse de décantation que les particules elles-mêmes (20). On distingue les particules par leur granulométrie (fig. 1):

Les particules totales en suspension

Ce sont des particules qui ont un diamètre aérodynamique moyen compris entre 0.01 et 100 µm. Les particules totales en suspension (appelées aussi TSP pour « *Total Suspended Particles* ») regroupent l'ensemble des particules quelle que soit leur taille.

Les particules grossières (PM₁₀)

Ce sont des particules qui ont un diamètre aérodynamique moyen inférieur à 10 µm. Leur durée de vie est assez courte dans l'atmosphère car elles sédimentent rapidement (effet de gravité terrestre). Elles ont été les premières particules à être l'objet de préoccupations politiques. Elles permettent d'évaluer le degré de pollution atmosphérique en milieu urbain et sont citées lors des pics de pollution aux particules.

Les particules fines (PM_{2.5})

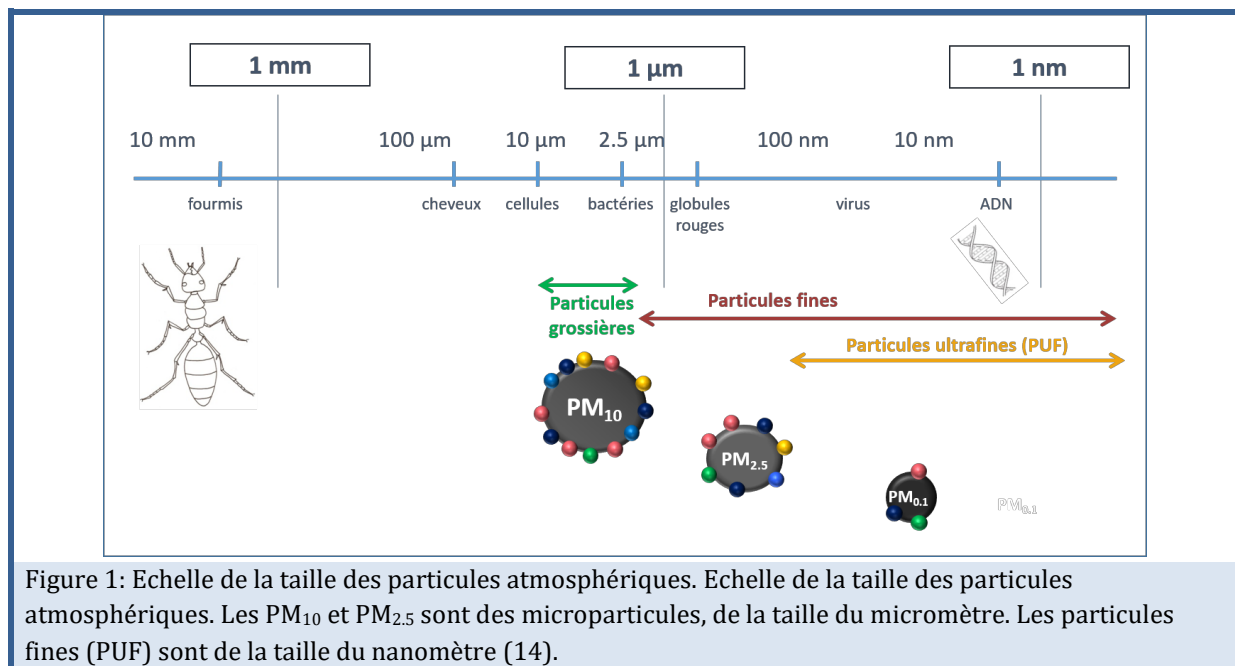
Ces particules présentent un diamètre aérodynamique moyen inférieur à 2.5 µm. Les particules fines tendent à demeurer plus longtemps dans l'atmosphère pouvant aller jusqu'à quelques semaines et seront plutôt éliminées par un dépôt humide (précipitations, brouillard) (21). Leur concentration dans l'atmosphère devient un enjeu majeur de santé publique.

Les particules ultrafines (PUF)

Elles sont appelées également nanoparticules ($PM_{0.1}$) et possèdent un diamètre aérodynamique moyen inférieur à $0.1 \mu\text{m}$ (100 nm). Leur durée de vie dans l'air varie en fonction de leur taille (22). Le phénomène de diffusion va éliminer les particules de très petite taille ($< 10 \text{ nm}$), leur temps de résidence atmosphérique est de quelques minutes à quelques jours. Les PUF peuvent se mesurer en concentration (nombre par centimètre cube : particules/ cm^3). En raison de la forte toxicité des particules les plus fines, leur concentration dans l'atmosphère est également une préoccupation majeure de santé publique.

Les NPs, émises directement dans l'atmosphère, peuvent être d'origine naturelle ou anthropique. Il existe des NPs secondaires qui se forment dans l'atmosphère à partir de processus de nucléation et de condensation gaz-particules (issus des réactions chimiques entre polluants se produisant dans l'atmosphère) (25).

Remarque : Dans le domaine des nanotechnologies, le terme nanoparticules est défini comme un nano-objet : « un matériau dont au moins une dimension externe est à l'échelle nanométrique (entre 1 nm et 100 nm) ou qui possède une structure interne ou de surface à l'échelle nanométrique » (norme ISO/TS 80004).



Les interactions entre les particules et un organisme vivant vont principalement dépendre de la source d'émission, de la composition chimique et de la réactivité de surface.

1.2.a Les différentes sources

Les sources naturelles des PM

Elles résultent des émissions environnementales essentiellement véhiculées par les vents. Il s'agit de particules résultant des phénomènes d'érosion, du volcanisme, de sable, de sels marins ou de particules provenant de sources biologiques.

Les sources anthropiques des PM

Les particules qui proviennent de phénomènes anthropiques sont issues de l'activité humaine. Les principales sources anthropiques de la pollution particulaire sont généralement la combustion d'énergies fossiles comme le trafic motorisé (routier, aérien, maritime...), les centrales électriques et chauffage industriel et résidentiel, les processus d'incinération, l'agriculture, l'usure des pneus et plaquettes de freinage, la fumée de cigarette, etc. (Tableau 1). Les PM sont essentiellement émises lors des processus de combustions d'énergie complètes et/ou incomplètes.

<u>Principales sources</u>	<u>Polluants</u>
Industrie	83% SO ₂ , 40% COV, 27% PM₁₀ , 21% PM_{2.5} , Arsenic, Cadmium, Nickel, Plomb.
Transport routier	61% NO _x (NO ₂), 14% PM₁₀ , 18% PM_{2.5} , 8% COV, Plomb
Résidentiel et chauffage au bois	31% PM₁₀ , 49% PM_{2.5} , 46% COV
Agriculture	28% PM₁₀ , 11% PM_{2.5} , 97% NH ₃
Pas de source directe	Ozone

Tableau 1: Les différents polluants (et leur pourcentage d'émission en France) en fonction de leurs sources (23).

Ci-dessous, exemple de l'évolution des émissions de PM_{2.5} en Europe sur une quinzaine d'années (fig. 2).

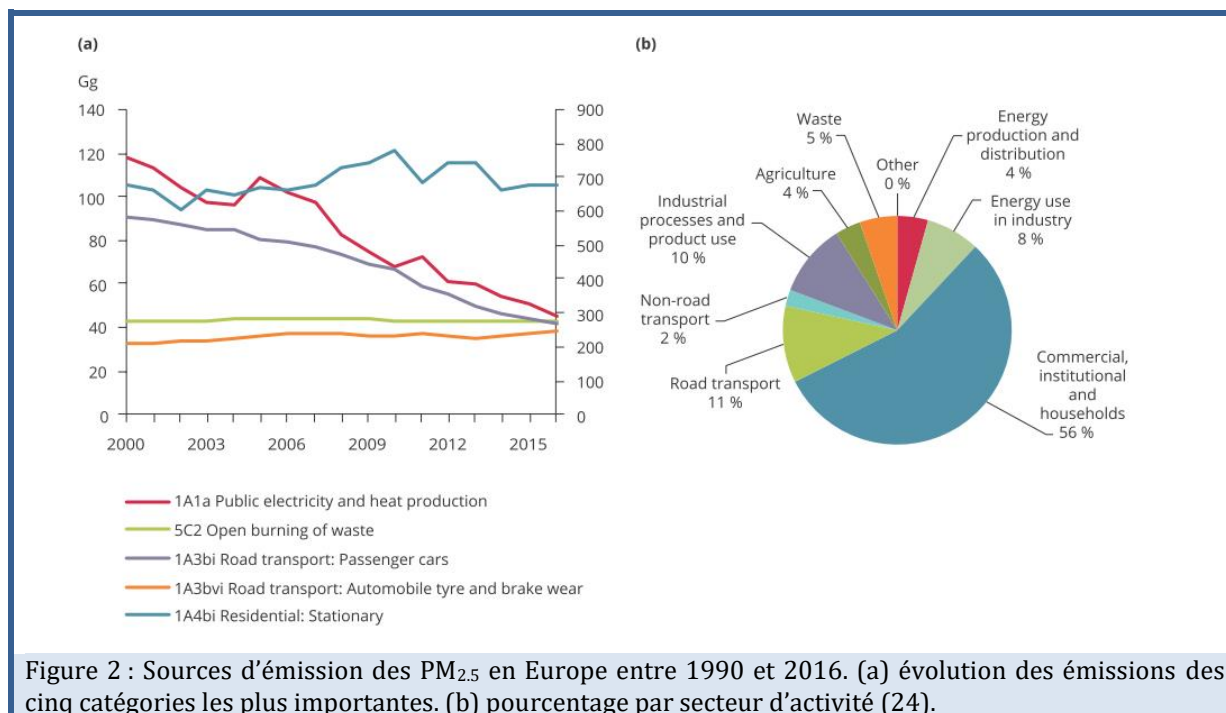


Figure 2 : Sources d'émission des PM_{2.5} en Europe entre 1990 et 2016. (a) évolution des émissions des cinq catégories les plus importantes. (b) pourcentage par secteur d'activité (24).

Le cas particulier des nanoparticules (NPs)

Il existe une autre classification pour les sources d'émission des NPs:

➤ Les NP d'origine « non intentionnelle » proviendraient de l'activité humaine comme la combustion de biomasse, le trafic routier (combustion d'énergie fossile, usure des pneus, les plaquettes de freinage), du toner des imprimantes, de certains procédés industriels... Les NPs peuvent également être remises en suspension lors de l'incinération de nanomatériaux. Le trafic routier étant l'une des principales sources (26).

➤ Les sources de NPs d'origine intentionnelle sont fabriquées intentionnellement dans l'industrie pour des utilisations dans différents domaines (automobile, aéronautique, chimie et matériaux, agroalimentaire, pharmacie et santé, cosmétique...).

1.2.b Les caractéristiques chimiques

Les PM sont généralement composées d'un noyau carboné sur lesquels vont s'adsorber différents éléments chimiques. Les éléments chimiques adsorbés vont dépendre des sources d'émission mais également des transformations qu'elles peuvent subir dans l'atmosphère.

Les principaux composés des PM sont :

-**Les composés carbonés** comprennent le carbone organique, principalement issu de combustions incomplètes, et le carbone élémentaire (noir de carbone) souvent issu de combustions complètes de la matière organique.

Ce sont généralement de fines particules qui peuvent s'agréger entre elles et adsorber d'autres composés organiques. Parmi ces composés organiques, il y a les HAP, les hydrocarbures aliphatiques, des dérivés quinones et d'autres encore. (27).

-**Les composés minéraux et les sels** sont des matériaux d'origine terrestre, des poussières minérales (oxydes d'aluminium, silice) ou encore des composés d'éléments issus de l'érosion comme le fer, mais aussi des embruns (chlorure d'hydrogène, HCl).

-**Les composés inorganiques** comme les nitrates et les sulfates. En général ce sont les particules secondaires, formées dans l'atmosphère, issues de transformations physico-chimiques entre polluants de l'air, il s'agit particulièrement de particules de soufre. Le SO_2 est souvent associé à des particules en suspension notamment des sulfates (SO_4) sous forme de sels ou d'acides. Les particules secondaires peuvent évoluer tout au long de leur durée de vie, par le biais de réactions chimiques et physiques telles que la nucléation, la condensation et la coagulation (fig. 3).

Remarque: les particules atmosphériques formées par nucléation résultent de la combinaison d'une molécule d'acide sulfurique (provenant du SO_2) et d'une molécule organique. La formation de particules par condensation est un mécanisme par lequel des molécules gazeuses se condensent sur des particules. Cela augmente le diamètre aérodynamique des particules tout en conservant leur nombre. Les particules peuvent également se former par le processus de coagulation, cela augmente le diamètre aérodynamique des particules primaires mais diminue leur nombre (28).

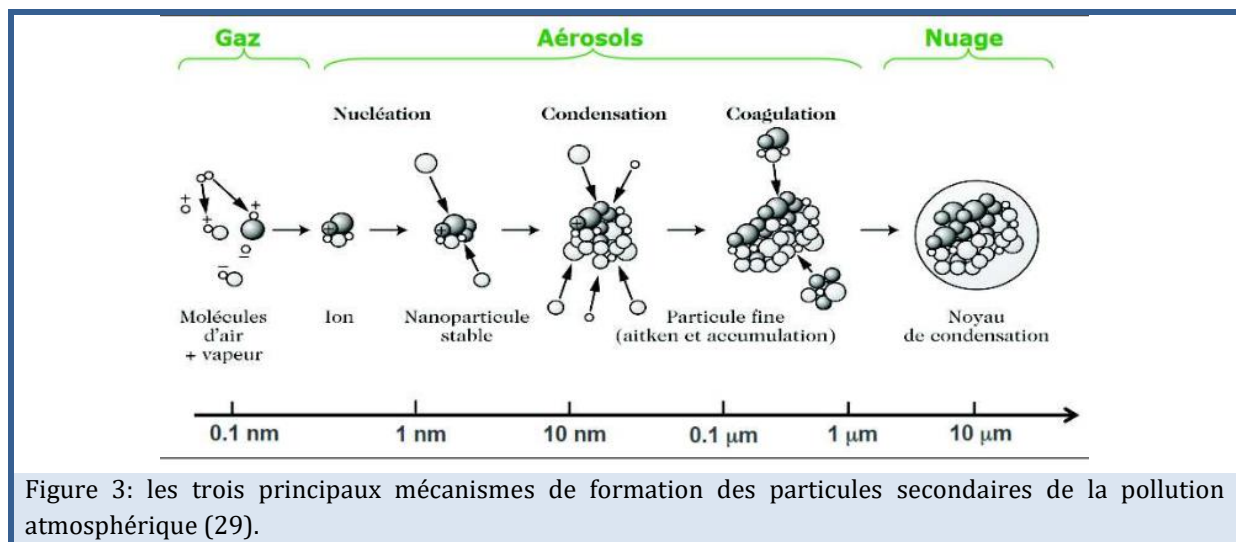


Figure 3: les trois principaux mécanismes de formation des particules secondaires de la pollution atmosphérique (29).

-**Les métaux lourds** (ou éléments traces métalliques : ETM) peuvent être adsorbés sur le noyau carboné des PM (en général en faible quantité ($\mu\text{g/g}$) de PM). Leurs effets sont divers et dépendent de l'état chimique sous lequel on les rencontre (métal, oxyde, sel, organométallique). Par exemple, les transports émettent principalement du cuivre (Cu)

et du fer (Fe) alors que les usines d'incinération plutôt du zinc (Zn) et du cadmium (Cd) (30).

-Les composés biologiques sont des microorganismes morts, vivants ou sous forme de fragments comme des bactéries, des virus, des champignons, des spores, du pollen, des algues, des débris organiques et des endotoxines (31).

Les PM₁₀

Les PM₁₀ jouent un rôle dans la physicochimie de l'atmosphère via leurs actions catalytiques et dans l'adsorption et l'absorption des polluants gazeux (32). Elles sont constituées majoritairement de six composants différents: des matériaux d'origine terrestre, des poussières minérales (oxydes d'aluminium, silice), du carbone organique, du carbone élémentaire et des composés inorganiques. Elles peuvent également être composées d'éléments issus de l'érosion comme le fer, mais aussi des embruns (HCl). Les PM principalement constituées de matière carbonée proviennent des sites de prélèvements à proximité du trafic routier.

Les PM_{2.5}

Des observations au microscope électronique ont montré qu'elles sont majoritairement constituées d'un noyau carboné (résidus solides sous forme de suie) et imprégnées de divers composés, en particulier des HAP imbrûlés, et de composés inorganiques (14). Les PM_{2.5} provenant de l'agriculture sont principalement des particules inorganiques et sont considérées comme moins toxiques comparé aux particules carbonées qui proviennent du trafic routier et de sources de combustions fossiles.

Les PUF

Les particules ultrafines provenant du trafic routier (combustion d'énergie fossile, pots d'échappements) ont un diamètre aérodynamique entre 20 à 100 nm pour les moteurs diesel, et de 20 à 60 nm pour les moteurs à essence (33). Elles peuvent être sous forme de poudres, suspensions liquides, aérosols... il existe donc différentes formes avec des surfaces spécifiques (nanotubes, nanofils, nanocristaux...). Elles peuvent avoir une chimie de surface différente : coating, charges, dissolution, solubilité. Il peut, également, y avoir des interactions avec d'autres particules (agglomération/agrégation) et l'adsorption de composés. Concernant les NPs, elles vont avoir leurs propres propriétés physico-chimiques (carbonée ; agrégats de petites molécules : TiO₂ ZnO... ou encore être un ensemble d'atomes : Ag, Au...).

Ces propriétés physico-chimiques sont importantes à prendre en compte pour comprendre leur distribution dans les voies respiratoires et analyser leur toxicité vis-à-vis de l'organisme.

1.2.c Les caractéristiques physiques : la réactivité de surface

Les particules sont également caractérisées par leur nombre, leur surface et leur volume.

-Les particules les plus fines sont plus importantes en nombre à masse égale que les particules grossières. En effet, il faut un million de NPs (à 100 nm) pour égaler la masse d'une PM₁₀ (fig. 4).

-La surface des particules est plus importante lorsqu'elles ont un plus faible diamètre. Les NPs n'ont presque pas de masse mais leur surface de réaction est proportionnellement plus importante (par unité de poids). Elles ont donc une grande surface spécifique avec la présence de nombreux sites d'adsorption (fig. 5).

-Le volume est également pris en compte, il sera plus important pour les particules fines (de 30 à 300 nm) et pour les PM plus grosses (de 2 à 20 µm) (fig. 6).

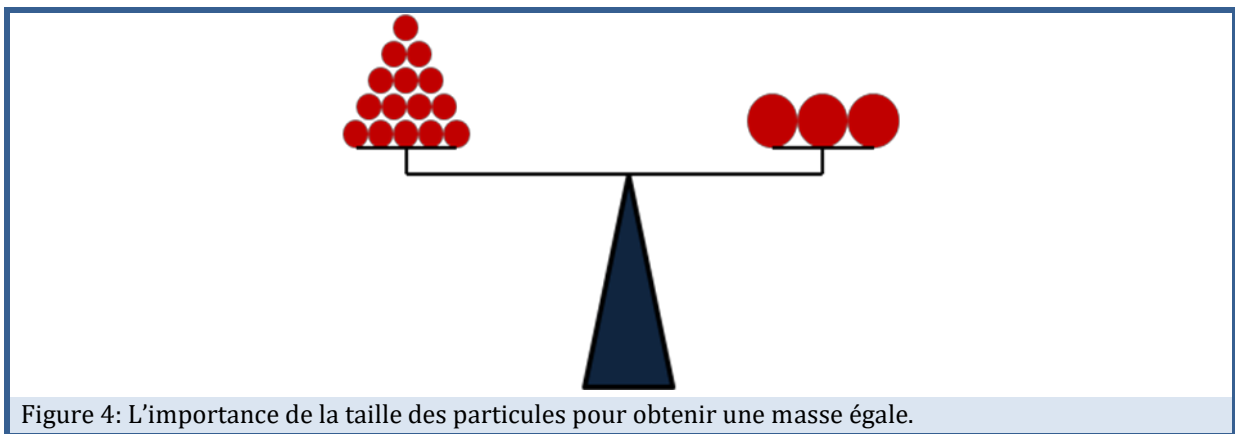
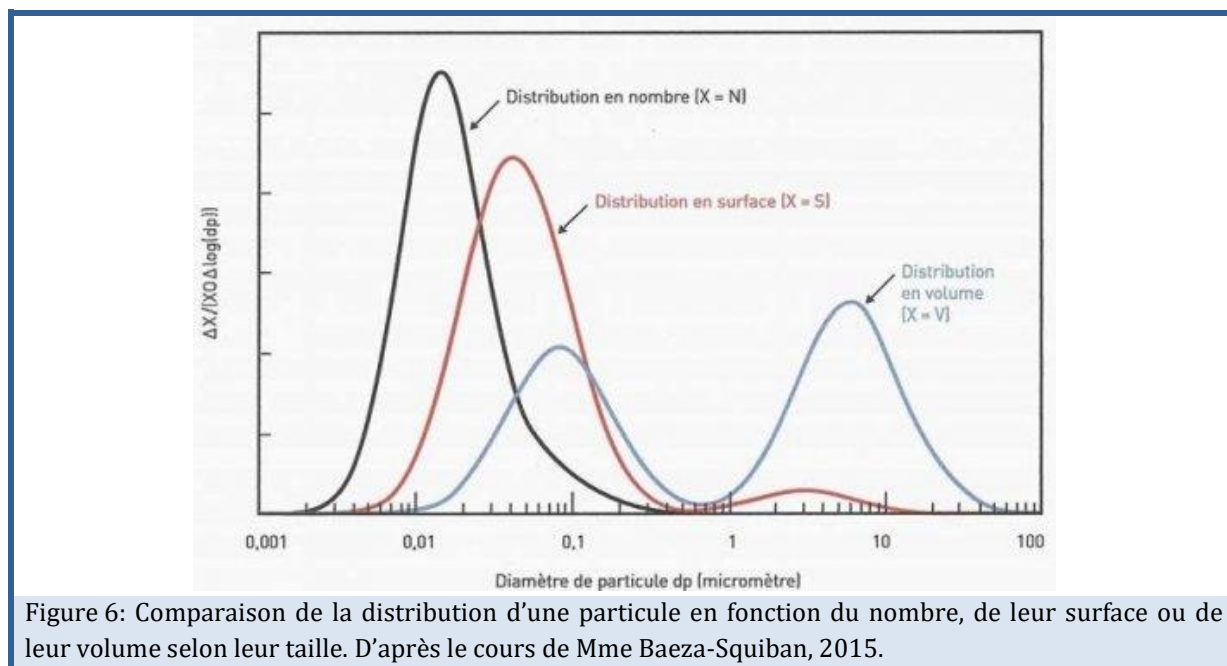


Figure 4: L'importance de la taille des particules pour obtenir une masse égale.

Particle Diameter Nm	Particle Number cm ⁻³	Particle Surface Area µm ² .cm ⁻³
5	153,000,000	12,000
20	2,400,000	3,016
250	1,200	240
5,000	0.15	12

Figure 5: Importance de la surface des particules. Nombre des particules et leur surface pour avoir 10 µg/m³ en fonction de leur diamètre (34).



Ces paramètres et les caractéristiques physico-chimiques peuvent varier en fonction de la source d'émission et des conditions météorologiques.

1.3 Réglementations et prélèvements

1.3.a La réglementation

Dans le monde

L'OMS a publié des lignes directrices sur la qualité de l'air en 1987, révisées en 1997 et finalement mises à jour en 2005. Elles ont été publiées afin d'informer les responsables politiques dans les différentes parties du monde et cibler une série d'actions à mener dans le cadre de la prévention de la pollution de l'air ambiant. L'OMS recommande des objectifs à atteindre concernant la qualité de l'air afin de réduire les risques sanitaires (35, 36).

Dans l'Union Européenne (UE)

La pollution de l'air est un enjeu majeur depuis les années 70. La politique de l'UE est de développer et de mettre en œuvre des dispositifs pertinents d'amélioration de la qualité de l'air, mais également de contrôler les émissions des sources mobiles. Les législations européennes concernent la qualité de l'air ambiant, la mesure et la gestion de la qualité de l'air, les sources d'émission stationnaires, etc. Dès 1980, une directive (80/779/CEE) établit des valeurs limites et les valeurs recommandées pour le dioxyde de soufre et les particules en suspension. Entre 1996 et 2000, plusieurs polluants sont déjà réglementés par les textes européens (PM₁₀, le benzène, le plomb, NO₂, SO₂, O₃, NO_x). Depuis 2004, la

stratégie de surveillance de la qualité de l'air de plusieurs polluants se base sur des directives du Parlement européen (2004/107/CE et 2008/50/CE). D'autres polluants sont ajoutés à la réglementation : l'arsenic, le cadmium, le nickel, les HAP et les PM_{2.5} (ces dernières ont été ajoutées en 2008) (fig. 7). Des objectifs pour la protection de la santé sont mis en place : valeurs limites d'exposition, seuils d'informations et de recommandation, afin d'éviter, de prévenir et de réduire les effets nocifs sur la santé humaine et sur l'environnement. La réglementation demande que certains polluants soient mesurés mais aucun seuil n'est imposé (PM_{2.5}, SO₄²⁻, NO₃⁻, Na⁺, K⁺, NH₄⁺, Cl⁻, Ca²⁺, Mg²⁺, carbone organique et carbone élémentaire) (37). Les valeurs limites proposées par l'Union Européenne sont dérivées des valeurs guides de la qualité de l'air ambiant de l'OMS (basées sur des études toxicologiques et épidémiologiques).

En France

Depuis la création de l'ADEME (Agence de l'environnement et de la maîtrise de l'énergie) au début des années 90, des lois et des directives ont été pensées et rédigées sur la pollution des sols et des eaux. L'état des connaissances scientifiques d'un grand nombre de polluants chimiques était suffisant pour alimenter les débats. Fin 1996, est édictée une des premières lois sur la pollution de l'air (LAURE n°96-1236) qui instaure le droit de chacun à respirer un air qui ne nuise pas à la santé. Cette loi sur l'air impose de mettre en place des procédures de surveillance de la qualité de l'air, des normes de qualité (objectifs à atteindre, des valeurs cibles, des valeurs limites) et l'information du grand public. Suite à ces réglementations, a suivi des prises de consciences politiques et écologiques qui ont amenées le gouvernement à voter pour le Grenelle 1 de l'Environnement en 2007 qui concerne l'environnement et le développement durable, ainsi que la restauration de la biodiversité à long terme. La réglementation se durcit petit à petit en 2010 suite à la loi Grenelle 2, qui propose des outils novateurs comme les zones d'actions prioritaires pour l'air (ZAPA) pour les collectivités afin de lutter contre les émissions du trafic routier et qui vise à baisser les émissions de PM_{2.5} dans les secteurs de l'industrie, des transports et lors de pics de pollution. Le « plan particule » consiste à appliquer des mesures pour réduire la pollution de fond par les particules, de manière continue dans différents secteurs d'activité (industrie, agricole, transport...). Un « plan d'urgence pour la qualité de l'air » en 2013 a été mis en place avec comme objectifs de réguler les flux de transports dans les zones très polluées, promouvoir les véhicules électriques (fiscalement), les transports en commun, l'extension des pistes cyclables, etc. Enfin, en 2016, une loi relative à la transition énergétique pour la croissance verte crée un second « Plan national de réduction des émissions de polluants atmosphériques » (qui décline la directive européenne 2016/2284 CE) (38).

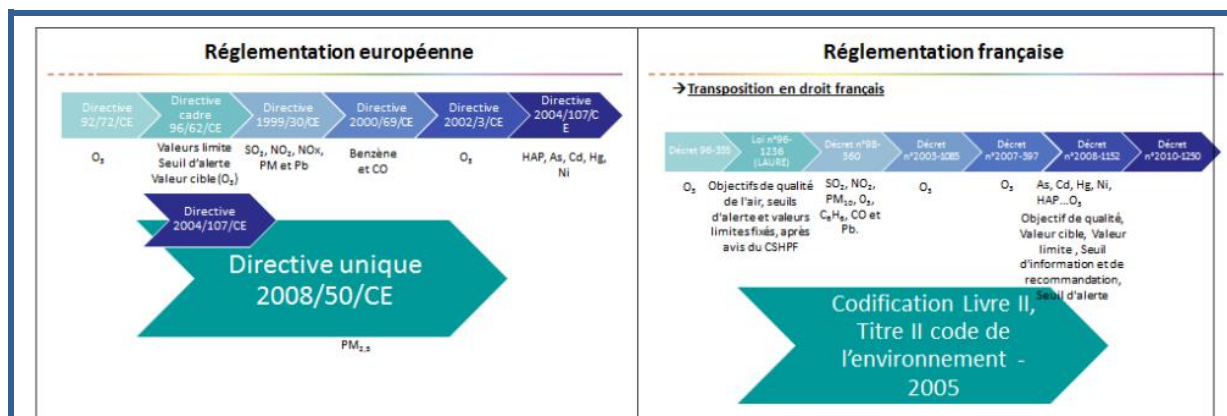


Figure 7 : Représentation schématique des principaux textes de la réglementation relatifs à la qualité de l'air en Europe et en France (39).

Aujourd'hui, lorsque les seuils sont dépassés, des mesures préfectorales d'urgence sont mises en place telles que des restrictions d'activités industrielles, des restrictions de circulation, accompagné de seuil d'information et d'alerte. De plus, suite à différentes études et dans l'attente d'une réglementation européenne, la municipalité de Paris a lancé un nouveau plan visant à réduire les émissions: développement d'alternatives (covoiturage et l'autopartage par exemple) mais également la mise en place du dispositif de vignettes "Crit'Air" pour lutter contre la pollution de l'air, elle permet d'identifier et classer les véhicules en fonction de leur niveau d'émissions polluantes (motorisation et âge du véhicule). Cela permettra de réduire la circulation des véhicules les plus polluants (les diesels plus particulièrement). Cette formule est déjà en vigueur dans environ 200 villes d'Europe.

En France, les concentrations moyennes en NO₂ et PM₁₀ sont en baisse d'environ 30% entre 2000 et 2015 ; mais leurs concentrations restent plus élevées à proximité des trafics routiers par rapport au fond urbain (2 fois plus pour le NO₂ et 1.2 fois plus pour les PM₁₀). Après avoir atteint un pic au début des années 90, l'émission des PM_{2,5} a diminué régulièrement de 4 % par an (fig. 8): la moyenne annuelle des émissions de particules fines en France était de 469 kilotonnes en 1991 et elle s'est réduite à 174 kilotonnes en 2015 d'après le Centre interprofessionnel technique d'études de la pollution atmosphérique (36). En Europe, les émissions de plusieurs polluants ont petit à petit diminué ces dernières décennies, entraînant des améliorations concernant la qualité de l'air. Cependant, les concentrations de polluants atmosphériques restent très élevées et les problématiques dues à la qualité de l'air persistent. Une proportion importante de la population en Europe, surtout dans les grandes agglomérations, vit toujours dans des zones où les standards fixés pour la qualité de l'air sont dépassés.

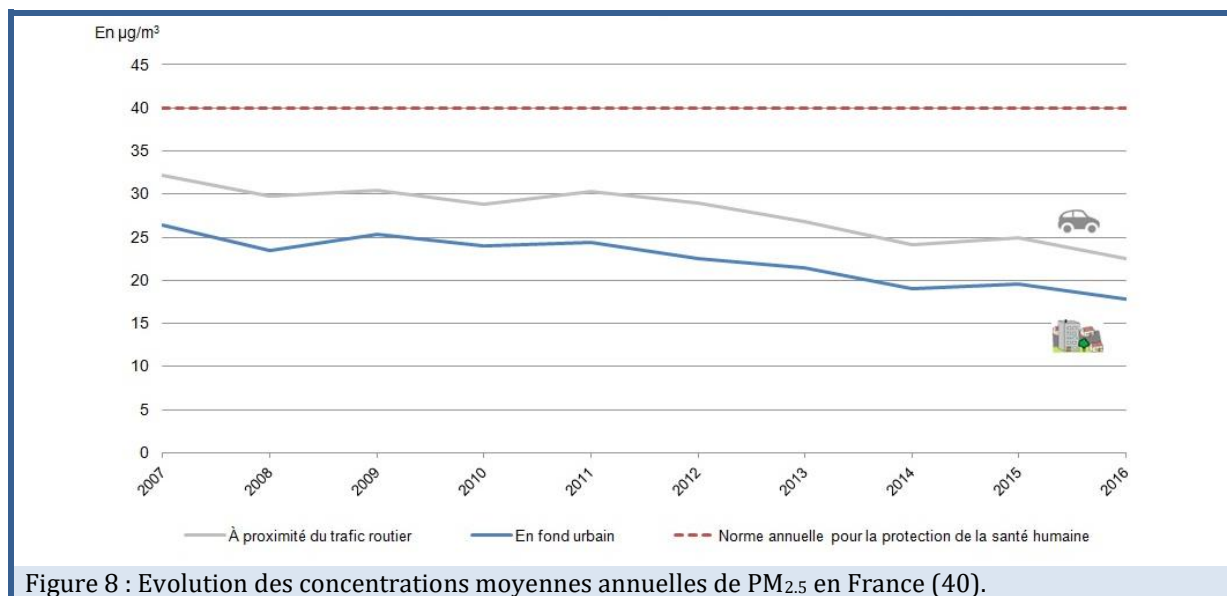


Figure 8 : Evolution des concentrations moyennes annuelles de PM_{2.5} en France (40).

Les PM₁₀

Pour les PM₁₀, l'objectif de qualité est de 30 µg/m³ en moyenne annuelle (41).

Les valeurs limites pour la protection de la santé humaine sont :

- 50 µg/m³ en moyenne journalière, à ne pas dépasser plus de 35 jours par an ;
- 40 µg/m³ en moyenne annuelle.

Les PM_{2.5}

Pour les PM_{2.5}, l'objectif de qualité est de 20 µg/m³ en moyenne annuelle (41). En France, le Grenelle de l'environnement souhaitait atteindre 15 µg/m³.

L'OMS qui a pour objectif d'établir des recommandations afin de protéger chaque population, recommande, une valeur de 10 µg/m³.

Les particules ultrafines et en particulier les NPs ne sont pas suivies ou très mal mesurées, mais elles pourraient avoir des impacts similaires voire plus graves. Des taux élevés sont retrouvés, par exemple, dans les tunnels routiers et les zones de grande circulation.

1.3.b Les prélèvements en France

Au niveau national, le LCSQA (laboratoire central de surveillance de la qualité de l'air) assure la coordination technique des dispositifs de surveillance de la qualité de l'air. La surveillance de la qualité de l'air extérieur et les prélèvements sont assurés par les AASQA (associations agréées de surveillance de la qualité de l'air) qui effectuent des mesures en continu des polluants atmosphériques dans les différentes régions de France. Les AASQA sont chargés de mesurer et d'étudier la qualité de l'air ambiant sur le territoire français et d'en informer le public. Elles mesurent, font l'inventaire,

modélisent, réalisent des études sur la qualité de l'air extérieur pour améliorer la qualité de l'air. Une association est présente au sein de chacune des régions administratives françaises et l'ensemble de ces organismes est regroupé au sein de la fédération ATMO France. Pour surveiller la qualité de l'air, les AASQA sont équipées de différents types de stations de mesure.

Il existe deux types de stations de mesure (fig. 9):

- Les stations de fond (urbaine, périurbaine, rurale) qui sont relativement éloignées des fortes sources de pollution. Elles permettent de mesurer la qualité de l'air global.
- Les stations de proximité (trafic, industrielle) sont des stations fixes ou mobiles, situées à proximité de la source émettrice qu'elle est censée mesurer (carrefour, périphérique, industrie...).

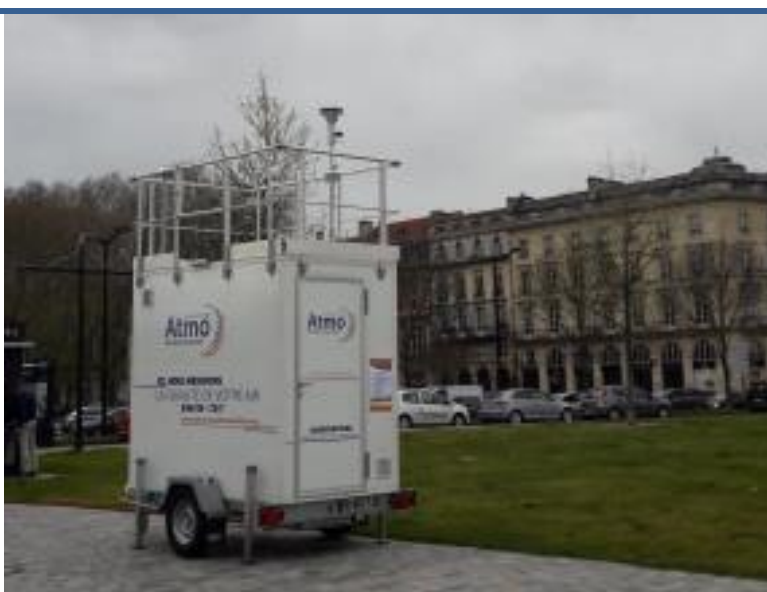


Figure 9 : Station de mesure de l'AASQA à Bordeaux, mars 2018.

L'évaluation de la pollution atmosphérique s'effectue par la mesure de certains polluants appelés « indicateurs de pollution » (NO₂, SO₂, PM₁₀, PM_{2.5} et l'O₃). Les polluants classiques sont mesurés par différentes méthodes d'analyse (tableau 2).

Polluants	Méthode d'analyse
SO ₂	Fluorescence UV
NO _x	Chimiluminescence
CO	Absorption IR
O ₃	Absorption UV
PM ₁₀ /PM _{2.5}	Microbalance (TEOM : <i>tapered element oscillating microbalance</i>)

Tableau 2 : Les différentes méthodes d'analyses en fonction des polluants

Pour le prélèvement des particules, certaines stations (fig. 10) utilisent la méthode classique des impacteurs en cascade pour collecter des échantillons : les TEOM. Ces derniers sont équipés de tête de prélèvements qui permettent de recueillir les particules PM₁₀ et PM_{2.5}. L'appareil dispose d'une pompe, qui aspire l'air, cet air atmosphérique passe par un impacteur où les particules sont récupérées sur un support. Les caractérisations physico-chimiques des particules sont ensuite déterminées par spectrométrie de masse à particule (single particle mass spectrometer) et par microscopie électronique.



Les particules sont réglementées en fonction de leurs concentrations massiques ($\mu\text{g}/\text{m}^3$). Cependant, les caractéristiques comme la concentration en nombre, la distribution granulométrique et la composition chimique permettraient d'avoir des informations plus précises sur ces particules.

La réglementation actuelle ne prend en compte que la masse des PM. Etant donné la forte implication des caractéristiques physico-chimiques dans les effets toxiques observés, il serait pertinent d'envisager de les prendre en compte dans la réglementation.

La pollution atmosphérique entraîne 7 millions de décès par an dans le monde. La principale voie d'exposition aux particules atmosphériques est l'appareil respiratoire. Des études ont montré que, après inhalation, les particules fines, et ultrafines ainsi que les nanoparticules pénètrent profondément dans les voies respiratoires jusqu'aux alvéoles pulmonaires.

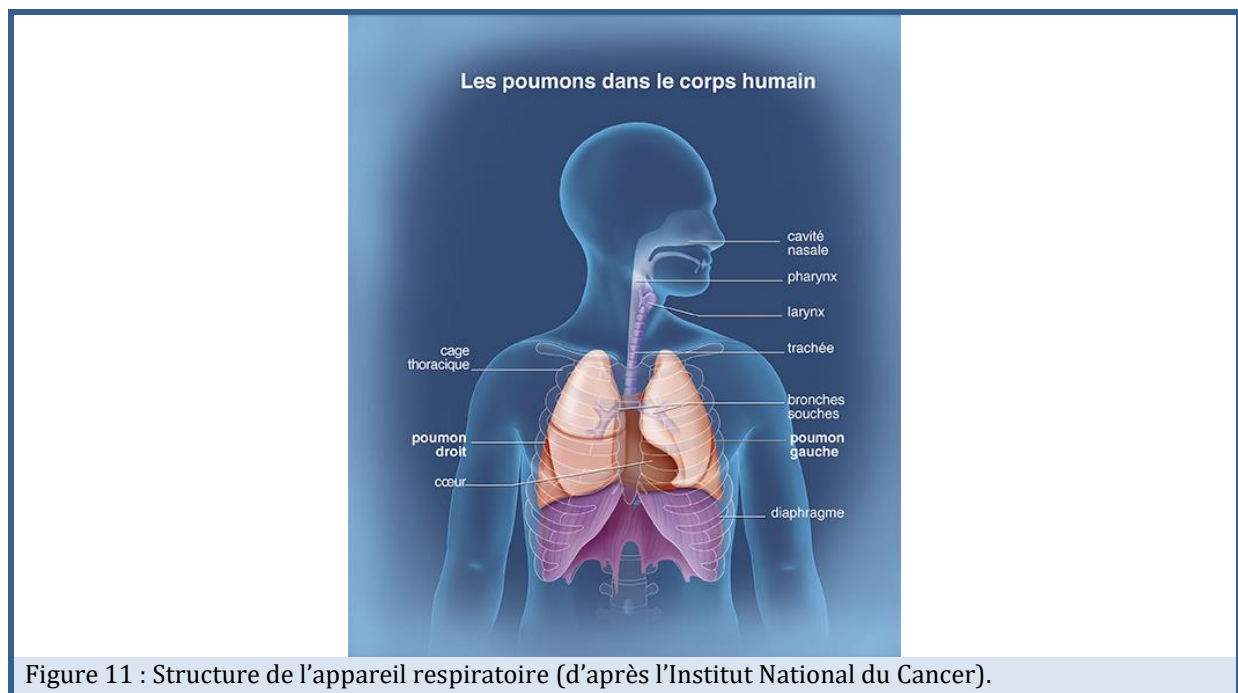
Le chapitre suivant a pour objectif de décrire les mécanismes de dépôt des particules dans l'appareil respiratoire, ainsi que leur translocation dans la circulation systémique et pulmonaire ce qui pourrait entraîner des effets délétères au niveau d'organes cibles tels que le système cardio-vasculaire.

2. L'appareil respiratoire : voie d'entrée des particules atmosphériques

2.1 L'appareil respiratoire

Les poumons constituent les organes fondamentaux de la respiration. Ils permettent de fournir de l'oxygène à l'ensemble de l'organisme et d'éliminer le gaz carbonique contenu dans le sang. Les poumons sont à l'interface entre l'organisme et l'extérieur, sont donc exposés à diverses agressions (polluants) et sont soumis à de nombreuses forces mécaniques nécessaires au mécanisme de la respiration. Pendant l'inspiration les poumons augmentent de volume et un air, riche en oxygène (O_2) et pauvre en dioxyde de carbone (CO_2), transite chaque jour dans les poumons. Les poumons mobilisent 6 litres d'air par minute (L/min) en moyenne au repos et jusqu'à 200 L/min en cas d'exercice intense. Chaque jour 15 000 litres d'air transitent dans les poumons et un nombre non négligeable de composants (microorganismes, particules, gaz...) qui se trouvent dans l'air peut donc transiter dans les poumons.

Les poumons sont situés à l'intérieur de la cage thoracique et reposent sur le diaphragme (fig. 11). Ils sont entourés d'une plèvre, fine membrane, qui les protège. Chez l'être humain, le poumon droit est constitué de 3 lobes et le poumon gauche de 2 lobes. L'appareil respiratoire est constitué de voies aériennes supérieures (nez, fosse nasale, bouche, pharynx, larynx) et de voies aériennes inférieures (trachée, bronches, bronchioles). L'air transite donc à travers ces différentes voies de conduction jusqu'aux alvéoles pulmonaires (42).



Bien que complexes, les voies aériennes supérieures ne sont pas le siège des échanges gazeux. Elles ont pour rôle de réchauffer, hydrater et débarrasser l'air des contaminants tels que les particules en suspension, par l'intermédiaire de l'épithélium mucociliaire. Les échanges gazeux sont ensuite effectués au niveau des voies aériennes inférieures, dont les principaux acteurs sont les alvéoles pulmonaires.

2.1.a La muqueuse respiratoire

L'épithélium mucociliaire constitutif de la muqueuse respiratoire est pseudo-stratifié. Il repose sur une lame basale associée à du tissu conjonctif (chorion) et une sous muqueuse constituée de muscle lisse. Le chorion est conjonctivo-élastique, très vascularisé dans la trachée, très riche en fibres et lames élastiques dans les bronches. L'épithélium des bronches est composé de cellules caliciformes, qui produisent du mucus et de cellules ciliées qui permettent le mouvement unidirectionnel du mucus des bronches distales aux bronches proximales. Les glandes sous muqueuses, présentes sous l'épithélium, possèdent aussi la capacité à produire du mucus. Plus on descend vers les voies respiratoires inférieures (bronchioles), plus la structure de l'épithélium s'amincit. Au niveau des alvéoles, l'épithélium est très fin et ne présente plus de cellules ciliées, ni de cellules à mucus.

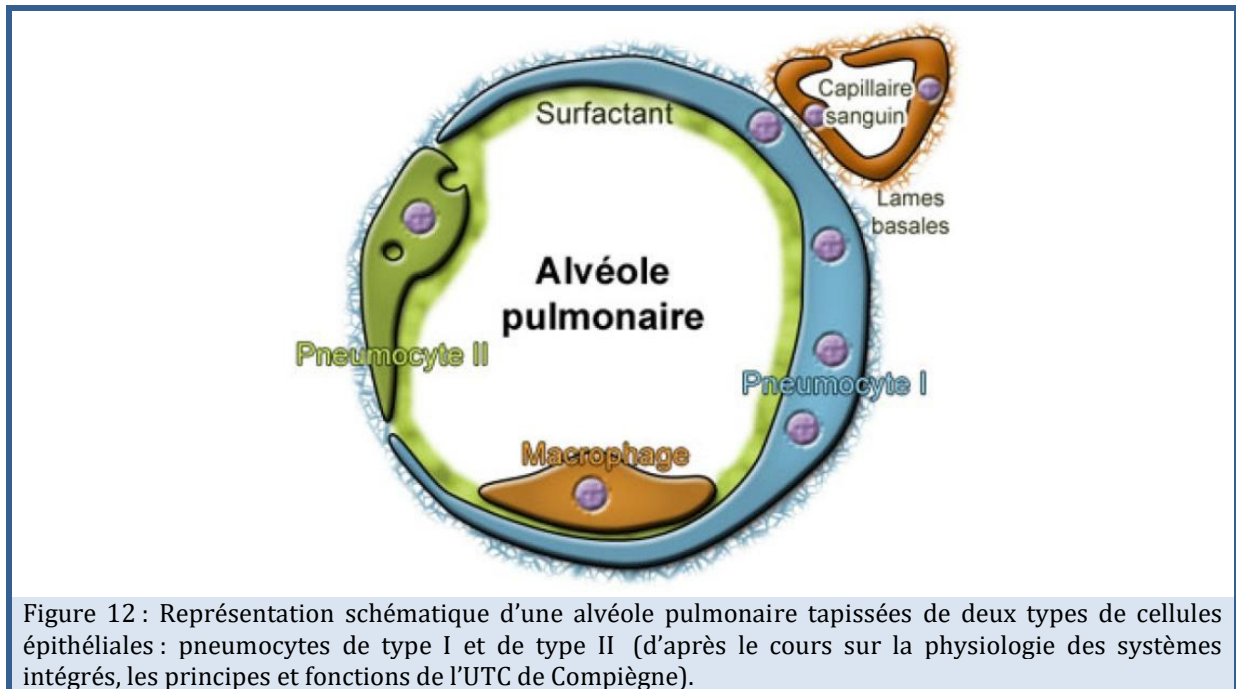
2.1.b Les alvéoles pulmonaires

Les alvéoles sont constitués de sacs alvéolaires où se produisent les échanges gazeux. Les alvéoles sont constituées majoritairement de fibroblastes et de la matrice extracellulaire (MEC) synthétisée par ces cellules. Les alvéoles sont également tapissées de deux types de cellules épithéliales, nécessaires au bon fonctionnement des échanges gazeux (fig. 12).

- Les pneumocytes de type I (ou cellules alvéolaires I), incluant plus de 90% des cellules épithéliales alvéolaires, sont des cellules permettant les échanges gazeux avec le système capillaire : ils forment avec les cellules endothéliales des capillaires sanguins la barrière alvéolo-capillaire. Les pneumocytes de type I sont très minces, permettant à cette barrière de ne pas dépasser les 2 μm d'épaisseur et ainsi de minimiser la résistance de diffusion et donc de maximiser les échanges gazeux entre l'air alvéolaire et le sang, permettant, d'une part, d'apporter le sang riche en oxygène aux organes et, d'autre part, d'épurer le CO_2 .

- Un autre type de cellules épithéliales tapissant les alvéoles sont les pneumocytes de types II (ou cellules alvéolaires II), cellules non impliquées dans la diffusion gazeuse. En effet, en plus d'être des cellules progénitrices des pneumocytes de type I, ces cellules ont pour rôle de produire le surfactant, un agent tensio-actif composé de phospholipides ayant comme propriété de diminuer les tensions de surface au niveau alvéolaire: la pression intra-alvéolaire varie en fonction du mouvement du flux d'air lors de la respiration.

Il existe un autre type cellulaire: les macrophages qui peuvent participer à l'épuration des contaminants de l'air.



2.1.c Epuration des voies aériennes

L'appareil respiratoire a la capacité d'épurer l'air des poussières fines et d'autres contaminants toxiques. De nombreux mécanismes de défense empêchent la pénétration de contaminants dans les poumons. Il existe deux principaux mécanismes de clearance au niveau pulmonaire: la clearance mucociliaire et la clearance alvéolaire.

La clearance mucociliaire

La clearance mucociliaire est un mécanisme de défense qui permet une épuration rapide (moins de 36 heures) des contaminants de l'air. Le mécanisme principal est le mouvement des cils des cellules ciliées qui va se faire de façon unidirectionnelle en favorisant ainsi l'élimination des polluants vers le pharynx (43). Le film humide de la muqueuse nasale facilite leur élimination par leurs cils vibratiles. C'est le battement régulier et coordonné des cils vibratiles qui transportent le tapis muqueux vers les voies aériennes supérieures. La composition du mucus contribue à l'efficacité de l'épuration : environ 1 % de sels et composés dialysables, 1 % de protéines, 1 % de glycoprotéines et plus de 95 % d'eau. Le mucus, qui joue le rôle de gel viscoélastique, piège les contaminants de l'air en remontant vers les voies aériennes supérieures où il va être expectoré ou avalé. La clearance mucociliaire est un mécanisme de défense inné des voies aériennes qui associe différents événements: transport épithélial d'eau et d'ions, sécrétion de mucines, mouvement ciliaire et toux. Un dysfonctionnement de la clearance mucociliaire peut entraîner une obstruction des voies aériennes. La clearance mucociliaire peut-être également altérée par différents facteurs naturels (âge, exercice

physique) ou environnementaux (polluants gazeux ou particulaires, fumée de tabac...) (44-46).

La clearance alvéolaire

Les macrophages alvéolaires sont l'un des acteurs principaux de ce mécanisme. Leur rôle est de phagocyter de manière non spécifique les contaminants de l'air. Il s'agit d'un mécanisme d'épuration lent pouvant aller jusqu'à plusieurs mois. Il existe 2 populations de macrophages alvéolaires : ceux qui y résident et ceux qui y sont recrutés, notamment lors de processus inflammatoire (47).

2.2 Le dépôt des particules dans l'appareil respiratoire

Après exposition, les particules atmosphériques pénètrent dans les voies respiratoires et sont transportées plus ou moins profondément dans les poumons. Le dépôt des particules dépend de leur masse, de leur taille et de leur forme (48-50). Il existe plusieurs mécanismes de dépôt en fonction du diamètre aérodynamique de la particule (51).

2.2.a Les mécanismes de dépôt

Interception: Ce mécanisme concerne les voies aériennes supérieures et des particules de diamètre assez important. Une particule se dépose ou est interceptée après impact avec la surface des voies aériennes.

Impaction inertielle: Ce mécanisme se produit principalement au niveau des voies aériennes supérieures. Les particules en suspension dans l'air suivent préférentiellement une trajectoire initiale. Cependant, de nombreuses particules, en fonction de leur masse et de la vitesse de l'air, peuvent, au lieu de suivre l'écoulement de l'air, dévier de leur trajectoire initiale et impacter ou adhérer sur la surface placée sur leur trajectoire (52).

Sédimentation: Ce mécanisme est retrouvé au niveau des voies aériennes inférieures (au niveau des bronches et bronchioles) et concerne essentiellement les particules avec un diamètre aérodynamique moyen $> 0.5 \mu\text{m}$. La vitesse des particules diminue petit à petit tout au long de l'appareil respiratoire, en revanche le débit d'air reste constant. L'attraction gravitationnelle et la résistance de l'air peuvent modifier la flottabilité (tendance à rester dans l'air) des particules dans l'air jusqu'à entraîner leur dépôt.

Diffusion brownienne: Ce mécanisme qui prédomine au niveau des bronchioles et au niveau des alvéoles, est un mouvement aléatoire des particules (mouvement « brownien ») semblable à celui des molécules de gaz dans l'air. Il concerne essentiellement les particules ayant un diamètre aérodynamique moyen $< 0.5 \mu\text{m}$ (53).

Les PM possédant un diamètre aérodynamique moyen $< 10 \mu\text{m}$ peuvent pénétrer et se déposer dans les voies respiratoires inférieures. Leur dépôt va dépendre de nombreux paramètres : la structure des voies respiratoires, l'état physiologique du patient (âge, pathologies...), les conditions météorologiques (humidité, température) et les propriétés physico-chimiques des particules inhalées (54). Certaines pathologies respiratoires altèrent la structure des voies respiratoires ou la composition du mucus et peuvent augmenter le dépôt des particules (55).

Il existe de nombreuses études de modélisations mathématiques permettant de prédire le dépôt des PM dans les différentes structures de l'appareil respiratoire (régions naso-pharyngée, trachéo-bronchique, alvéolaire) (56). D'après Oberdörster et coll., 2005 (57), les particules possédant avec un diamètre compris entre 1 nm et $0.1 \mu\text{m}$ se déposent dans tout l'appareil respiratoire mais préférentiellement dans les régions trachéo-bronchiques et alvéolaires. Les particules possédant un diamètre compris entre 0.1 et $1 \mu\text{m}$ se déposent essentiellement au niveau naso-pharyngé, ainsi que les particules plus grosses ($> 1 \mu\text{m}$) (fig. 13). Cette différence de dépôt lié à la taille serait due au fait que les particules ultrafines ont un mouvement brownien et vont se déposer par diffusion (58). La taille et la réactivité de surface des particules vont donc jouer un rôle sur la pénétration des particules dans l'organisme (59, 60).

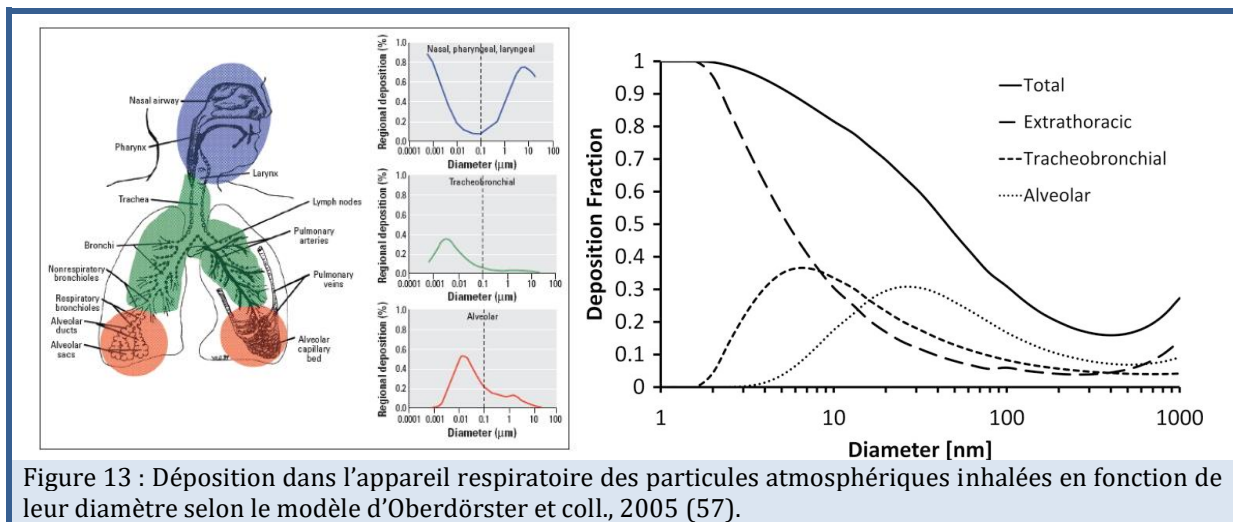
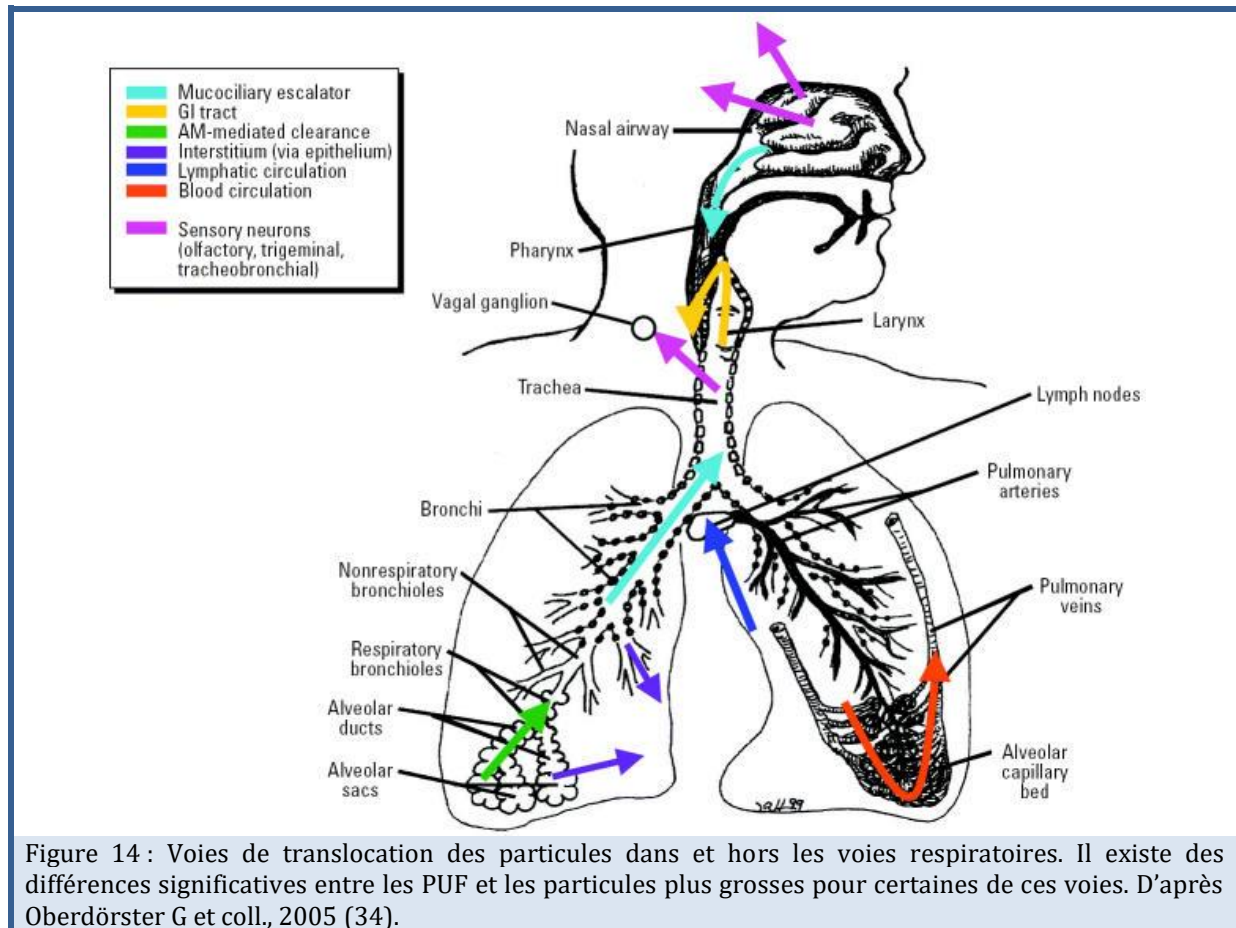


Figure 13 : Déposition dans l'appareil respiratoire des particules atmosphériques inhalées en fonction de leur diamètre selon le modèle d'Oberdörster et coll., 2005 (57).

2.2.b La clearance des particules

Il existe deux types d'épuration des particules: la translocation physique (déplacement des poumons vers d'autres tissus ou organes) de particules insolubles et les mécanismes chimiques dans le cas des particules solubles (dans les liquides biologiques). Pour les particules insolubles, en fonction de leur localisation pulmonaire, les mécanismes diffèrent. Au niveau des voies aériennes supérieures elles peuvent subir une translocation vers les neurones sensoriels, vers l'interstitium pulmonaire, jusqu'à la circulation lymphatique (61). Dans les voies inférieures, au niveau des alvéoles, elles

peuvent subir une translocation vers les capillaires sanguins (fig. 14) (59). Au niveau des bronches et des bronchioles, le mouvement des cils unidirectionnel vers les voies aériennes supérieures peut entraîner les particules vers le larynx où elles sont expectorées ou avalées. Au niveau alvéolaire, les macrophages peuvent phagocyter les particules et les entraîner ainsi vers les voies aériennes supérieures (45).



La clairance des particules pourrait être altérée et potentiellement entraîner, d'une part, une translocation accrue vers l'interstitium pulmonaire associée à une fibrose ou, d'autre part, entraîner une accumulation pulmonaire de particules à l'origine d'effets délétères (62, 63). La translocation des particules vers les tissus pourrait s'expliquer par une transcytose des particules à travers les cellules ou par la perturbation des jonctions entre les cellules (fig. 15) (64).

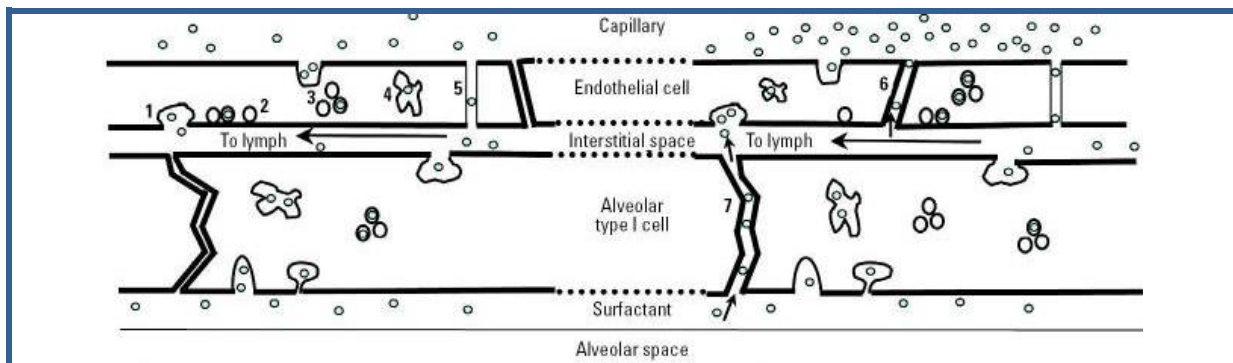


Figure 15 : Translocation des particules à travers les jonctions cellulaires. Dans les cellules, différentes formes de cavéoles et de jonctions serrées fonctionnent comme des mécanismes de translocation à travers les couches de cellules (1 à 5 correspondent à des cavéoles, 6 correspond à une jonction serrée de CE, 7 correspond à une jonction serrée de cellule alvéolaire, \circ correspond à des nanoparticules). D'après Oberdörster G et coll., 2005 (34).

Des études d'expositions contrôlées ont été réalisées chez l'être humain (études cliniques et études de dosimétrie). Les études sur l'être humain ont été réalisées avec des particules marquées par des atomes radioactifs (65) et par l'utilisation de particules d'oxyde de fer (66). Certaines études ont également été réalisées sur des animaux de type rongeurs (67-69). Les résultats montrent que les particules inhalées peuvent se retrouver dans différentes régions de l'appareil respiratoire, mais également, au niveau de la circulation sanguine et lymphatique, ainsi qu'au niveau de différents tissus et organes. D'autres études ont montré, au niveau pulmonaire, des dépôts des particules inhalées chez des personnes saines et atteintes de pathologies respiratoires (asthme, BPCO) (70, 71).

Churg et coll., 2000 (72), ont comparé des coupes de parenchyme pulmonaire de personnes vivant à Mexico, ville très polluée en particules (environ $66 \mu\text{g}/\text{m}^3$ de PM_{10}) et de personnes vivant à Vancouver, ville peu polluée ($14 \mu\text{g}/\text{m}^3$). Une accumulation de PUF carbonées a été observée sous l'épithélium bronchique des personnes vivant à Mexico par rapport à celles vivant à Vancouver. Ces résultats suggèrent qu'une exposition à long terme à une forte concentration en PM induit une accumulation importante de PM dans l'appareil respiratoire (sous l'épithélium pulmonaire) qui pourrait expliquer l'apparition ou l'aggravation de pathologies respiratoires ou cardiovasculaires.

Ces résultats laissent, également, suggérer que les PM pourraient être distribuées dans l'organisme via la circulation sanguine. La circulation pulmonaire pourrait donc être une des premières cibles des particules inhalées, après le dépôt dans les poumons. La translocation des particules vers la circulation pulmonaire se ferait via la barrière capillo-alvéolaire.

2.3 Passage de la barrière capillo-alvéolaire

La paroi entre les alvéoles et les capillaires est appelée barrière capillo-alvéolaire (fig. 16), avec plus de 450 millions d'alvéoles chez l'Homme (130 m²), chacune entourée par un réseau dense de vaisseaux sanguins : les capillaires. Les capillaires sont des vaisseaux sanguins très fins qui tapissent la paroi des alvéoles. La surface d'échange au niveau alvéolaire est très importante (équivalent à la taille d'un terrain de tennis) ce qui augmente la quantité d'O₂ entrant dans le sang. Le sang quitte les poumons par les veines pulmonaires pour irriguer les différents tissus et organes de l'organisme.

La barrière capillo-alvéolaire est extrêmement fine (5 à 15 µm) et perméable à l'O₂ et au CO₂. L'O₂ se fixe aux globules rouges dans le sang. Les capillaires sanguins ont de fines parois qui contiennent principalement des cellules endothéliales et peu de cellules musculaires lisses et opposent une faible résistance au flux sanguin.

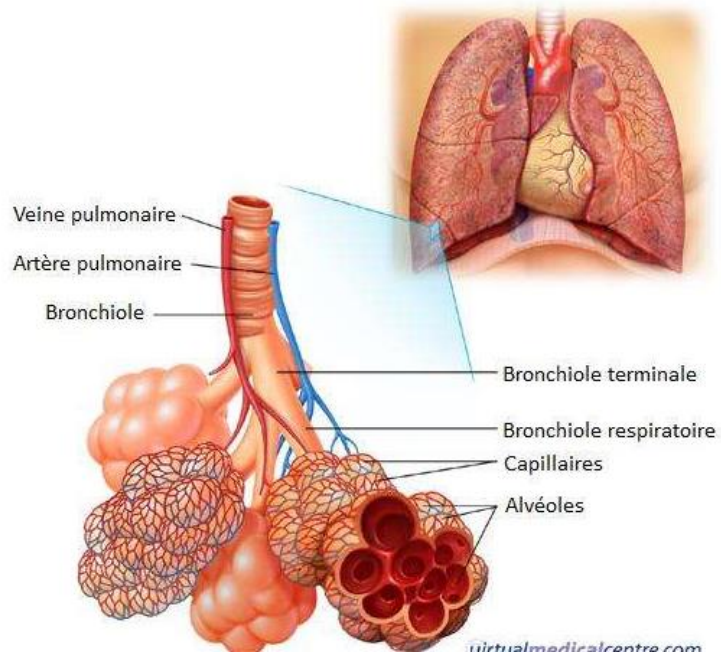
Les PM₁₀ une fois inhalées, vont plutôt rester bloquées au niveau de la fosse nasale. Les plus grosses particules, d'une taille supérieure à 10 µm, se collent sur les muqueuses au niveau du nez et du pharynx où peut survenir des irritations locales et des brûlures.

Les PM_{2.5} peuvent avoir des constituants solubles sur le noyau carboné, qui peuvent se désorber, subir un métabolisme et déclencher des réactions inflammatoires locales (73). L'inflammation des voies aériennes peut causer des symptômes comme la toux, des expectorations, un essoufflement, puis des maladies chroniques comme un asthme, une BPCO, notamment.

Les NPs peuvent traverser la barrière capillo-alvéolaire et se retrouvent dans la circulation sanguine, d'où elles peuvent atteindre différents tissus et organes.

En effet, de nombreuses études *in vivo*, ont montré un passage rapide des particules ultrafines et fines, ainsi que leurs constituants solubles dans la circulation systémique (59, 60, 74) ce qui pourrait entraîner des effets délétères au niveau d'organes cibles tels que le système cardio-vasculaire. La circulation pulmonaire est donc une des premières cibles des particules inhalées et particulièrement les cellules endothéliales à l'interface du sang et des tissus.

Le chapitre suivant décrit le système cardiovasculaire, la circulation pulmonaire, ainsi que l'hypertension pulmonaire, principale pathologie de la circulation pulmonaire.



Function of the Alveolus in the Lungs

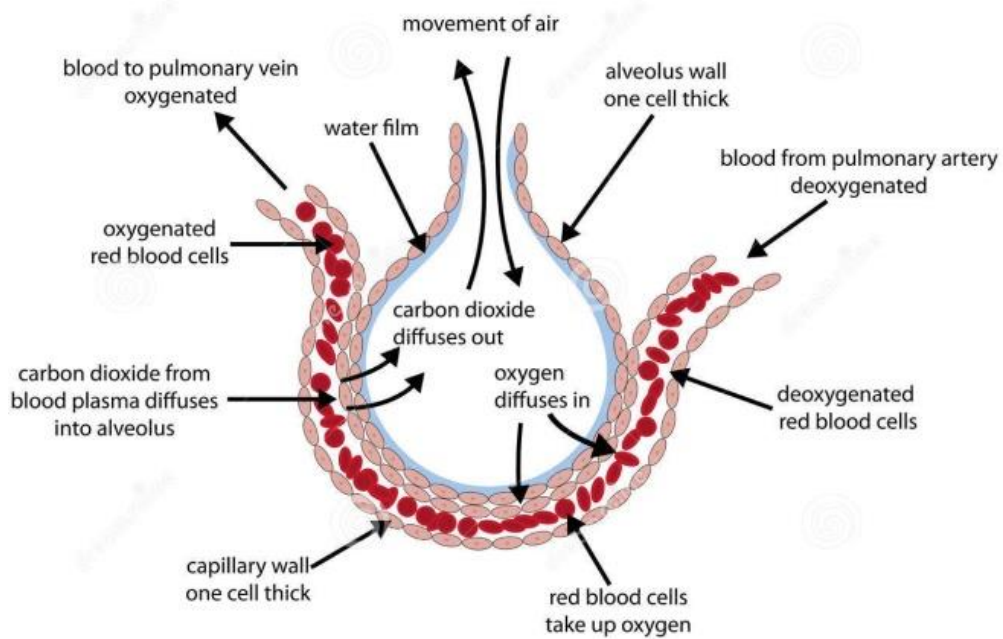


Figure 16 : Schéma de la barrière capillo-alvéolaire, les sacs alvéolaires sont entourés de capillaires sanguins. D'après Virtual Medical Centre©.

3. Le système cardio-vasculaire

Le rôle central du système cardiovasculaire est le transport des éléments nutritifs indispensables à la vie, des biomolécules et, surtout, le transport des gaz vers et depuis tous les organes, tissus et cellules (75). De plus, le système cardiovasculaire est un important régulateur de la défense de l'hôte par le système immunitaire (76) et de l'hémostase sanguine (77). On distingue deux circulations: la circulation systémique (également appelée grande circulation) qui permet d'acheminer le sang riche en oxygène (O_2) vers tous les organes et la circulation pulmonaire (encore appelée petite circulation) qui permet d'apporter le sang pauvre en O_2 vers les poumons. La circulation générale, qui comprend la circulation systémique et la circulation pulmonaire, est assurée par l'appareil cardio-vasculaire (fig. 17).

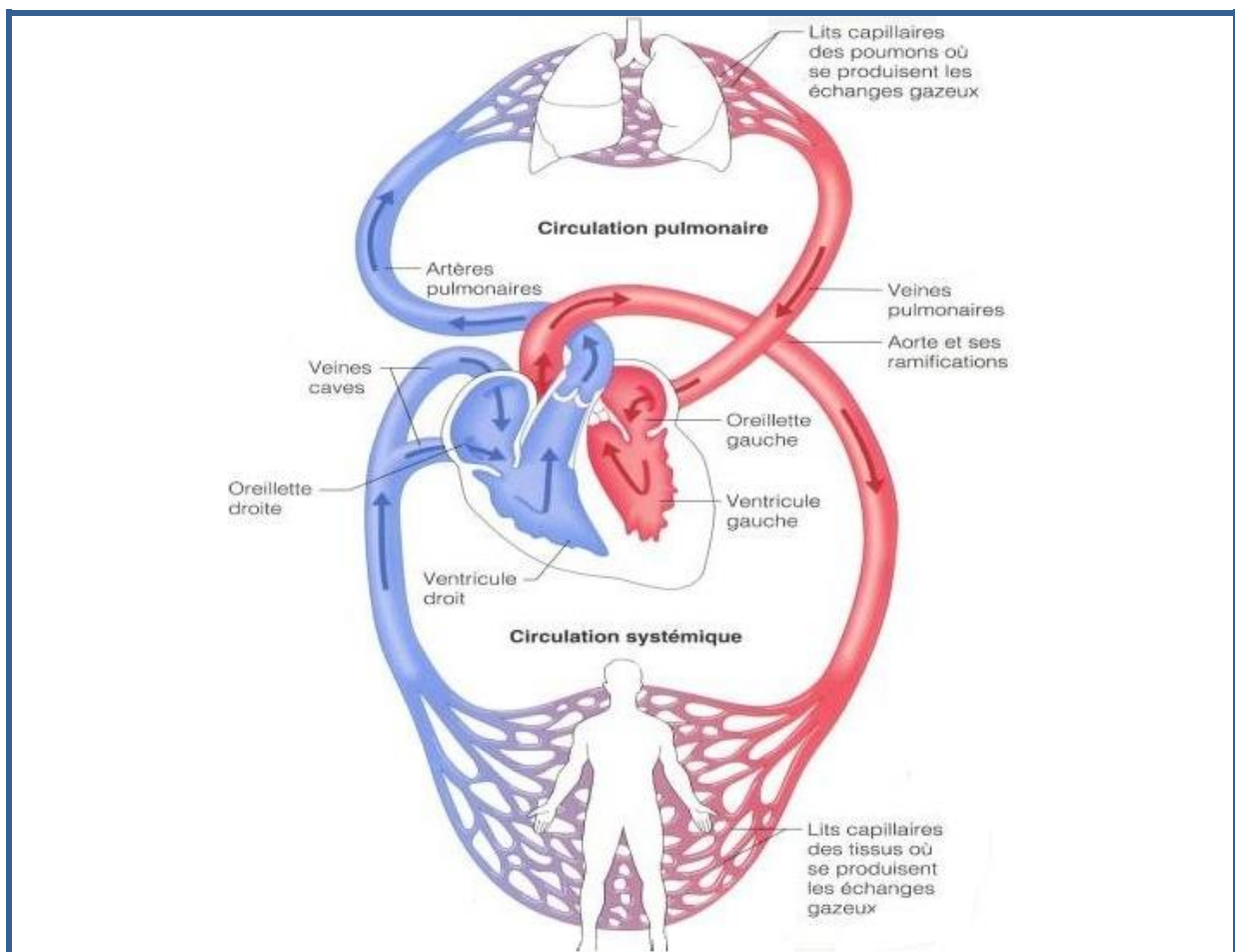


Figure 17 : La circulation sanguine.

Le cœur droit comprend l'oreillette droite, placée au-dessus du ventricule droit. Le cœur droit assure la récupération du sang veineux, de retour des tissus et organes qu'il a nourris. De l'oreillette droite, le sang pauvre en O_2 et riche en CO_2 (en bleu) est propulsé dans l'artère pulmonaire, vers les poumons où il se réoxygène et élimine le CO_2 . Le sang, revenu des poumons où il s'est oxygéné (en rouge), se déverse dans l'oreillette gauche via les veines pulmonaires. Le cœur gauche, constitué par l'oreillette gauche qui surmonte le ventricule gauche, propulse le sang dans tout l'organisme grâce à l'aorte (78).

Le cœur, par ses contractions, propulse le sang à l'intérieur des artères. L'artère principale est l'aorte (2.5 cm de diamètre), puis les différentes artères efférentes, se ramifient et diminuent de diamètre au fur et à mesure qu'elles s'éloignent du cœur, les plus petites artères sont appelées artérioles (2 mm de diamètre). Le sang est alors conduit jusqu'aux différents organes, où les capillaires assurent les échanges gazeux et nutritifs.

Le cœur est un muscle (myocarde) composé de cellules spécifiques (les cardiomyocytes) qui consomme, à lui seul, 10 % de tout l'oxygène fourni à l'organisme et ne pèse qu'environ 300 grammes chez un adulte. Le sang circule à l'intérieur d'un réseau de vaisseaux constitué de 100 000 kilomètres, aux diamètres parfaitement adaptés à leurs fonctions. La fréquence cardiaque au repos est en moyenne de 60 à 80 battements par minute.

3.1 La circulation pulmonaire

3.1.a Rôle et organisation

Le rôle principal de cette petite circulation se joue au niveau des poumons: elle permet de ré-oxygéner le sang dans les capillaires pulmonaires et d'éliminer le CO₂. Le système vasculaire est divisé en 3 compartiments anatomiques : l'arbre artériel, l'arbre veineux et un vaste réseau de capillaires. Le tronc de l'artère pulmonaire se divise au niveau du poumon en, au moins, 17 embranchements chez l'Homme jusqu'aux artérioles et aux capillaires (79) (fig. 18).

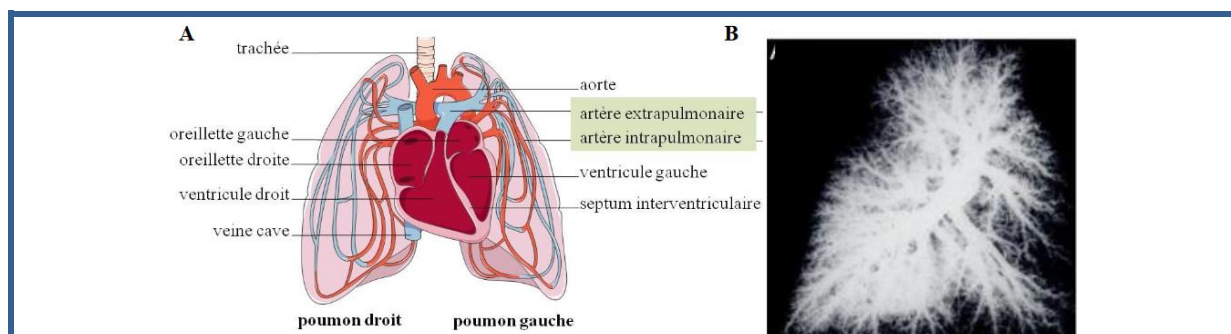


Figure 18 : La circulation pulmonaire.

(A) Schéma du bloc cœur/poumon. Le sang passe par les artères extrapulmonaires puis intrapulmonaires au niveau de l'entrée dans les différents lobes pulmonaires. Les artères intrapulmonaires se ramifient en artères de plus en plus petites (artérioles) jusqu'à devenir des capillaires au niveau des alvéoles où se font les échanges gazeux (80). (B) Artériogramme de contraste de l'artère pulmonaire des poumons chez l'homme adulte (81).

La circulation pulmonaire est un système à faible pression et haut débit. Les pressions artérielles systoliques et diastoliques sont de 22 et 10 mmHg respectivement au repos. La pression artérielle pulmonaire moyenne (PAPm) est de 15 mmHg au repos (82). A

titre de comparaison, la pression systémique est beaucoup plus élevée, avec un PA systolique entre 80 et 120 mmHg au repos.

Remarques : la circulation pulmonaire est particulièrement sensible à l'hypoxie ; elle va y répondre par une vasoconstriction pulmonaire (réponse adaptative) permettant de maintenir constant le rapport ventilation/perfusion afin de réguler l'hématose du sang. Cela permet d'éviter une hypoxémie qui serait dangereuse pour l'organisme. Cette capacité de vasoconstriction en réponse à l'hypoxie est propre aux vaisseaux de la circulation pulmonaire, puisque l'hypoxie induit une vasodilatation au niveau des vaisseaux de la circulation systémique.

3.1.b Structure de la paroi artérielle pulmonaire

La paroi artérielle est composée de trois couches distinctes concentriques: la couche interne du vaisseau (ou l'intima) en contact direct avec le sang, la couche intermédiaire (ou la tunica media) et l'adventice, couche externe de l'artère (83). L'endothélium est séparé de la média par une limitante élastique interne principalement composée de fibres de collagène et d'élastine et la limitante élastique externe qui sépare la média et l'adventice (fig. 19).

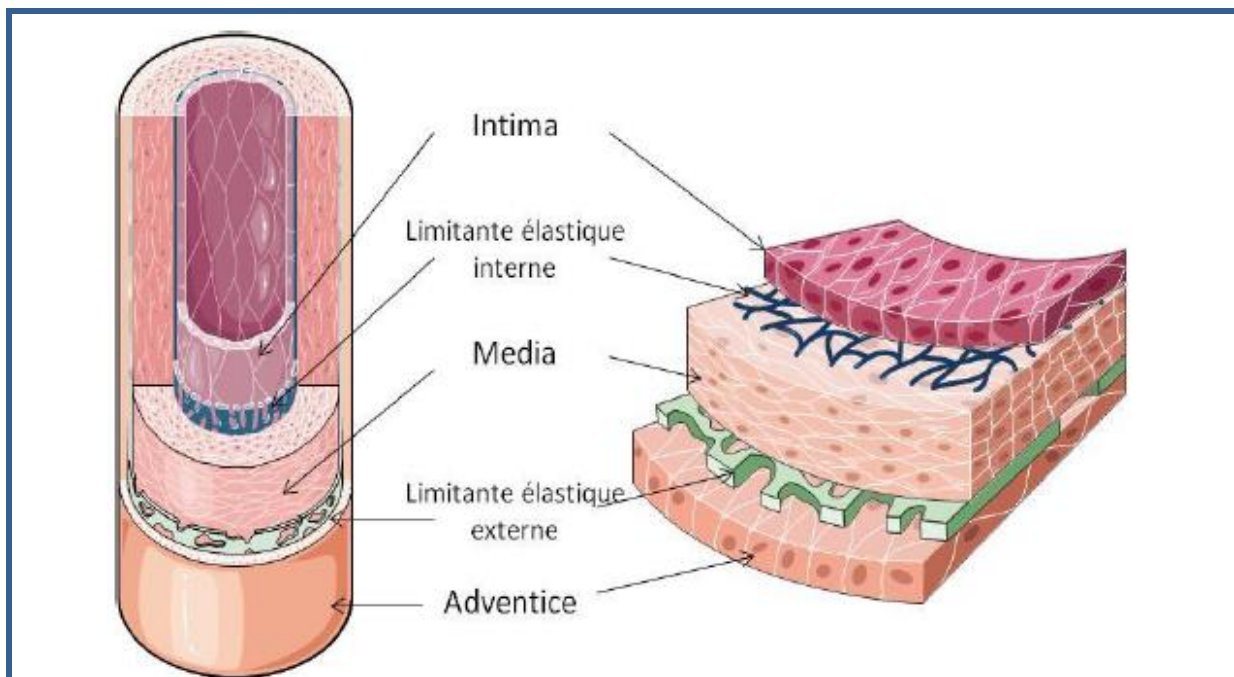


Figure 19: Schéma de la paroi artérielle pulmonaire.

Représentation schématique des différentes couches de la paroi artérielle pulmonaire : de la lumière vasculaire à la périphérie on distingue trois tuniques concentriques dans l'artère : l'intima, la média et l'adventice (84).

L'intima est composée d'une fine couche de tissu conjonctif, appelée la membrane basale, sur laquelle repose un endothélium, composé d'une monocouche jointive de cellules endothéliales (CE) qui borde la lumière du vaisseau. Le contact direct des CE

avec le flux sanguin signifie qu'elles sont particulièrement vulnérables et sensibles aux molécules physiologiques présentes dans le sang (hormones, facteurs de croissance, neuromédiateurs, ainsi qu'aux xénobiotiques...) et aux forces mécaniques (85).

La *média* est la tunique centrale de la paroi des vaisseaux sanguins, elle est dotée d'une élasticité naturelle grâce à ses différentes couches de cellules musculaires lisses (CML) séparées par des fibres de collagène et d'élastine. C'est la plus épaisse des trois couches du vaisseau. Les CML sont des cellules fusiformes disposées de façon hélicoïdale perpendiculairement à l'intima et possèdent une activité contractile. Les composants de la matrice extracellulaire (MEC) permettent d'assurer à la fois une élasticité et une rigidité du vaisseau afin d'éviter une déformation suite à des changements de pression. Les CML sont sensibles à l'action des médiateurs sécrétés par les CE, et vont en conséquence se contracter ou se relâcher afin de réguler le flux sanguin et la pression sanguine (86, 87). Les artérioles et les capillaires sont dépourvus de CML (88).

L'*adventice* est la couche la plus externe des vaisseaux ayant un rôle de soutien et de protection. C'est la couche la plus hétérogène, elle est composée de MEC, de fibroblastes, de cellules immunitaires (mastocytes) et interstitielles. On y trouve également de petits vaisseaux capillaires ayant pour rôle de vasculariser la paroi artérielle : les "vasa vasorum" (vaisseaux dans les vaisseaux) (89). L'*adventice* est innervée par les fibres nerveuses du système autonome sympathique et parasympathique. Elle a un rôle dans la régulation de la fonction vasculaire à travers les cellules immunitaires et les fibroblastes. Les fibroblastes participent à plusieurs phénomènes: production et dégradation de protéines de la MEC (fibres de collagène, de fibronectine, de protéoglycanes et d'élastine) et l'interaction avec les autres cellules du vaisseau via divers molécules (facteurs de croissance, cytokines...). Tout comme la *média*, l'épaisseur et la complexité de l'*adventice* s'amoinrent avec la diminution du calibre des artères.

Remarque : il y a une différence entre la structure des veines et des artères. L'épaisseur de la *média* est plus épaisse dans les artères, afin de résister aux fortes pressions auxquelles elles sont soumises. Étant donné la faible pression dans les veines, elles possèdent contrairement aux artères, des valves pour éviter un reflux du sang.

3.2 L'endothélium

3.2.a Généralités

L'endothélium est à l'interface entre le sang et les tissus. Il est composé d'une monocouche de cellules tapissant la surface interne des vaisseaux sanguins qui agit comme une barrière pour contrôler l'échange de nutriments, de molécules et de messagers avec les tissus environnants. Les principales fonctions de l'endothélium pulmonaire comprennent le maintien du tonus vasculaire, l'hémostase, le trafic des

leucocytes, la production de facteurs de croissance et de signaux cellulaires avec fonction autocrine et paracrine (90).

Les CE des artères pulmonaires humaines sont en contact direct avec le sang et sont donc soumises à des forces mécaniques. La transduction des forces mécaniques est un élément clé dans la régulation du tonus vasculaire et du flux sanguin local. On peut distinguer plusieurs formes majeures de stress mécanique: les forces de cisaillement (*shear-stress*, en anglais), et les forces de compression et de tension au sein de la paroi artérielle (*stretch*, en anglais) qui diffèrent en termes d'amplitude, de direction et d'oscillation, mais varient également en intensité et en fréquence au cours du cycle cardiaque. Les forces de tension sont la résultante de l'étirement, de la circonférence de la paroi vasculaire due à une distension de son diamètre (loi de Laplace).

$$\text{Loi de Laplace : } T = P \cdot \frac{r}{2H}$$

T est la tension pariétale; P la pression ; r le rayon de l'artère et H l'épaisseur de la paroi artérielle

Lorsque la pression augmente, les forces de tension augmentent elles aussi, augmentant le stress mécanique et étirant les composants de la paroi artérielle (fig. 20).

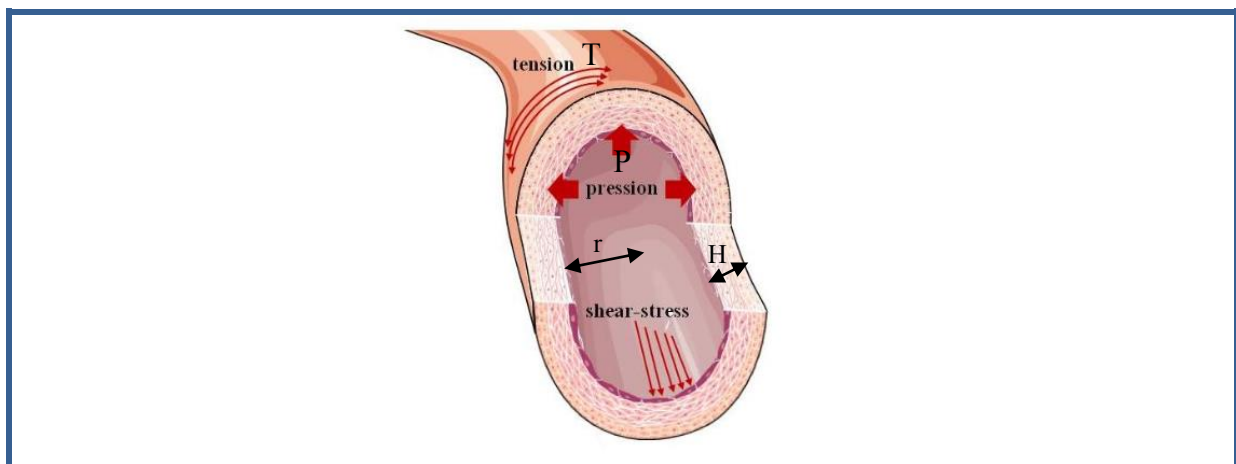


Figure 20 : Forces mécaniques agissant sur l'artère pulmonaire.

Les CE sont organisées longitudinalement par rapport au vaisseau et donc dans le sens de l'écoulement sanguin. Le flux sanguin exerce des forces physiques sur l'endothélium. Il peut y avoir les contraintes de cisaillement (*shear-stress*) dues aux forces de frottements du flux sanguin. Et la pression du sang peut exercer des forces perpendiculaires au flux qui vont induire des augmentations du calibre de l'artère générant des forces de tension (*stretch*) (80).

L'endothélium a également un rôle important dans le trafic des cellules inflammatoires, puisque c'est au travers des cellules endothéliales que se déroule la diapédèse, phénomène permettant la migration de leucocytes depuis la circulation vers les tissus.

Remarque : l'origine embryologique des CE confère aux cellules hématopoïétiques et endothéliales des marqueurs de surface communs comme les clusters de différenciation CD34/31/45, le facteur de von Willebrand (vWF), la VE-cadhérine et le récepteur 2 du VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor).

3.2.b Les cellules endothéliales

Les CE jouent un rôle primordial dans la physiologie de la circulation pulmonaire. La signalisation calcique a un rôle important dans les CE en régulant les facteurs vasoactifs. Le réticulum endoplasmique et les mitochondries qui ont un rôle central dans l'homéostasie calcique sont décrits ci-dessous, ainsi que les facteurs vasoactifs libérés par les CE.

i. Le calcium

Le calcium (Ca^{2+}) est un second messenger essentiel dans toutes les cellules, contrôlant un large éventail d'événements cellulaires, notamment, la dépolarisation, la contraction des muscles lisses ou striés, la sécrétion hormonale, l'activation d'enzymes ou protéases, la migration d'organites intracellulaires et l'activation de transports d'ions (91). Dans les CE, le calcium joue un rôle dans la régulation du tonus vasculaire, du débit sanguin, dans l'angiogenèse et de nombreuses autres fonctions (92). Les variations de concentration calcique intracellulaire ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) jouent un rôle clé dans le réseau complexe des voies de transduction du signal dans les CE pour maintenir l'homéostasie cardiovasculaire (93).

Le Ca^{2+} cytoplasmique est maintenu à 100-200 nM, alors qu'il est de 1 à 2 mM dans le milieu extracellulaire. Pour maintenir l'homéostasie calcique, le Ca^{2+} peut être rapidement tamponné par des protéines cytoplasmiques et/ou des organites intracellulaires (le réticulum endoplasmique, les mitochondries, les lysosomes). Les flux de Ca^{2+} cytoplasmique, peuvent provenir des sources extracellulaires (via la membrane plasmique) ou des sources intracellulaires (réticulum endoplasmique, mitochondries, lysosomes). Il existe, également, divers récepteurs membranaires, transporteurs et canaux ioniques, situés à la fois à la membrane plasmique et aux membranes des réservoirs intracellulaires de Ca^{2+} qui régulent l'homéostasie calcique (94). La perturbation de l'homéostasie calcique est impliquée dans de nombreuses pathologies.

- Le calcium à la membrane plasmique:

Les influx et efflux de calcium dans la cellule fait intervenir divers canaux et transporteurs situés sur la membrane plasmique (fig. 21).

Concernant les efflux de Ca^{2+} , les transporteurs actifs tels que les échangeurs $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ participent à la sortie d'un ion calcium (Ca^{2+}) vers le milieu extracellulaire en échange de l'entrée de trois ions sodium (Na^+) dans la cellule, selon le gradient de sodium. Il y a également des pompes Ca^{2+} -ATPase, qui ont besoin d'ATP pour fonctionner, comme les PMCA (pour « *Plasma Membrane Calcium ATPase* ») qui participent aux efflux de Ca^{2+} en échange de protons (H^+). Pour les influx de Ca^{2+} , les canaux calciques voltage-dépendants (CCVD) participent à l'entrée de calcium dans les cellules en favorisant leur ouverture suite à une dépolarisation de la membrane. Les CCVD ne semblent pas jouer de rôle fonctionnel important dans la vaso-réactivité des CE (95).

Le calcium peut également entrer dans la cellule par les canaux mécanotransducteurs comme les SAC (pour « *stretch activated channels* »). Ils sont sensibles à différents stimuli extérieurs (forces de cisaillements, changement de température...). Les principaux récepteurs SAC que l'on retrouve à la membrane des CE sont les TRP (« *Transient Receptor Potential* »). Les TRP forment une superfamille divisée en 7 sous-familles : les TRPC (« *Canonical* »), les TRPV (« *Vanilloid* »), les TRPM (« *Melastatin* »), les TRPA (« *Ankyrin* »), les TRPP (« *Polycystin* »), les TRPML (« *Mucolipin* ») et les TRPN (« *NO Mechanoreceptor Potential C* ») (96). L'influx de Ca^{2+} à partir de l'espace extracellulaire en réponse aux stimuli joue un rôle essentiel dans le relâchement vasculaire dépendant de l'endothélium (97, 98).

La relation entre l'entrée et le stockage du Ca^{2+} fait intervenir les canaux ioniques tels que les SOCE (pour « *Store-Operated Calcium Entry* ») permettent de faire entrer du calcium quand les niveaux de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ sont faibles.

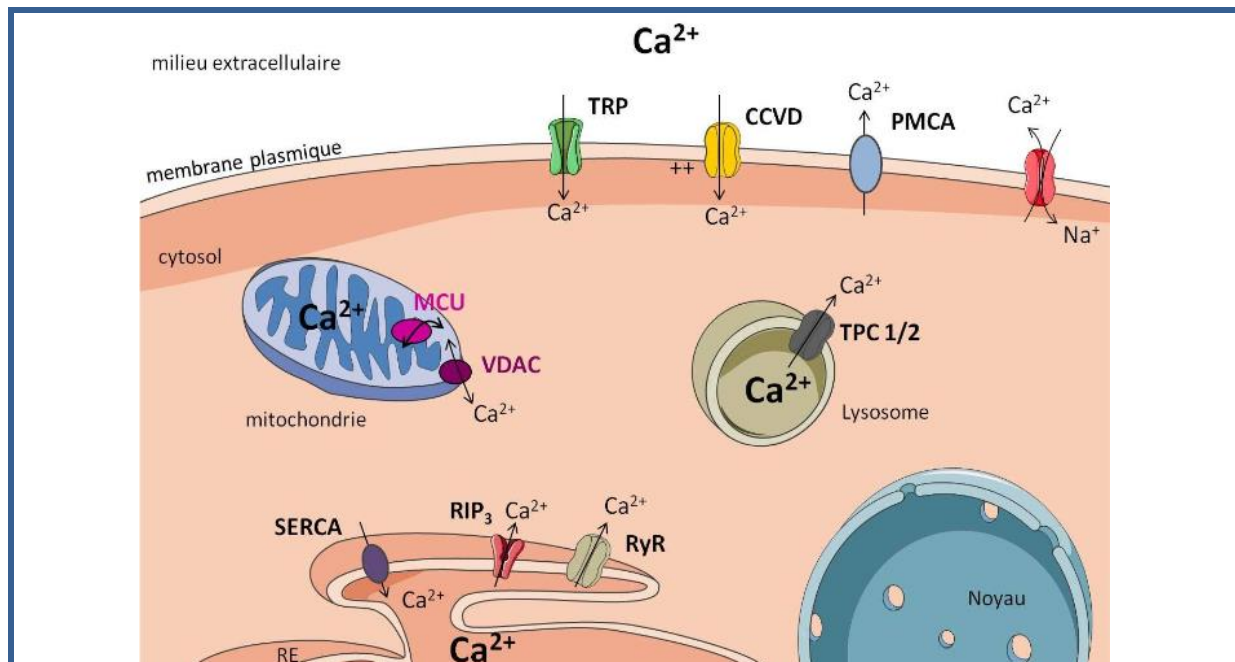


Figure 21: Schéma de la signalisation calcique.

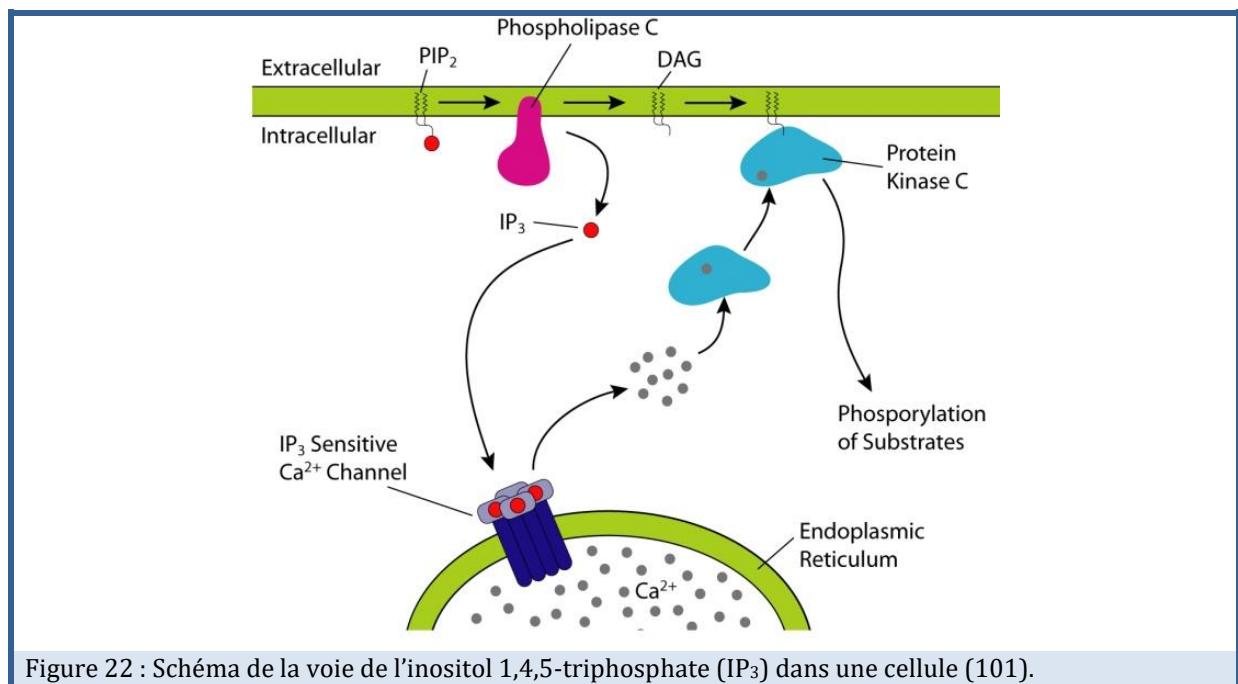
Le calcium intracellulaire est régulé par la présence de récepteurs comme des canaux, des pompes et des échangeurs d'ions. Les différents récepteurs du calcium à la membrane et au niveau des organites intracellulaires (ER= RE) sont les TRP : Transient Receptor Potential channel, CCVD : canaux calciques voltages-dépendants, PMCA : Plasmic membrane Ca^{2+} ATPase, TPC : Two-Pore channel, SERCA : Sarco/Endoplasmique Reticulum Ca^{2+} ATPase, RyR : Ryanodine receptor, RIP₃ : IP₃ receptor, MCU : Mitochondrial calcium uniport, VDAC : Voltage dependant anion channel (80).

- Le calcium et le réticulum endoplasmique (RE):

Le RE, appelé réticulum sarcoplasmique (RS) dans les cellules musculaires, forme un réseau continu de tubules dans le cytoplasme des cellules. Il existe deux types de RE: le RE rugueux et le RE lisse. Le premier est le siège de la synthèse des protéines via les ribosomes, le second est le lieu de modifications post-transcriptionnelles des protéines. Le RE est le principal réservoir de Ca^{2+} d'une cellule (99). Les augmentations globales ou

localisées de calcium cytoplasmique peuvent également provenir du Ca^{2+} libéré au niveau du RE par les stocks intracellulaires après l'ouverture des récepteurs à la ryanodine (RyR) ou des récepteurs à l'inositol 1,4,5-triphosphate (IP₃R) (fig. 21).

Les RyR sont présents à la membrane du RE. Il existe trois isoformes (RyR1, RyR2 et RyR3) dont l'expression de chaque isoforme dépend des tissus (cœur, cerveau, muscle squelettique...). L'activité des RyR est régulée par différents mécanismes, le principal modulateur étant le calcium. Les différents activateurs des canaux RyR sont l'ADP ribose cyclique (ADPRc) et la caféine. Les IP₃R présents à la surface de la membrane du RE sont des canaux calciques qui ont la capacité à « relarguer » du Ca^{2+} . Trois isoformes de IP₃R ont été caractérisés (types 1, 2 et 3). Ils sont activés par l'inositol 1,4,5-triphosphate (IP₃) ; celui-ci est produit lors de l'activation de nombreux récepteurs membranaires couplés à des protéines G qui active la phospholipase C β (PLC β), qui va cliver le phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP₂) en IP₃ et diacylglycérol (DAG) (100) (fig. 22). Les différents activateurs des IP₃R sont l'ATP, l'IP₃, le Ca^{2+} , les protéines RACK1, qui augmentent la probabilité d'ouverture induite par IP₃ et donc la sortie du Ca^{2+} vers le cytoplasme.



L'homéostasie calcique du réticulum est régulée par l'activité concertée entre les différents canaux du RE dont les pompes SERCA (pour « Sarco/Endoplasmique Reticulum Ca^{2+} ATPase »). La recharge du RE à partir du cytoplasme se fait presque exclusivement par les pompes SERCA du RE, grâce à l'énergie fournie par l'ATP. Ce mécanisme contribue à diminuer le $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Les pompes SERCA changent de conformation en présence d'ATP, ce qui permet un passage de deux ions Ca^{2+} du cytoplasme vers le RE. Cette entrée de charge positive est compensée par un co-transport d'ions H^+ vers le cytoplasme. Il existe plusieurs isoformes de SERCA, on

retrouve surtout la SERCA3 dans les CE d'artère pulmonaire impliquée dans la vasorelaxation (102). Il existe différents activateurs et inhibiteurs des pompes SERCA. Les inhibiteurs pharmacologiques tels que la thapsigargine (TG), le 2,5-di(t-butyl)hydroquinone (tBHQ), le vanadate... vont bloquer les pompes SERCA et vider les stocks du RE en Ca^{2+} . Une dysfonction des pompes SERCA peut entraîner des pathologies cardiaques, musculaires et des cancers (prostate, foie...).

La vidange du RE peut faire entrer du Ca^{2+} extracellulaire par le système STIM/ORAI. Les protéines STIM, sensible aux variations de Ca^{2+} à la membrane du RE, peuvent migrer vers la membrane plasmique et interagir avec les protéines ORAI. Cela favorise l'entrée de Ca^{2+} dans le cytoplasme puis vers le RE via les pompes SERCA (103, 104).

- Les mitochondries:

Bien que le RE soit le principal site de stockage du calcium, 25% du calcium intracellulaire est localisé dans les mitochondries. Les fonctions des mitochondries sont multiples, c'est tout d'abord le siège de la production de la molécule la plus énergétique pour la cellule: l'adénosine 5'-triphosphate (ATP) par la chaîne respiratoire mitochondriale, mais également, de la synthèse des hormones stéroïdes, du métabolisme du glucose, et des mécanismes de mort et survie cellulaire (105).

Plusieurs molécules d'ATP sont synthétisées au cours de différentes voies du catabolisme du glucose et des acides gras telles que le cycle de Krebs mitochondrial, l'oxydation mitochondriale des acides gras ou les phosphorylations oxydatives. Les CE obtiennent une grande partie de leur énergie lors de la glycolyse (106). La chaîne respiratoire est la voie finale d'oxydation des substrats énergétiques (sucres et graisses). Cette étape va assurer la ré-oxydation des composés réduits par la glycolyse et le cycle de Krebs, au niveau des complexes I, II et III qui permettent le transfert des électrons. La chaîne respiratoire mitochondriale aboutit finalement à la réduction de l'oxygène moléculaire en eau par le dernier complexe de la chaîne respiratoire. L'énergie libérée par ces oxydations successives produit de l'ATP. En effet, le gradient électrochimique d' H^+ , de part et d'autre de la membrane mitochondriale interne se fait par l'expulsion d' H^+ entre l'espace inter-membranaire et la matrice mitochondriale, couplé au transfert d'électrons dans les complexes I, II et III (fig. 23). Ce gradient est utilisé par l'ATP synthétase qui permet la phosphorylation des molécules ADP en ATP. La chaîne respiratoire mitochondriale est également le siège de la production des radicaux superoxydes et hydroxyles. Durant la respiration, 4 électrons sont ajoutés à l' O_2 au niveau du complexe IV. Mais l' O_2 peut être réduit en amont au niveau des complexes I et III, formant des espèces réactives de l'oxygène (ERO). Leur excès ou leur fuite peuvent entraîner des dommages importants (cf. partie 3.4).

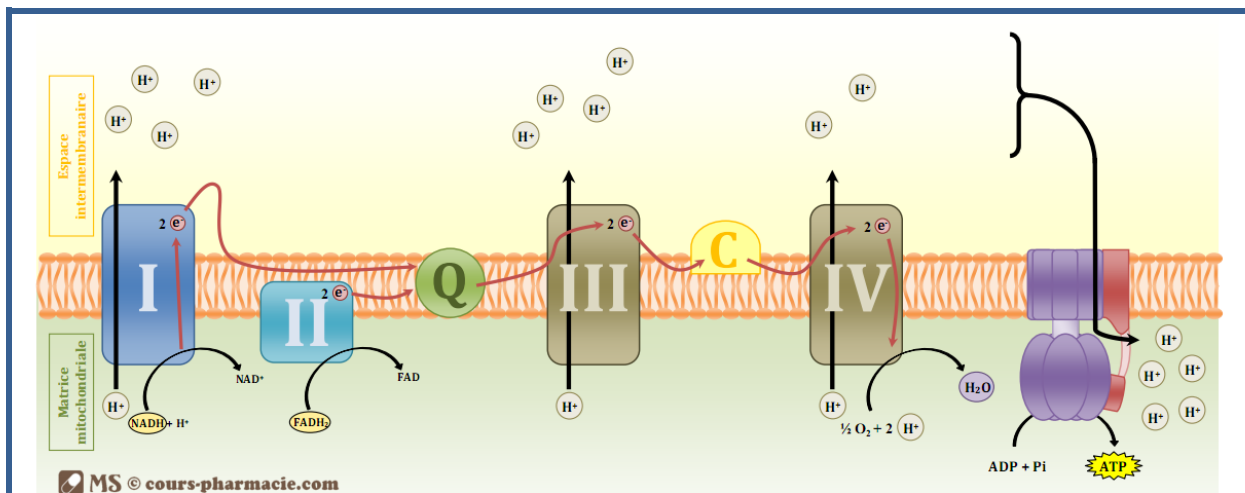


Figure 23 : Schéma de la chaîne respiratoire mitochondriale.

Les différents complexes qui permettent le transfert des électrons, avec la co-enzyme Q qui permet la transition entre le complexe I ou II et le complexe III et le **cytochrome C** qui permet la transition entre le complexe III et le complexe IV (107).

La mitochondrie est également un acteur important dans la régulation de l'homéostasie calcique. Le potentiel de membrane mitochondrial ($\Delta\psi_m$ ou PMM) très négatif permet l'entrée passive du calcium à travers un canal ou uniporteur calcique : MCU (pour « *Mitochondrial Calcium Uniporter* ») (108). La sortie du calcium mitochondrial passe par des échangeurs $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ qui nécessite l'entrée d'ions sodium ou par l'échangeur $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$, ce qui nécessite, ici, l'entrée de proton afin de maintenir le gradient électrochimique de la membrane interne mitochondriale (109, 110). Elle peut se faire aussi par l'ouverture du pore de transition (PTP). En revanche, l'ouverture prolongée du PTP entraîne un gonflement des mitochondries et un effondrement du potentiel de membrane (fig. 24). Les mitochondries sont considérées comme un important système tampon du calcium qui coopère avec le RE pour maintenir l'hémostase cellulaire calcique. À cet égard, les réseaux de mitochondries et du RE sont très proches les uns des autres. Les deux organites communiquent et coopèrent pour réguler le trafic de calcium et orchestrer ainsi des aspects clés de la fonction endothéliale (111). Les membranes du RE et des mitochondries peuvent être associées via une structure appelée MAM (*mitochondria-associated ER-membrane*) qui préservent et régulent l'homéostasie cellulaire dans différents environnements (112).

Les changements physiologiques des concentrations en calcium mitochondrial ($[\text{Ca}^{2+}]_m$) et cytosolique ($[\text{Ca}^{2+}]_c$) permettent de réguler de nombreux aspects des fonctions mitochondriales, notamment la production d'ERO mitochondriaux (EROMt), la motilité, la dynamique et la biogenèse mitochondriales (85, 113).

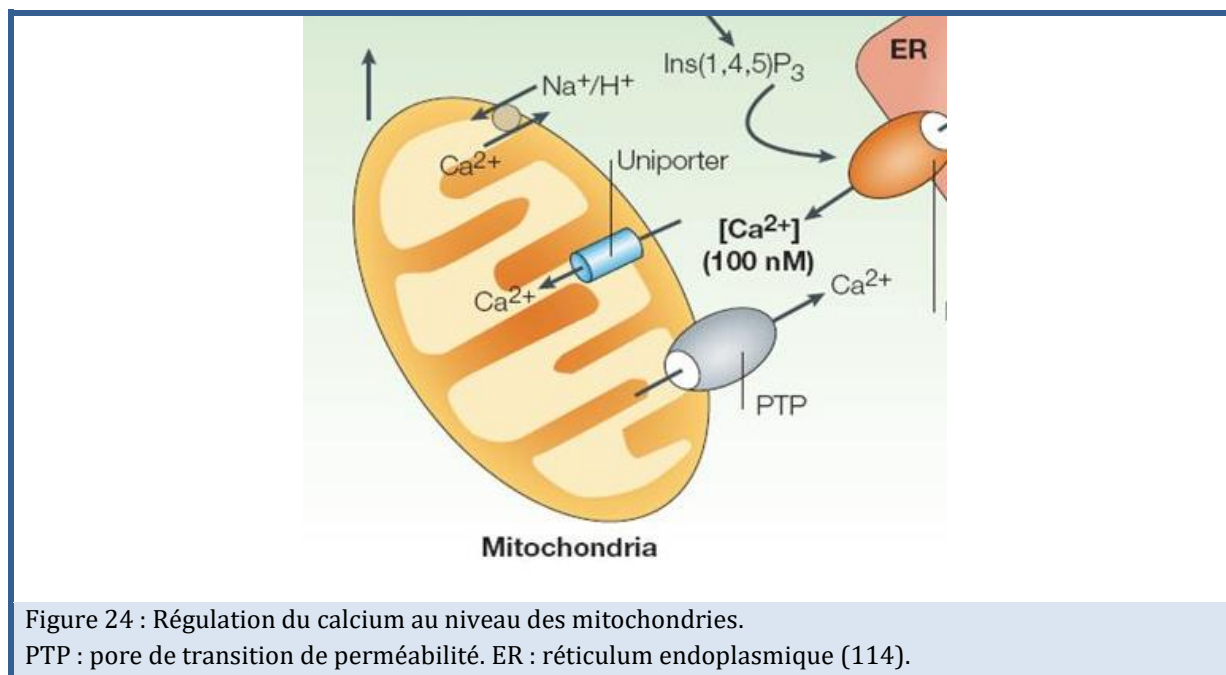


Figure 24 : Régulation du calcium au niveau des mitochondries.
PTP : pore de transition de perméabilité. ER : réticulum endoplasmique (114).

Tout au long de la vie des mitochondries, les dommages s'accumulent, suivis par les processus de fusion et de fission mitochondriales afin de générer des mitochondries fonctionnellement normales et/ou endommagées. Ce sont donc des organites dynamiques qui fusionnent et qui se divisent constamment et peuvent constituer de grands réseaux intracellulaires interconnectés. La perturbation de l'équilibre fusion-fission peut modifier la morphologie mitochondriale. Il est maintenant reconnu que la dynamique mitochondriale permet aux CE non seulement de satisfaire leurs besoins métaboliques, mais aussi de faire face à un stress interne ou externe (115). Les anomalies de la biogenèse et de la dynamique des mitochondries ont des conséquences néfastes sur l'approvisionnement bioénergétique et contribuent au dysfonctionnement endothélial et à la pathogenèse des maladies cardiovasculaires (116, 117).

Dans les CE, le calcium a un rôle primordial dans la vasoréactivité des vaisseaux. En effet, le calcium est impliqué dans la production du monoxyde d'azote (NO) qui diffuse vers les CML pour relâcher le vaisseau.

ii. La voie du monoxyde d'azote (NO)

Dans le système vasculaire, le NO est une molécule vitale qui joue un rôle important dans le maintien du tonus vasculaire. Le NO est un bio médiateur synthétisé, à partir de la L-arginine, par les NO synthases (NOS), une famille de quatre iso-enzymes :

- La eNOS, la NO synthase endothéliale (ou NOS3): elle est constitutive et activée par le calcium ou par phosphorylations. Elle se situe principalement au niveau des membranes plasmiques dans les cavéoles des CE mais aussi dans les myocytes cardiaques, les cellules mésangiales rénales, les plaquettes... (118).

-La nNOS, la NO synthase neuronale (ou NOS1): elle est constitutive et activée par le calcium. Elle se trouve principalement dans le système nerveux et le muscle squelettique (119).

-La iNOS, le NO synthase inductible (NOS2) : elle est inductible notamment par le stress oxydant et des agents pro-inflammatoires. Elle se trouve dans le cytosol de divers types cellulaires dont les CE (120).

-La mtNOS, la NO synthase mitochondriale: elle est dépendante du calcium mitochondrial (121).

Dans les CE, la production de NO se produit principalement via la eNOS. Les unités dimères de la eNOS catalysent le transfert d'électrons du NADPH vers divers intermédiaires porteurs d'électrons afin de produire du NO, ce qui nécessite de l'O₂, de la L-arginine et un co-facteur, le tétrahydrobioptérine (BH₄). Le Ca²⁺ est impliqué dans la production du NO par la eNOS en se combinant à la calmoduline (CaM). L'association de la CaM et du Ca²⁺ va induire un changement de conformation de la eNOS et l'activer en conséquence. Le NO est alors synthétisé lors de la conversion de la L-arginine en L-citrulline, une réaction qui est catalysée par la eNOS, assurant un faible taux basal de NO. O₂+ L-arginine → L-citrulline + NO.

Une fois produit, le NO agit dans la lumière du vaisseau, avec des effets anti-inflammatoires sur les leucocytes et les plaquettes afin de diminuer l'adhérence des cellules inflammatoires à l'endothélium. Il diffuse vers les CML, via la guanylate cyclase, pour induire la production de guanosine monophosphate cyclique (GMPc), second messenger qui permet la modulation du tonus vasculaire (fig. 25) (122).

iii. Les autres facteurs vasodilatateurs

Les autres molécules vasodilatatrices sont la prostacycline (PGI₂) de la famille des prostaglandines et la voie de l'EDHF (facteur hyperpolarisant endothélial) (fig. 25). Ces molécules sont sensibles à différents stimuli (l'inflammation, aux forces de cisaillement) (123-125). Les forces de cisaillements peuvent activer des canaux du type TRPV qui se situent à la membrane où il y a également des canaux potassiques (K_{Ca}). Le Ca²⁺ qui entre dans les CE active la sécrétion de l'EDHF, qui va diffuser vers les CML. L'EDHF va faire sortir le potassium des CML par des canaux K_{Ca}, ce qui entraîne une modification du potentiel transmembranaire en l'hyperpolarisant la membrane des CML (126). L'hyperpolarisation se propage alors via les jonctions communicantes (GAP junctions), et en conséquence, entraîner une diminution du Ca²⁺ dans les CML qui conduit à une relaxation des CML et donc une dilatation de l'artère (127, 128).

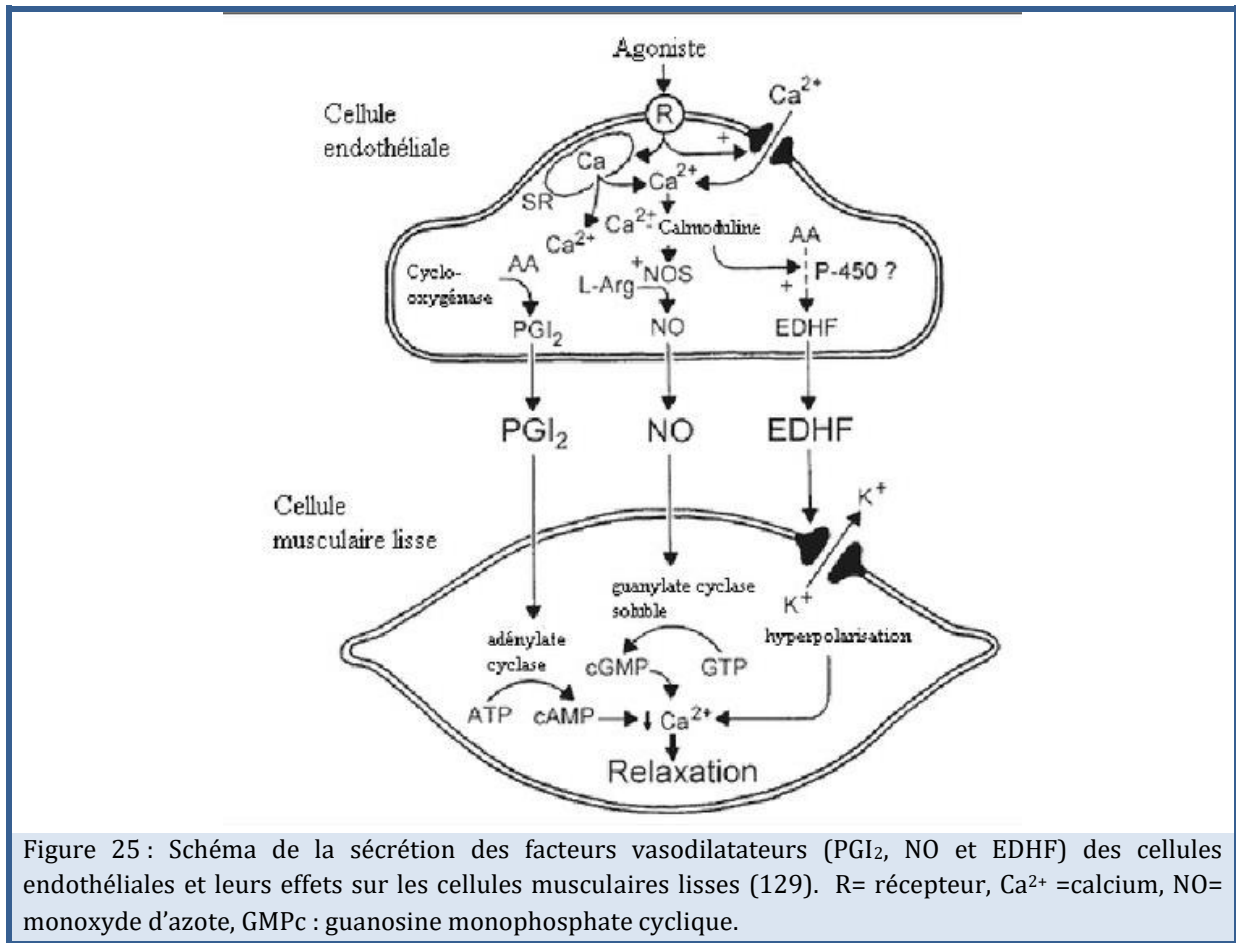


Figure 25 : Schéma de la sécrétion des facteurs vasodilatateurs (PGI₂, NO et EDHF) des cellules endothéliales et leurs effets sur les cellules musculaires lisses (129). R= récepteur, Ca²⁺ =calcium, NO= monoxyde d'azote, GMPc : guanosine monophosphate cyclique.

iv. Les facteurs vasoconstricteurs non dépendants du calcium

Les CE peuvent également participer à la vasoconstriction des vaisseaux. Une des molécules impliquées est l'endothéline (ET-1) qui agit directement sur les CML, elle a un rôle majeur dans le système cardiovasculaire. L'ET-1 est synthétisée à partir de la pré-pro-endothéline, du gène codant pour l'ET-1. La synthèse de l'ET-1 est soumise à une régulation transcriptionnelle. Elle peut être induite par différents facteurs tels que la thrombine, les catécholamines, l'angiotensine II, les facteurs de croissance, les cytokines, les ERO, etc. et peut être inhibée par le NO, les prostacyclines, les peptides natriurétiques, etc. (130). La stimulation des CML par l'ET-1 (action paracrine) provoque une réponse contractile ainsi qu'une réponse proliférative.

D'autres molécules sont impliquées dans la vasoconstriction comme la sérotonine (5-HT). Elle est synthétisée dans les CE en deux étapes à partir de l'acide aminé L-tryptophane et va agir sur les CML. Le taux circulant de 5-HT est augmenté dans certaines pathologies cardiovasculaires (131).

Les CE sont donc capables d'initier une vasoconstriction ou une vasodilatation des vaisseaux en sécrétant des facteurs vasodilatateurs (le NO, la PGI₂ et l'EDHF) et des facteurs vasoconstricteurs (ET-1, 5-HT, le thromboxane A2 et l'angiotensine II). Ces facteurs vont agir sur les CML afin de faire varier le diamètre de l'artère.

3.3 L'Hypertension pulmonaire (HTP)

3.3.a Définition et généralités

L'HTP est l'une des principales pathologies de la circulation pulmonaire. C'est une maladie rare (1/2000 en Europe) de mauvais pronostic avec une incidence de 2.4 par million d'habitants/an pour les 30 - 40 ans (132). Elle est définie par une augmentation de la PAPm \geq à 25 mmHg au repos (10) et peut s'élever jusqu'à 7 fois la valeur basale, soit plus de 90 mmHg au repos (133). Chez un sujet sain, la PAPm se situe entre 10 et 15 mmHg au repos (82). La PAPm peut augmenter au cours du vieillissement de 1 mmHg tous les 10 ans. Le système vasculaire pulmonaire reçoit la totalité du flux sanguin, c'est un système à faible pression, faible résistance et haut débit, ce qui lui donne une haute compliance (souplesse) au niveau des artérioles pré-capillaires. La PAPm se calcule en fonction de la pression des capillaires pulmonaires (PCP), du débit sanguin (Q) et des résistances vasculaires pulmonaires (RVP).

$$\text{PAPm} = \text{PCP} + (\text{Q} * \text{RVP})$$

3.3.b La classification

La classification des HTP permet de regrouper les différentes manifestations pathologiques présentant des similitudes cliniques, symptomatologiques et les mêmes prises en charge thérapeutiques (tableau 3) (10). On distingue le terme HTP qui regroupe toutes les hypertensions pulmonaires et le terme HTAP qui regroupe uniquement celles du groupe 1 (134).

1. Hypertension artérielle pulmonaire (HTAP)

- Idiopathique
- Héritable :
 - mutation *BMPR2*
 - autres mutations
- Induite par des médicaments ou des toxiques
- Associée à :
 - une connectivite
 - une infection par le VIH
 - une hypertension portale
 - une cardiopathie congénitale
 - des schistosomias

1'. Maladie veino-occlusive pulmonaire (MVO) et/ou hémangiomatose capillaire pulmonaire (HCP)

- Idiopathique
- Héritable :
 - mutations *EIF2AK4*
 - autres mutations
- Induite par des médicaments, des toxiques ou les radiations
- Associée à :
 - une connectivite
 - une infection par le VIH

1''. Hypertension pulmonaire persistante du nouveau-né

2. HTP des cardiopathies gauches

- Dysfonction ventriculaire gauche systolique
- Dysfonction ventriculaire gauche diastolique
- Valvulopathies
- Cardiomyopathies obstructives congénitales ou acquises
- Sténoses des veines pulmonaires, congénitales ou acquises

3. HTP des maladies respiratoires et/ou associées à une hypoxie chronique

- Broncho-pneumopathies chroniques obstructives (BPCO)
- Pneumopathies interstitielles
- Autres maladies respiratoires restrictives et/ou obstructives
- Syndromes d'apnées du sommeil
- Syndromes d'hypoventilation alvéolaire
- Exposition chronique à l'altitude
- Anomalies du développement pulmonaire

4. HTP thromboembolique chronique et autres obstructions artérielles pulmonaires

- HTP thromboembolique chronique
- Autres obstructions artérielles pulmonaires :
 - angiosarcome
 - autres tumeurs intravasculaires
 - artérites
 - sténoses congénitales des artères pulmonaires
 - parasites (hydatidose)

5. HTP de mécanismes multifactoriels ou incertains

- Maladies hématologiques : anémie hémolytique chronique, syndromes myéloprolifératifs, splénectomie
- Maladies systémiques : sarcoïdose, histiocytose X, lymphangioleiomyomatose, neurofibromatose
- Maladies métaboliques : glycogénoses, maladie de Gaucher, dysthyroïdies
- Autres : microangiopathies thrombotiques pulmonaires tumorales, médiastinites fibreuses, insuffisance rénale chronique (avec ou sans dialyse), HTP segmentaire

Tableau 3 : Classification des hypertensions pulmonaires (HTP) (134).

Groupe 1 : l'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP). Il correspond au groupe de pathologies affectant les artères pulmonaires distales qui sont altérées par le remodelage, la vasoconstriction et l'inflammation. Certains facteurs de risque ont été mis en évidence tels que les risques iatrogènes et toxiques (anorexigènes, amphétamines, chimiothérapie...), des conditions démographiques (sexe féminin, grossesse, obésité...) ou certaines pathologies (infection par le VIH, hépatite chronique...) (135). La prévalence de l'HTAP varie entre 10 et 26 cas par million d'habitants adultes. L'incidence quant à elle varie entre 2 et 7.6 cas par million d'habitants et par an (136). La survie est réduite, en France, elle est d'environ 58% à 3 ans et de 67% à 2 ans (137).

Groupe 2 : Hypertension pulmonaire associée à des cardiopathies gauches.

Le débit cardiaque gauche est diminué par une cardiopathie gauche, il y a une augmentation des pressions dans toute la circulation pulmonaire. Les cardiopathies gauches sont liées à des dysfonctions systoliques ou diastoliques ventriculaires gauches ou maladie congénitale (138).

Groupe 3 : HTP associée aux pathologies pulmonaires chroniques et/ou à une hypoxie chronique.

L'HTP hypoxique apparaît suite à une hypoxie alvéolaire chronique. Cette forme peut être physiologique (exemple chez les Tibétains qui présentent une adaptation à l'hypoxie de haute altitude (139)), ou pathologique. L'HTP peut survenir suite à diverses pathologies obstructives touchant les voies aériennes telles que la BPCO et l'apnée du sommeil. L'étiologie de l'HTP de groupe 3 est multifactorielle, mais l'hypothèse de la vasoconstriction hypoxique pulmonaire (VHP) semble jouer un rôle central. La VHP est un mécanisme intrinsèque à la circulation pulmonaire saine et correspond à une adaptation qui redistribue le flux sanguin aux alvéoles mieux ventilées. En revanche, si l'hypoxie devient chronique et atteint tout le poumon, la VHP se généralise sur l'ensemble de l'arbre vasculaire pulmonaire et une HTP de groupe 3 se développe (140). Elle est donc corrélée aux fonctions respiratoires et à l'oxygénation du sang (10). Dans le cas de la BPCO, il y a une limitation sévère des fonctions respiratoires et/ou une hypoxie. La PAPm retrouvée dans ce dernier cas n'excède pas 35 mmHg, ce qui correspond à une HTP modérée (141).

Groupe 4 : HTP post-embolique chronique.

Cette hypertension est causée par une obstruction chronique proximale et ou distale des artères pulmonaires essentiellement d'origine thromboembolique (formation d'un caillot ou thrombus dans la circulation sanguine) (142).

Groupe 5 : HTP dont les mécanismes sont multifactoriels et incertains.

Les HTP classées dans ce groupe peuvent être causées par un choc septique ou suite à une chirurgie cardiothoracique.

3.3.c Signes cliniques et diagnostics

Le diagnostic de l'HTP est généralement tardif à cause du manque de spécificité des symptômes (essoufflements, dyspnée, signes d'insuffisance cardiaque droite...). Le temps est assez long entre l'apparition des symptômes et le diagnostic. Le diagnostic est réalisé en plusieurs étapes dans des centres de référence de l'HTP.

L'examen de référence se fait par le cathétérisme cardiaque droit, c'est une technique invasive qui permet d'avoir la pression ventriculaire droite et la pression dans l'oreillette droite (138).

Un électrocardiogramme (ECG) est un autre outil pour observer les anomalies cardiaques comme l'hypertrophie de l'oreillette droite et du ventricule droit (135). Des explorations fonctionnelles respiratoires peuvent être aussi réalisées de manière concomitante avec l'analyse des gaz du sang. Enfin, des examens complémentaires de biologie peuvent être prescrits afin de doser certains facteurs comme le peptide natriurétique B (BNP), dont on retrouve une augmentation dans l'HTP associée à la BPCO (143) ou la mesure du taux de protéine C réactive (CRP).

3.4 Les mécanismes physiopathologiques

L'augmentation de la PAPm se traduit par une augmentation de la résistance de l'artère pulmonaire (rétrécissement du calibre des vaisseaux) provoqué par un remodelage obstructif de la paroi des vaisseaux. Le remodelage peut être dû à différents phénomènes comme la prolifération des CE et des CML, associée à une surproduction de la MEC et une infiltration de cellules inflammatoires, ainsi qu'à l'adhésion de plaquettes. En parallèle, le phénomène de vasoconstriction (hyperréactivité) est augmenté progressivement dans les artères pulmonaires. Cela entraîne une augmentation du travail cardiaque au niveau du ventricule droit (cœur droit) et peut entraîner la mort du patient (144, 145).

3.4.a L'hyperréactivité ou vasoréactivité

Au cours de l'HTP, une altération de la réactivité vasculaire est observée (146, 147). Elle se traduit par un déséquilibre de la balance de facteurs vasoconstricteurs et de facteurs vasodilatateurs en faveur d'une vasoconstriction. A long terme, ce déséquilibre entraîne une vasoconstriction maintenue au repos et un remodelage des vaisseaux avec un rétrécissement du diamètre de la lumière des artères (148). Différents facteurs sont impliqués dans ce phénomène d'hyperréactivité: l'altération de l'endothélium, la modification de l'activité des canaux ioniques et/ou l'hypoxémie. L'altération de l'endothélium est associée à la diminution de sa capacité à produire des facteurs vasodilatateurs et sa capacité à libérer davantage de facteurs vasoconstricteurs (149-151).

Dans l'HTP, il y a d'une part l'activation de la voie vasoconstrictrice, par l'augmentation de la synthèse d'ET-1 (152) et l'augmentation du taux plasmatique de la 5-HT (153), et, d'autre part, l'altération des voies vasodilatatrices, avec une baisse de la production du NO (154). Par ailleurs, il a également été montré un défaut de synthèse de prostacycline par les CE via la perte de l'expression du gène de la prostacycline synthase (155).

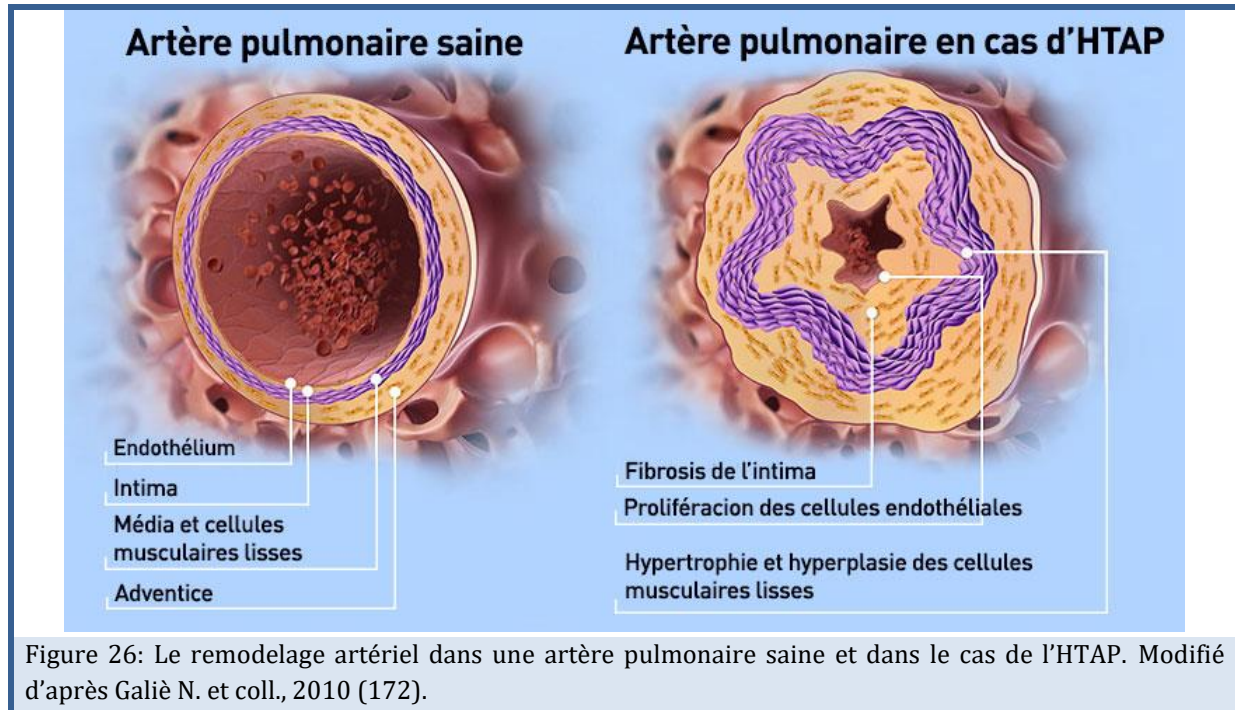
De plus, le calcium joue un rôle important dans ce phénomène en participant à l'augmentation du tonus myogénique pulmonaire et, par conséquent, des résistances vasculaires pulmonaires (RPV) (156). Lors de l'HTP, on retrouve une augmentation de calcium intracellulaire au repos dans les CML participant à la vasoconstriction continue des artères (157). Il peut y avoir une dysfonction au niveau des canaux potassiques, avec une diminution de l'expression et de l'activité de certains canaux potassiques K⁺ (canaux voltage-dépendants Kv1.5 et Kv2.1) (158, 159). La réduction de l'activité de ces canaux favorise une dépolarisation membranaire, ce qui induit une augmentation de la [Ca²⁺]_i, favorisant la contraction des CML (160). Les données disponibles sont limitées concernant les modifications et le rôle spécifique du Ca²⁺ des CE dans l'HTP (161). L'exposition des CE pulmonaires à une hypoxie aiguë (162) ou chronique (163) augmenterait le Ca²⁺ basal intracellulaire, ce mécanisme serait médié par une régulation des canaux TRP. Ces données suggèrent une augmentation des [Ca²⁺]_i dans les CE dans l'HTP.

3.4.b Le remodelage artériel

Le remodelage artériel s'observe dans les trois tuniques des artères (135). Le diamètre interne des vaisseaux se réduit, surtout dans les artères de moins de 500 µm chez l'Homme (164) (fig. 26). C'est un aspect physiopathologique progressif et tardif des artères pulmonaires, irréversible et qui contribue à augmenter les RPV. Différents mécanismes peuvent être à l'origine de cette réduction du diamètre: une dysfonction endothéliale, une prolifération incontrôlée des cellules et la résistance à l'apoptose. Cela peut conduire à une muscularisation des petites artères dépourvues de la média (165, 166). Cette dernière est liée à l'hypertrophie de la média au cours de laquelle les CML jouent un rôle prépondérant caractérisé par une migration, une hyper-prolifération et une hyperplasie de ces cellules. Dans l'HTP, la migration et la prolifération accrues des cellules se produisent à la fois dans les CML et les CE (167). Contrairement aux CML, où les mécanismes sont davantage connus en ce qui concerne la migration et la prolifération cellulaire, il existe peu de données sur les mécanismes induits dans les CE. Il existe une interaction entre les CE et les CML. En effet, une étude a montré que l'augmentation de Ca²⁺ intracellulaire dans les CE via les SOCE, joue un rôle important dans l'activation transcriptionnelle de divers facteurs inflammatoires (AP-1), qui entraînent à leur tour la prolifération des CML et le remodelage vasculaire (163).

De plus, la résistance à l'apoptose est une des principales caractéristiques étudiées dans la physiopathologie de l'HTAP, au cours de laquelle la balance prolifération/ apoptose est dérégulée. Les cellules sont résistantes aux différents stimuli pro-apoptotiques (168) (169). Par exemple, l'expression de protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 (B-

cell lymphoma 2) est surexprimée dans les poumons de patients HTAP (170). On peut également observer une hyperpolarisation de la membrane mitochondriale et le maintien du cytochrome c à la mitochondrie qui sont des phénomènes traduisant une résistance à l'apoptose (171). L'expression de protéines anti-apoptotiques BCL-XL (B-cell lymphoma- extra large) est observée dans les artères pulmonaires (particulièrement au niveau des CE) de patients HTAP (170).



3.4.c L'inflammation

i. Généralités sur l'inflammation

L'inflammation est un processus de réponse physiologique contrôlée de l'organisme dont l'objectif est la réparation et la régénération d'un tissu lésé par une agression dépassant les capacités de réponse normale du tissu. Lors d'une agression exogène ou endogène, il y a une infiltration polymorphe de l'ensemble du tissu lésé par différentes cellules inflammatoires entraînant des changements physiopathologiques. Elle implique, également, le recrutement sur le site atteint de constituants du sang que ce soit des protéines plasmatiques ou des leucocytes. C'est un phénomène à la fois vasculaire, cellulaire et humoral.

L'inflammation est l'ensemble des mécanismes réactionnels de défense par lesquels l'organisme reconnaît, détruit et élimine toutes les substances qui lui sont étrangères.

La réaction inflammatoire peut se schématiser par la chaîne suivante (173) :

Inducteurs → senseurs → médiateurs → effecteurs

Les inducteurs de l'inflammation peuvent provenir de sources exogène et endogène. Les inducteurs de l'inflammation se répartissent en 2 catégories :

- Les inducteurs exogènes: microbiens (facteurs de virulence...) et non microbiens (allergènes, corps étrangers, toxiques...)
- Les inducteurs endogènes: cellulaire, plasmatique, matrice extracellulaire...

Les différentes cellules qui participent à l'inflammation sont des cellules phagocytaires (macrophages, neutrophiles, éosinophiles et basophiles), des mastocytes qui libèrent des molécules activant l'inflammation, des lymphocytes, des fibroblastes et autres cellules (endothéliales, ostéoblastes...).

Les inducteurs de l'inflammation stimulent la production de médiateurs protéiques issus du plasma ou sécrétés par les cellules présentes sur le site inflammatoire (macrophage résidents, plaquettes...) qui vont faciliter la réaction en cascade de la réponse inflammatoire (174). Les médiateurs d'origine plasmatique sont présents dans le plasma sous la forme de précurseurs qui doivent être activés (le plus souvent par protéolyse) pour acquérir leurs propriétés. Ces composants sont produits à distance du foyer inflammatoire. Les médiateurs d'origine cellulaire sont soit préformés et séquestrés dans des granules intracellulaires (le stimulus inflammatoire entraîne la dégranulation) soit synthétisés *de novo* en réponse à un stimulus. Les différents médiateurs cellulaires sont : les amines vasoactives (histamine et sérotonine), les peptides vasoactifs, les anaphylatoxines, les médiateurs lipidiques, les enzymes protéolitiques, les cytokines pro-inflammatoires et les chimiokines.

Dans ce travail de thèse, nous nous intéressons particulièrement aux cytokines. Ce sont des glycoprotéines, synthétisées et libérées par diverses cellules sous l'influence de stimulus variés. Elles sont considérées comme des médiateurs de la communication intercellulaire et sont donc de bons « bio-marqueurs » pour étudier l'initiation de l'inflammation *in vitro*. Une même cytokine peut être produite par différents types cellulaires et agir sur un nombre important de cibles différentes (actions autocrine et paracrine). Elles interviennent dans les mécanismes de l'inflammation et de l'immunité. De nombreuses cytokines ont été recensées : au moins 40 cytokines à ce jour. Les principales cytokines intervenant dans la réaction inflammatoire sont : les interférons gamma (activent les macrophages par exemple), les facteurs chimiotactiques (monocytes, neutrophiles...) et les interleukines (IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α ...).

Les interleukines IL-6 et IL-8 nous intéressent particulièrement, car ce sont les cytokines sécrétées en majorité par les cellules endothéliales (175, 176).

L'interleukine-6 (IL-6) est une cytokine pro-inflammatoire pléiotropique et immunomodulatrice. Elle est produite par les phagocytes (macrophages et cellules dendritiques) et par les fibroblastes, les cellules épithéliales et endothéliales... en réponse à des stimuli variés dont certains agents infectieux ou leurs composants. L'IL-6 intervient dans les

mécanismes de l'immunité en favorisant la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes, en stimulant la prolifération des lymphocytes T en association avec l'IL-2 et en favorisant la génération de lymphocytes T cytotoxiques. L'IL-6 intervient aussi en activant des phagocytes et modifiant l'endothélium, en favorisant le recrutement des monocytes sanguins vers les tissus et en stimulant la production des protéines de la phase aiguë de l'inflammation par les hépatocytes.

L'interleukine-8 (IL-8) est une chimiokine dont la propriété principale est d'attirer les neutrophiles et leucocytes circulants vers le foyer inflammatoire. Elles sont produites par de nombreuses cellules (monocytes, macrophages, fibroblastes, cellules endothéliales, hépatocytes...) après stimulation par l'IL-1 ou les TNF- α . Les polynucléaires neutrophiles sont la cible privilégiée de l'IL-8 par l'intermédiaire d'un récepteur spécifique : l'IL8-R. L'IL-8 induit le chimiotactisme et l'activation des neutrophiles avec induction de cyclooxygénase, de lipooxygénase et de NO-synthase.

ii. L'inflammation et l'HTP

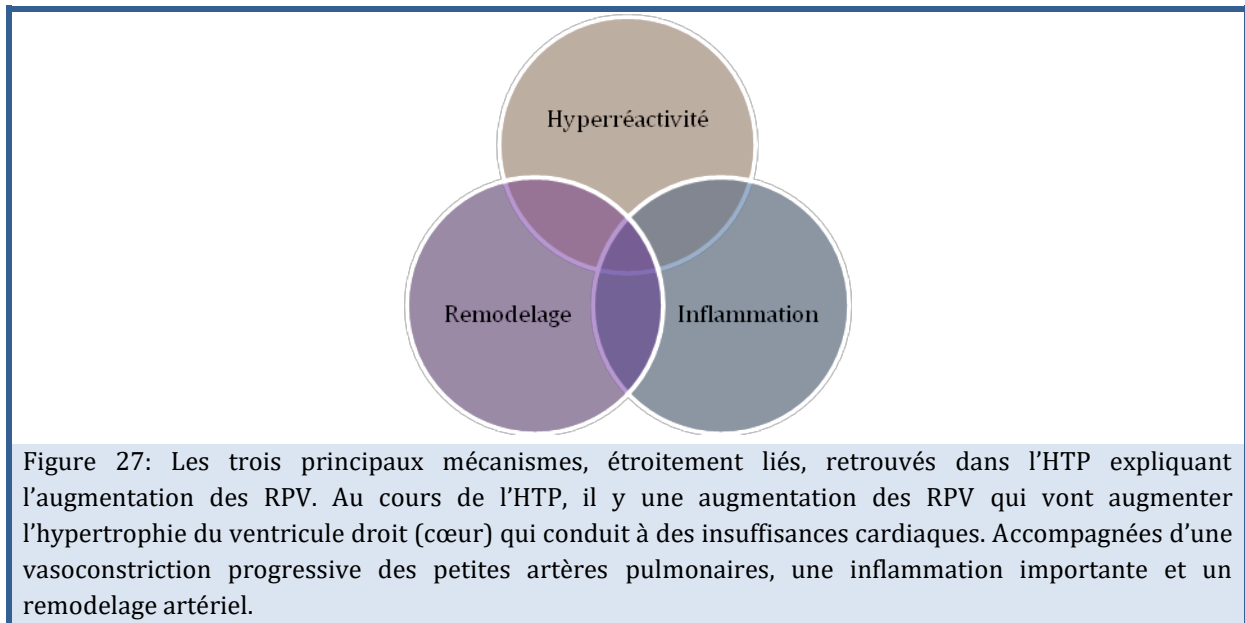
L'inflammation est une composante majeure de l'HTP. Elle est présente dans tous les types d'HTP mais beaucoup plus décrite dans le cas de l'HTAP. En effet, la question de l'auto-immunité dans le cas de l'HTAP a été soulevée (177). Chez des patients avec un terrain immunitaire déficient (infection VIH...), le rôle de l'inflammation a été majoritairement étudié.

Il y a actuellement un débat sur le recrutement des cellules inflammatoires avec deux hypothèses : (i) « inside-out » où les cellules proviendraient du sang et s'infiltreraient par l'intima : diffusion dans les vaisseaux. (ii) « outside-in » : apparition précoce de cellules inflammatoires au niveau de l'adventice qui serait la première couche de cellules infiltrées par les cellules inflammatoires (178, 179).

Dans l'HTP, les interleukines ou cytokines pro-inflammatoires sont des marqueurs de la gravité de la maladie. En effet, ce sont des facteurs solubles que l'on peut retrouver dans le sang comme le facteur de nécrose tumorale (TNF- α), et les interleukines (IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70) (175, 180). Des taux élevés de CRP, TNF- α , et IL-6 sont observés chez les patients HTP associée à la BPCO (181, 182). L'augmentation des chimiokines attirent les cellules inflammatoires, ce qui entraîne une augmentation de l'infiltration de cellules inflammatoires.

Des infiltrats inflammatoires sont également observés autour des vaisseaux pulmonaires chez les patients atteints d'HTP avec la présence de cellules immunologiques (macrophages, lymphocytes B et T...) (178). L'ensemble de ces observations, contribuent donc au remodelage dans l'HTP et l'HTAP (183).

L'hyperréactivité, le remodelage vasculaire et l'inflammation sont les trois principaux mécanismes, étroitement liés, retrouvés dans l'HTP expliquant l'augmentation des résistances vasculaires pulmonaires (RPV) (fig. 27).



D'un point de vue moléculaire, les différentes cellules (les CE, les CML et les fibroblastes) sont impliquées dans le développement de l'HTP au niveau de ces trois mécanismes. La dysfonction endothéliale reste un prédicteur précoce d'événements cardiovasculaires ou de mortalité ultérieure et joue un rôle majeur à l'interface de ces trois mécanismes (184). Par ailleurs, le stress oxydant joue également un rôle important dans le développement des maladies cardiovasculaires et serait impliqué dans la dysfonction endothéliale observée dans ces pathologies.

3.4.d Le rôle du stress oxydant dans la dysfonction endothéliale

Parmi les différents mécanismes physiopathologiques retrouvés dans l'HTP, on retrouve un dénominateur commun : le stress oxydant avec la surproduction d'ERO, la diminution des capacités antioxydantes et la diminution de la biodisponibilité du NO (12, 185).

i. Généralités sur le stress oxydant

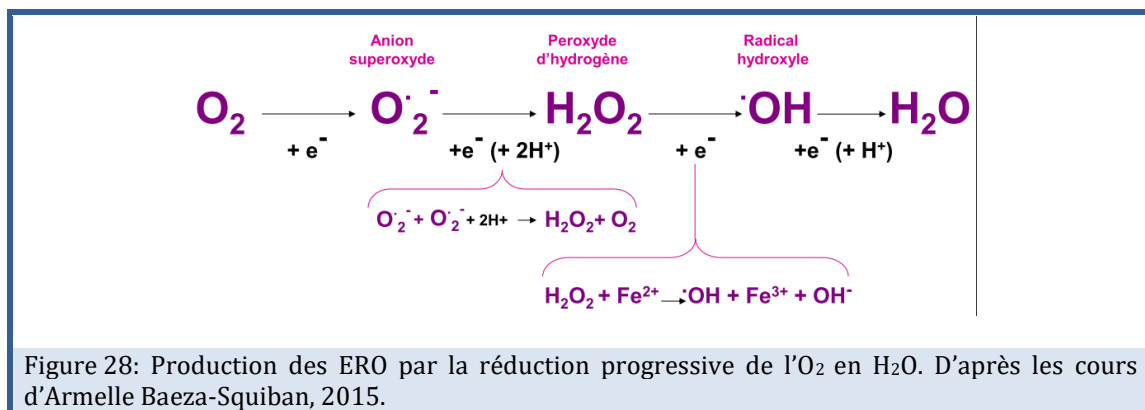
Il a été montré le rôle primordial des ERO dans la physiopathologie vasculaire. Produites en petite quantité, à l'état physiologique, les ERO interviennent dans diverses cascades de signalisation intracellulaire (186). Lorsque les ERO sont produites en forte quantité (condition pathologique, exposition à des xénobiotiques, altération du système de défense antioxydant), la balance pro-oxydants vs. antioxydants est déséquilibrée en faveur d'un stress oxydant.

Au niveau du système cardiovasculaire, les ERO exercent un rôle physiologique important dans le maintien de l'intégrité cardiaque et vasculaire et un rôle physiopathologique dans les dysfonctions cardiovasculaires, telles que l'athérosclérose, l'hypertension artérielle systémique et pulmonaire, le diabète, etc. (187, 188). Les ERO constituent une variété de molécules oxydantes qui inclut des radicaux libres et des espèces non radicalaires (189-191). Les espèces radicalaires sont des molécules possédant au moins un électron non apparié (électron célibataire). Cela leur confère une grande instabilité chimique et sont donc très réactives vis-à-vis de nombreux composés (atomes, molécules...).

Les espèces radicalaires sont : l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), le radical hydroxyle ($\cdot OH$), les radicaux lipidiques ($LO\cdot$ et $LOO\cdot$) et le monoxyde d'azote radicalaire ($NO\cdot$).

Les espèces non radicalaires sont: l'oxygène singulet (1O_2), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), l'acide hypochloreux ($HOCl$) et les peroxynitrites ($ONOO^-$).

L'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) est obtenu par la capture d'un électron par l'oxygène singulet. Il est principalement produit par la chaîne respiratoire mitochondriale et la NADPH déshydrogénase. Il peut diffuser dans la cellule de l'ordre d'une dizaine de secondes et il est le radical oxygéné le plus abondamment formé. Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) peut être obtenu par oxydation ou dismutation. Il réagit avec le fer (Fe^{2+}), via la réaction de Fenton pour donner le radical hydroxyle (fig. 28). Le radical hydroxyle ($\cdot OH$) est une espèce très réactive. En raison de sa faible durée de vie, il diffuse peu et agit essentiellement sur son lieu de production.



- Les principales sources d'ERO dans la cellule:

Les mitochondries sont une source importante d'ERO, au niveau du complexe I et III, lors du transfert d'électrons par la réduction progressive du dioxygène (O_2) en eau (H_2O), lié au métabolisme cellulaire. Il existe d'autres sources d'ERO au niveau cellulaire: les NADPH oxydases (NOX) lors de la défense cellulaire, de la signalisation et de l'apoptose, les NO synthases lors de la production de peroxynitrites et les myéloperoxydases. La production d'ERO peut également provenir des xanthines

(SOD2) est mitochondriale. Il existe un troisième type de SOD tétramérique, la SOD Fe/Cu/Zn (SOD3) extracellulaire. Cette protéine a la capacité de se lier à la surface des membranes cellulaires ou dans le collagène de type I, elle protège les cellules du stress oxydant exogène (198).

La catalase (CAT) :

Elle agit en synergie avec la SOD. Cette enzyme est largement présente dans tout l'organisme, c'est une des enzymes les plus abondantes chez l'être humain. Elle se retrouve principalement dans les peroxysomes du foie, des reins et dans les globules rouges (199). Les niveaux d'H₂O₂ sont régulés à la baisse par les enzymes antioxydantes, notamment la catalase et les peroxydases (111).

La glutathion peroxydase (GPx) :

Elle agit également en synergie avec la SOD et permet donc d'accélérer la dismutation de l'H₂O₂ en O₂. Elle peut se trouver dans le milieu extracellulaire, dans le cytosol et dans les mitochondries. Deux molécules de glutathion réduit (GSH) sont oxydées en glutathion-disulfure (GSSG) lors de cette réaction. Il existe une GPx associée à la membrane mitochondriale : la phospholipide-hydroperoxyde glutathion peroxydase (PHGPx) impliquée notamment dans la diminution de la peroxydation lipidique (peroxyde organique ROOH en ROH) (200).

L'hème oxygénase (HO-1) :

Elle catalyse la dégradation de l'hème en produisant de la biliverdine, du fer et du CO. La biliverdine est ensuite convertie en bilirubine par la biliverdine réductase. L'HO-1 peut être induite en réponse à un stress comme l'hypoxie ou les cytokines. Cette induction fait intervenir le facteur de transcription Nrf2 qui va le lier à une séquence régulatrice appelée élément de réponse antioxydant (ARE pour *antioxidant responsive element*) qui se situe sur la région du promoteur des gènes antioxydants (201).

- Le système non enzymatique:

Ce système comprend, d'une part, des molécules non-enzymatiques endogènes : les métallothionéines, le glutathion GSH, l'acide urique, la bilirubine, la coenzyme Q10 et l'acide lipoïque et, d'autre part, des molécules exogènes (apportés par l'alimentation): les vitamines C et E (acide ascorbique et α -tocophérol), les caroténoïdes, les flavonoïdes, polyphénols, la procystéine et la N-acétylcystéine.

Les ERO peuvent causer des effets délétères si elles sont produites en grande quantité.

ii. Le stress oxydant dans l'HTP

L'implication du stress oxydatif dans les pathologies vasculaires pulmonaires a été mise en évidence dans de nombreux modèles animaux mimant l'HTP, ainsi que chez l'être humain (12). Dans l'hypertension induite par l'hypoxie chronique ou par la monocrotaline, une augmentation de la production d'ERO a été observée dans les artères pulmonaires (175, 202-206). Par ailleurs, de nombreuses altérations (hyperréactivité et remodelage) observées dans les pathologies vasculaires pulmonaires peuvent être diminuées suite à l'administration d'antioxydants (207, 208). Ces observations concordent avec des études qui montrent la présence de biomarqueurs du stress oxydant (GPx, Malondialdéhyde: MDA) retrouvés chez l'humain au niveau urinaire et sanguin (209, 210).

- Les sources d'ERO dans l'HTP:

Plusieurs études ont montré le rôle important de la NADPH oxydase (particulièrement au niveau des sous-unités de NOX2 et NOX4) dans la génération d'ERO dans des modèles d'animaux d'HTP (211-213). L'augmentation d'ERO peut également provenir du découplage de la eNOS dans les artères pulmonaires, avec un déficit de la synthèse du co-facteur BH4. En effet, la eNOS joue un rôle central dans le maintien de l'homéostasie vasculaire, elle peut être source de NO, mais également de $O_2^{\cdot-}$, en absence du co-facteur BH4 (214-216). Les ERO peuvent également être produits par les mitochondries dysfonctionnelles et la xanthine oxydase dans les pathologies cardiovasculaires (161).

- Les ERO impliqués dans l'hyperréactivité et le remodelage lors de l'HTP:

Le stress oxydant a un rôle important, dans l'hyperactivité et le remodelage des vaisseaux pulmonaire, associé à une perturbation de l'homéostasie calcique. En effet, il a été démontré que la surproduction d'ERO augmente la $[Ca^{2+}]_i$ et, inversement, que les $[Ca^{2+}]_i$ participent à la génération d'ERO (217). En effet, les ERO peuvent activer les canaux Ca^{2+} par deux mécanismes, soit par l'activation directe des canaux (TRPA1, TRPV4, TRPM4) sur leurs résidus cystéine sensibles au changement rédox, ou bien par l'activation des canaux du type TRPM2 par des métabolites générés lors de la production d'ERO (218-220). En plus de moduler l'activité des canaux situés à la membrane plasmique, les ERO peuvent également induire une libération de Ca^{2+} à partir des stocks intracellulaires (221-223). L' H_2O_2 peut activer la phospholipase C, ce qui conduit à la conversion de PIP2 en IP_3 et en DAG, déclenchant la libération du Ca^{2+} à partir du RE (224). Cependant, les réponses calciques médiées par les ERO ne sont pas clairement étudiées dans l'HTP, l'augmentation de $[Ca^{2+}]_i$ est la conséquence, probablement simultanés, de plusieurs phénomènes de libération du Ca^{2+} (afflux intracellulaires).

Les interactions entre les ERO et le Ca^{2+} ont été impliquées dans plusieurs mécanismes spécifiques induisent une augmentation de l'hyperréactivité, notamment (11(11):

- la vasoconstriction pulmonaire hypoxique (VPH),
- la vasoconstriction artérielle pulmonaire dans l'hypoxie chronique,
- la production du NO.

Le mécanisme précis par lequel l'hypoxie provoque une vasoconstriction pulmonaire soit encore à élucider, il est admis que les ERO favorisent la contraction des CML en déclenchant une augmentation des $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Par ailleurs, il a été montré que les anti-oxydants abolissent la réponse de la VPH dans les myocytes isolés du poumon et de l'artère pulmonaire (225, 226).

La libération des facteurs vasoconstricteurs peut dépendre du stress oxydatif, il peut stimuler à la fois l'expression du gène ET-1 et la sécrétion du peptide ET-1 (227). Mais il peut être également impliqué dans la diminution de l'expression et l'activité des canaux potassiques qui sont sensibles à la tension rédox. Ces phénomènes vont conduire à une vasoconstriction accrue (159, 161).

L'anion superoxyde généré par les NOX peut réagir avec le NO pour produire des peroxynitrites (ONOO^-) et diminuer la biodisponibilité du NO (228), ce qui peut entraîner des effets délétères comme la diminution de la vasodilatation dans les CE (229). Les ERO générées par les NOX peuvent oxyder les résidus de cystéine sur la eNOS pour réduire la liaison à BH_4 et donc entraîner le découplage de la eNOS (230, 231).

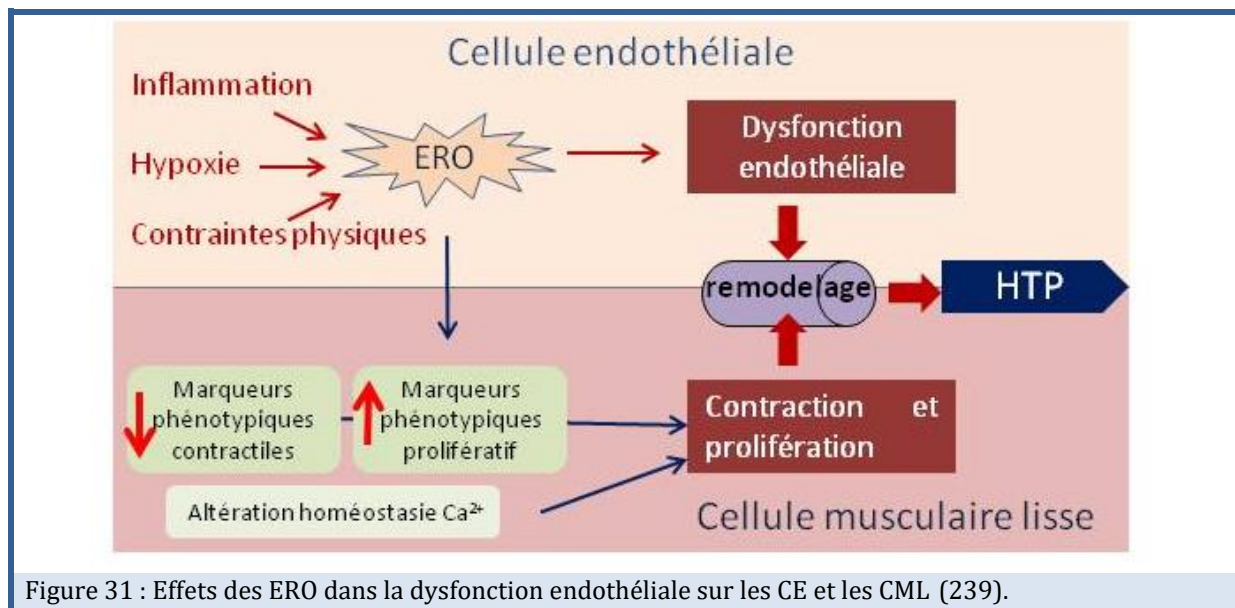
La iNOS peut également générer du NO et des ERO simultanément, qui vont interagir entre eux pour former des peroxynitrites. Ces derniers ont de fortes propriétés oxydantes vis-à-vis d'un certain nombre de molécules biologiques et peuvent induire la mort cellulaire (232).

Une altération de la production des divers facteurs vasoactifs endothéliaux est observée chez les patients atteints d'HTP. Étant donné que la majorité de ces facteurs affectent la croissance des CML, une altération de leur production peut faciliter le développement d'une hypertrophie vasculaire pulmonaire et donc un remodelage structurel caractéristique de l'HTP. La migration et la prolifération cellulaire peuvent également dépendre à la fois des ERO et du $[\text{Ca}^{2+}]_i$ dans divers types de tissus (217). Des données ont montré que l'exposition des CE au VEGF augmentait les ERO dérivées du NADPH, entraînant une modification post-traductionnelle de SERCA2b (S-glutathiolation), une augmentation de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ et une migration des cellules (223).

Le stress oxydatif induit également l'expression de plusieurs facteurs de croissance tels que le facteur de croissance transformant $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$), le facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF), le facteur de croissance fibroblastique 2 (FGF-2) et le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF) (233-235). Les ERO régulent HIF-1 (facteur inductible par l'hypoxie) qui est un senseur de l' O_2 , essentiel au maintien de l'homéostasie de l'oxygène (236). HIF-1 est aussi impliquée dans la prolifération des CML et l'induction des facteurs de croissance (237, 238). Ensemble, la dérégulation de

ces facteurs constrictifs et prolifératifs par les ERO favorise le remodelage vasculaire observé dans le cas de l'HTP (239).

En résumé, les ERO jouent un rôle primordial dans la régulation de la libération intracellulaire et de l'entrée de Ca^{2+} dans les CE. Les ERO et le Ca^{2+} sont impliqués dans les altérations de la vasoréactivité retrouvée dans l'HTP. Les mécanismes par lesquels les ERO contribuent au développement de la dysfonction vasculaire et au remodelage de l'HTP peuvent être divisés en deux grandes catégories: les facteurs affectant le tonus vasculaire et les facteurs influant sur l'épaisseur de la paroi vasculaire (fig. 31).



- Les ERO et l'inflammation dans l'HTP:

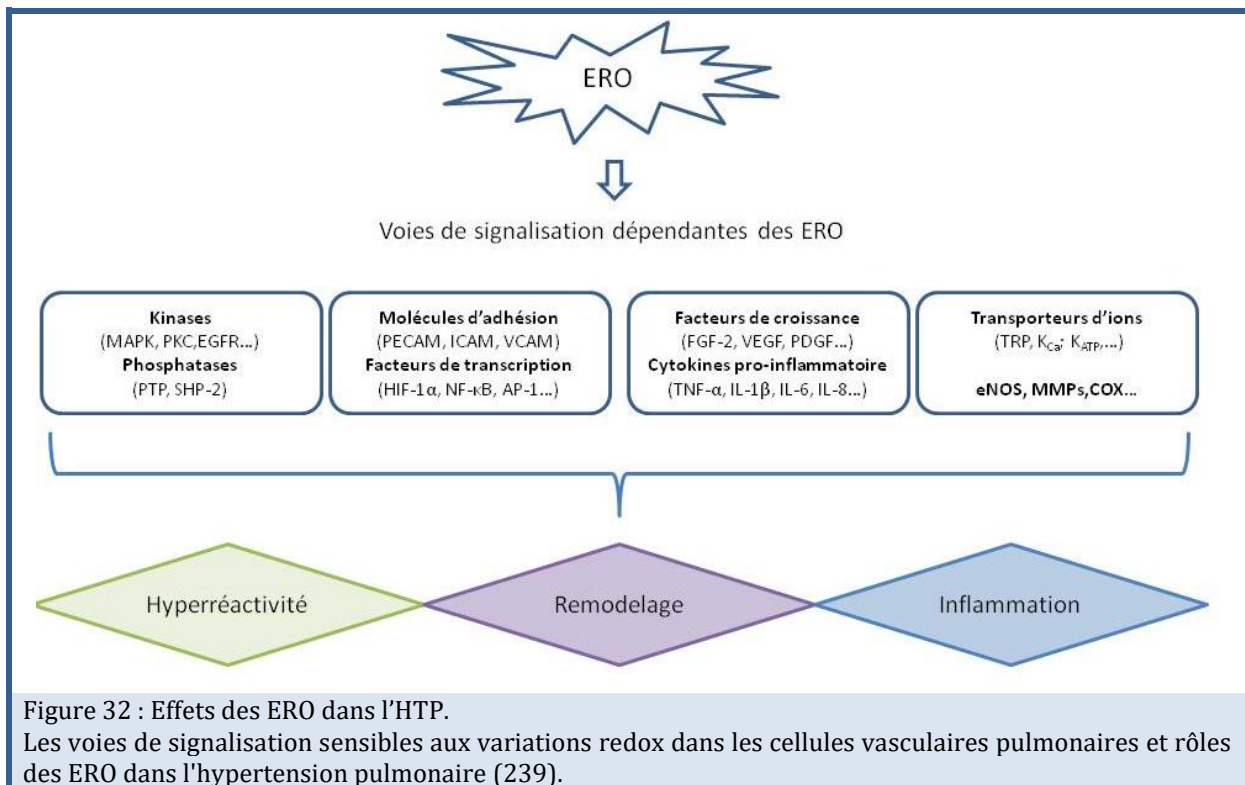
L'inflammation est une caractéristique commune du remodelage des vaisseaux sanguins caractérisés par une accumulation de cellules inflammatoires périvasculaires (240). Les ERO (en particulier $O_2^{\cdot-}$ et H_2O_2) jouent un rôle central dans les cascades de signalisation qui conduisent à la sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires contribuant à l'exacerbation de l'inflammation observée dans les pathologies vasculaires telles que l'HTP (241-243). Il est important de noter que le stress oxydatif est une caractéristique retrouvée dans la plupart des maladies cardiovasculaires et qu'il contribue à l'activation des CE, favorisant l'adhérence et l'infiltration des cellules immunitaires ainsi que l'activation de ces cellules immunitaires infiltrées. L'activation des CE représente une adaptation physiologique à différents stimuli et peut être considérée comme une réponse à une lésion. Mais elle peut également être une étape précoce dans le développement d'un dysfonctionnement endothélial (vasculaire) dans des conditions inflammatoires chroniques, par exemple.

- Les ERO des mitochondries (EROMt):

Des altérations mitochondriales ont été mises en évidence dans l'HTP (244). Lors d'une production accrue d'EROMt au niveau mitochondrial, des dommages oxydatifs peuvent avoir lieu et conduire à un dysfonctionnement cellulaire voire la mort cellulaire. Une surproduction de l' $O_2^{\cdot-}$ mitochondrial peut entraîner une altération de l'ADNmt, un processus de lipoperoxydation et oxyder des protéines. Les EROmt peuvent également endommager les complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale, ce qui peut exacerber la production d'EROMt et créer un cercle vicieux qui contribue au dysfonctionnement endothélial et aux maladies vasculaires (245). La modification du potentiel membranaire mitochondrial (PMM) peut aussi déclencher une production excessive d'EROMt.

De nombreuses réactions enzymatiques qui se produisent dans les mitochondries, nécessitent du Ca^{2+} . Une augmentation des taux de Ca^{2+} mitochondrial et des EROmt est souvent observée dans des conditions apoptotiques (246).

L'inflammation et le stress oxydant jouent donc un rôle important dans la physiopathologie de l'HTP (247, 248). Un déséquilibre entre production et détoxification des ERO au niveau des vaisseaux pulmonaires entraîne différents signaux qui conduisent à une vasoréactivité importante, une augmentation de la migration et de la prolifération cellulaire, ainsi qu'un remodelage des artères pulmonaires (249-251) (fig. 32).



De nombreuses études épidémiologiques et cliniques ont montré une corrélation entre les pics de pollution atmosphérique particulaire et l'augmentation de pathologies respiratoires et cardiovasculaires. D'après l'OMS, 80 % des décès liés à la pollution atmosphérique sont dus aux pathologies cardiovasculaires. Le chapitre suivant décrit les effets des particules atmosphériques sur la santé, plus particulièrement sur le système cardiovasculaire.

Les personnes atteintes de pathologies vasculaires et en particulier d'hypertension pulmonaire pourraient donc être plus sensibles à la pollution particulaire. Malgré les nombreuses études épidémiologiques et cliniques montrant une corrélation entre la pollution particulaire et l'augmentation de ces pathologies, les mécanismes d'action toxique des particules sur les cellules cibles vasculaires humaines sont peu décrits dans la littérature et notamment les effets de PM_{2.5} et de NPs sur les cellules cibles endothéliales humaines. De plus, malgré le rôle clé du calcium dans la régulation du tonus vasculaire, peu d'études s'intéressent aux effets des PM_{2.5} et des NPs sur la signalisation calcique dans les cellules endothéliales.

4. Effets des particules sur la santé humaine

La dernière partie de cette étude bibliographique a pour objectif de présenter les effets des particules sur la santé. L'impact de l'exposition humaine aux particules atmosphériques sur la santé s'évalue par des études toxicologiques (mécanistiques) mais également par des études épidémiologiques et cliniques. Dans un premier temps, les effets des particules de la pollution sur la santé humaine seront exposés, d'après des études épidémiologiques à court terme et à long terme, axées sur les pathologies cardiovasculaires. Dans un second temps, les données déjà connues sur les différents mécanismes d'action cytotoxiques des particules seront abordées. L'étude de la toxicité des particules atmosphériques, permet, à partir de leur taille et de leurs caractéristiques physico-chimiques de comprendre leurs effets néfastes sur la santé humaine.

4.1 Etudes épidémiologiques

Les effets sanitaires et environnementaux induits par un grand nombre de polluants de l'air sont bien connus depuis de nombreuses années. Il est clairement établi aujourd'hui, notamment sur la base de plusieurs études épidémiologiques, que les niveaux de pollution actuels de l'air ambiant ont un impact sur la santé, et plus particulièrement au niveau respiratoire et au niveau cardiovasculaire. À court terme, on observe une augmentation des hospitalisations pour causes de pathologies cardiovasculaires et respiratoires et des décès prématurés. À long terme, l'exposition aux polluants atmosphériques entraîne une augmentation du risque de développer un cancer du poumon ou des maladies cardiovasculaires et respiratoires chroniques (asthme, broncho-pneumopathie obstructive (BPCO), infarctus du myocarde, insuffisance cardiaque, cardiopathies...) (252-255) (256-258). Mais également sur d'autres pathologies comme le diabète de type 2, les maladies neuro-dégénératives et même l'obésité (259-264) (265-268).

L'OMS estime que plus de 700 000 décès prématurés dans le monde par an peuvent être attribués à la pollution par les particules en suspension dans l'air. Des études récentes ont montré que les émissions de PM sont principalement impliquées dans l'augmentation de l'incidence des pathologies respiratoires et cardiovasculaires comparé aux autres polluants atmosphériques (1).

C'est en 1872 que Robert Angus Smith a publié l'une des premières études liées à la pollution atmosphérique intitulée : « Air and Rain: the Beginnings of a Chemical Climatology ». R.A. Smith est le pionnier des études sur les polluants atmosphériques en tant que composants dangereux de l'air urbain et il a spécifiquement analysé leur présence dans les « pluies acides ».

Le 20^{ème} siècle a été marqué par plusieurs incidents majeurs causés par une pollution atmosphérique aiguë.

-En décembre 1930, dans la vallée de la Meuse en Belgique : entre le 4 et le 5 décembre, 60 décès ont été causés par un épais brouillard. L'enquête sur cet incident environnemental a révélé que l'épais brouillard avait piégé les polluants des cheminées et créé un nuage toxique, qui a stagné au-dessus de la vallée, causant ces décès (269).

-En octobre 1948, une catastrophe environnementale a eu lieu à Donora, en Pennsylvanie. L'incident a causé 20 morts subites. Selon une estimation, de 5 000 à 7 000 personnes (sur 14 000 habitants) sont tombées malades. En plus des 20 décès, il y a eu 400 hospitalisations (270).

-En 1952, un incident environnemental majeur s'est produit dans le Grand Londres. Du 5 au 9 décembre, un épais brouillard chargé de polluants provenant des chauffages et des installations industrielles a presque paralysé la ville entière. Il y a eu une augmentation de 48% de toutes les admissions à l'hôpital et une augmentation de 163% des admissions liées aux maladies respiratoires. Pendant et peu après l'incident, le nombre de décès était significativement élevé. Une analyse rétrospective a montré qu'il y avait près de 12 000 décès de plus entre décembre 1952 et février 1953 (271).

4.1.a Etudes à court terme

Une exposition de quelques heures à quelques jours (exposition aiguë, dite à court terme) à la pollution atmosphérique entraîne des symptômes bien définis comme : une augmentation des symptômes allergiques, crises d'asthme, irritations des voies respiratoires, oculaires et du nez, exacerbation de troubles respiratoires et cardiovasculaires pouvant conduire à une hospitalisation, et, dans les cas les plus graves au décès. Les effets à court terme sont principalement évalués lors d'hospitalisation associées à des pics de pollution en prenant en compte la mortalité.

Différentes études américaines depuis le début des années 90 ont mis en évidence une corrélation entre des taux élevés de PM₁₀ dans l'air et une mortalité journalière en hausse (252, 272, 273). Dans un dizaine de villes américaines, dont Chicago, entre 1988 et 1993, une augmentation de 10 µg/m³ du niveau de PM₁₀ a été associée à des augmentations de 1,27 %, 1,45% et 2,00 % des admissions à l'hôpital pour cardiopathie, BPCO et pneumonie respectivement (274, 275). Une étude européenne (APHEA2) a montré que les PM₁₀ et la fumée noire étaient des facteurs prédictifs de la mort quotidienne dans les zones étudiées lors de pics de pollution. Une augmentation de la concentration atmosphérique de PM₁₀ et de fumée noire (10 µg/m³) a entraîné une augmentation du nombre total de décès quotidiens respectivement de 0,7 % et 0,5 % (276). Il a également été montré que pour chaque augmentation de PM_{2.5} dans l'air ambiant de 5-6 mg/m³, une augmentation de la mortalité due aux maladies

respiratoires (+ 1,5 %) et aux maladies cardiovasculaires (+ 0,8 %) a été constatée (277, 278).

L'exposition à court terme (pic de pollution) à la pollution de l'air a des impacts importants sur la santé, en particulier pour les personnes vulnérables ou sensibles, telles que les femmes enceintes, les nourrissons et jeunes enfants, les personnes de plus de 65 ans, les personnes souffrant de pathologies cardio-vasculaires (insuffisances cardiaques) et respiratoires (asthme et BPCO) mais aussi les personnes se reconnaissant comme sensibles lors des pics de pollution et/ou dont les symptômes apparaissent ou sont amplifiés lors des pics (diabétiques, personnes immunodéprimées, personnes souffrant d'affections neurologiques ou à risque infectieux) (tableau 4) (274, 279).

Population vulnérable	Population sensible
Femmes enceintes, nourrissons et jeunes enfants, personnes de plus de 65 ans, personnes souffrant de pathologies cardio-vasculaires, insuffisants cardiaques ou respiratoires, personnes asthmatiques.	Personnes se reconnaissant comme sensibles lors des pics de pollution et/ou dont les symptômes apparaissent ou sont amplifiés lors des pics (par exemple : personnes diabétiques, personnes immunodéprimées, personnes souffrant d'affections neurologiques ou à risque cardiaque, respiratoire, infectieux).

Tableau 4 : Différence entre une population vulnérable et une population sensible. Par rapport à la population générale, les personnes vulnérables ou sensibles à la pollution de l'air vont présenter plus rapidement ou plus fortement des symptômes suite à une exposition à cette pollution, que ce soit à court terme ou à long terme.

Les effets aigus correspondent souvent à une inflammation des voies respiratoires. Le stress oxydatif est également un des premiers événements déclencheur suite à l'exposition à la pollution atmosphérique (dans les premières 24 h) (280, 281). L'inflammation pulmonaire pourrait entraîner une augmentation de la réponse inflammatoire systémique dans les infarctus du myocarde chez les patients atteints de BPCO (282).

4.1.b Etudes à long terme

Une exposition chronique, dite à long terme, à la pollution de l'air entraîne des effets sur la santé pouvant, dans ce cas, contribuer au développement ou à l'aggravation de maladies chroniques telles que les cancers, les pathologies cardiovasculaires et respiratoires, les troubles neurologiques, les troubles du développement, etc. L'exacerbation de pathologies chroniques qui se traduit par la survenue de symptômes peut conduire à des hospitalisations, voire au décès (253). Les effets à long terme de la pollution atmosphérique sur la mortalité sont étudiés dans des études de cohorte. Ces études couvrent des années d'exposition, comprennent un grand nombre de participants et fournissent des informations sur les effets de la pollution atmosphérique (283). Des

études récentes mettent de plus en plus en évidence les effets indésirables de la pollution atmosphérique chez la femme enceinte (faible poids à la naissance, naissance prématurée...), ainsi que chez l'enfant (maladies respiratoires telles que l'asthme).

Les effets à long terme de la pollution atmosphérique sur la mortalité ont principalement été associés aux concentrations ambiantes de PM_{2.5} (1). Des études au début des années 2000 aux Etats-Unis, ont montré une corrélation entre l'effet à long terme des PM_{2.5} (pour une augmentation de 10 µg/m³) et l'augmentation de la mortalité cardio-pulmonaire (6 %) ainsi que les cancers pulmonaires (8 %) (14).

4.1.c Effets de la pollution sur le système cardiovasculaire

Les particules fines et ultrafines ont l'impact le plus important sur la mortalité cardiovasculaire, comparativement aux particules grossières (284). La composition des particules est aussi un paramètre à prendre en compte, certains résultats montrant que les particules carbonées provenant de sources dérivées de la combustion, telles que la circulation routière, les combustibles fossiles et la combustion du bois sont les plus incriminées dans la toxicité cardiovasculaire (285). Étant donné que la composition chimique des particules ambiantes varie considérablement d'une zone géographique à l'autre, il est difficile d'identifier un ou des composants spécifiques qui provoquent une toxicité cardiovasculaire. Les NPs noires de carbone provenant de processus de combustion incomplète ont été considérées comme un des principaux constituants des PM contribuant aux effets toxiques cardiovasculaires (286, 287).

L'exposition à long terme aux PM_{2.5} est associée à plusieurs pathologies (cancers et maladies respiratoires), cependant, le pourcentage le plus élevé de mortalité est dû aux maladies cardiovasculaires (en particulier aux cardiopathies ischémiques) (estimation regroupée 3 %). Une étude récente a rapporté que 4,2 millions de décès, représentant 7,6 % de la mortalité mondiale totale, sont imputables aux PM_{2.5} ambiantes (288).

L'exposition à court terme à des pics de pollution atmosphérique par les particules ambiantes est associée (résultats cliniques) à des effets vasculaires néfastes qui entraînent des pathologies cardiovasculaires: le syndrome coronarien aigu, les accidents vasculaires cérébraux ischémiques, la thrombose artérielle, l'infarctus du myocarde, la thromboembolie veineuse et à l'arythmie. Les personnes présentant une maladie cardiovasculaire préexistante sont les plus vulnérables (18, 277, 289, 290).

Même si les NPs ne représentent qu'un faible volume de la masse totale de particules dans l'atmosphère, leur très grande surface et leur nombre jouent un rôle important dans leurs effets sur la santé (291, 292). Des études ont montré que les particules fines et les NPs provoquent des arythmies, réduisent la contractilité des myocytes et réduisent le débit sanguin coronarien (293, 294).

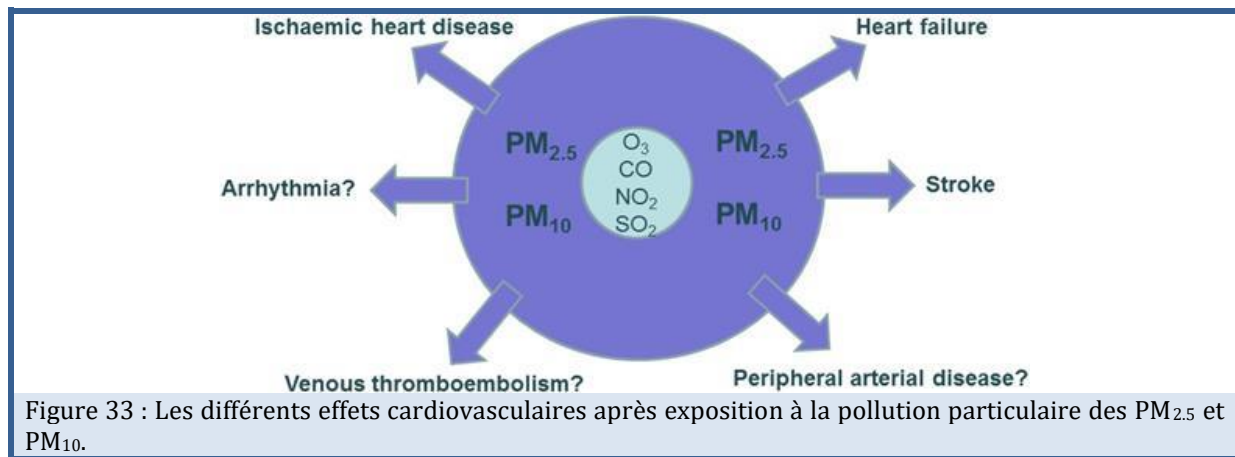
L'exposition à la pollution atmosphérique entraîne des altérations importantes de nombreux indices cardiovasculaires (fig. 33). Certains des effets (modifications de la fréquence cardiaque, variabilité de la fréquence cardiaque, pression sanguine, tonus vasculaire et coagulabilité du sang) se développent de manière aiguë en réponse à l'augmentation des concentrations de particules ambiantes.

- Indices cardiovasculaires:

La tension artérielle : une étude sur 62 patients en réadaptation cardiaque ambulatoire a indiqué que 120 h d'exposition à des niveaux moyens de PM_{2.5} de 10,5 µg/m³ étaient associées à des augmentations des pressions systolique et diastolique au repos de 2,7 et 2,8 mm Hg respectivement. Chez les sujets ayant une fonction cardiaque au repos ≥ 70 battements/min, une exposition de 48h aux concentrations de PM_{2.5} (concentration moyenne de 13,9 µg/m³) a entraîné une augmentation très significative de la pression artérielle moyenne (6,95 mm Hg). Des études humaines ont montré que l'exposition aux particules perturbe la fonction vasculaire et l'hémodynamique systémique, entraînant éventuellement une hypertension. L'augmentation de la pression artérielle contribue à un risque élevé de maladie cardiovasculaire (295).

Le tonus et la réactivité vasculaires: dans une étude visant à étudier les effets des polluants atmosphériques sur la fonction vasculaire humaine, il a été démontré qu'après 2 h d'inhalation de particules ambiantes associées à de l'ozone (environ 150 µg/m³ et 120 ppm, respectivement) les volontaires ont développé une diminution significative du diamètre de l'artère brachiale de 0,09 mm (296). Des niveaux accrus de PM_{2.5} et de particules noires de carbone ont été associés à une diminution de la réactivité vasculaire dépendante de l'endothélium chez les patients atteints de diabète de type II (265).

L'athérosclérose est une maladie touchant les artères de gros et moyen calibres et qui est caractérisée par l'apparition de plaques d'athérome. Dans une étude portant sur 798 patients du bassin de Los Angeles, une augmentation de l'épaisseur de l'intima-média de l'artère carotide de 5,9 % a été observée pour une augmentation de 10 µg/m³ de PM_{2.5} dans l'air ambiant (297).



4.1.d La pollution particulaire et l'hypertension

L'endothélium joue un rôle crucial dans la régulation du débit sanguin coronarien et des fonctions cardiaques, telles que les maladies coronariennes, l'insuffisance cardiaque et l'hypertension (265, 298-301). Les PM sont considérées comme le principal médiateur du dysfonctionnement vasculaire systémique, des études expérimentales suggérant un stress oxydatif et une biodisponibilité réduite du monoxyde d'azote, susceptibles d'être des mécanismes clés (302, 303). Des observations récentes d'une vaste étude réalisée, suggèrent qu'une exposition à long terme aux PM_{2.5}, même à de faibles concentrations aux États-Unis, est associée à un dysfonctionnement endothélial persistant (304).

Tornqvist H. et ses collaborateurs (2007), ont montré que la vasodilatation endothéliale dans les vaisseaux périphériques est très vite altérée après une exposition aux gaz d'échappement de moteurs diesel dilués et peut persister jusqu'à 24 h (74, 305).

Une étude africaine a montré qu'il y aurait un lien de causalité entre une exposition à une pollution de l'air intérieur et le déclenchement de l'hypertension pulmonaire et l'insuffisance cardiaque droite (306). Enfin, une étude, plus récente (2016), a montré qu'une exposition à long terme à la pollution atmosphérique liée au trafic routier pouvait entraîner une augmentation de la pression artérielle et par conséquent augmenter le risque d'hypertension chez les européens (307, 308).

4.1.f Effets de la diminution de la pollution atmosphérique

Plusieurs études épidémiologiques ont analysé les bénéfices en termes d'impacts sanitaires pouvant être observés lorsque les niveaux de pollution diminuent. Ainsi, par exemple, l'interdiction par le gouvernement irlandais de la vente de charbons bitumineux à Dublin en 1990 a provoqué une diminution nette des concentrations de particules, associée à une baisse de plus de 6 % de la mortalité dans les 6 années suivant l'intervention. En Europe, le projet Aphekom a étudié, sur 20 villes, les effets de la

législation de l'UE portant sur la réduction de la teneur en soufre des carburants et a estimé que la réduction conséquente des concentrations atmosphériques en dioxyde de soufre (SO₂) observée suite à cette mesure a permis d'éviter quelques milliers de décès prématurés (309).

D'après le projet européen Aphekom, le dépassement de la valeur guide de l'OMS pour les particules de type PM_{2.5} se traduit chaque année par 19 000 décès prématurés. Si les concentrations moyennes annuelles de PM_{2.5} respectaient la valeur guide de l'OMS (10 µg/m³) l'espérance de vie à 30 ans pourrait augmenter de 3,6 à 7,5 mois selon la ville.

Ces quelques exemples illustrent l'importance des bénéfices sanitaires observés lorsque la qualité de l'air s'améliore.

Par ailleurs, il a été mis en évidence un lien entre la distance par rapport aux grands axes routiers où les concentrations atmosphériques de polluants spécifiques émis par les véhicules sont fortes, et différents effets sanitaires (310, 311):

- Une exacerbation de l'asthme chez l'enfant ; habiter à proximité de grands axes de circulation serait responsable d'environ 15 à 30 % des nouveaux cas d'asthme de l'enfant selon une étude portant sur 10 villes européennes et une étude menée sur l'agglomération parisienne.
- La survenue de symptômes respiratoires non asthmatiques, de troubles de la fonction pulmonaire et de pathologies cardiovasculaires (infarctus aigu du myocarde...).
- Une diminution de la survie des personnes (toutes causes confondues et pour causes cardiovasculaires).

Dans une autre étude observant le rôle de l'exposition aux PM_{2.5} à long terme liée au trafic routier (concentration moyenne de 22,8 µg/m³) chez 4 494 participants, il a été montré qu'une réduction de 50 % de la distance entre la résidence et la route principale entraîne une augmentation de la calcification des artères coronaires.

Fait intéressant, réduire l'exposition aux particules ambiantes à Beijing, où les concentrations atmosphériques sont 5 à 10 fois plus élevées que dans la plupart des villes européennes, diminue la pression artérielle et réduit l'ischémie myocardique induite par l'exercice (82).

Il faut noter que, compte tenu de la formation dans l'atmosphère de polluants, la réduction des émissions de polluants en agissant sur les sources d'émission (transports, chauffage, agriculture...) n'entraîne pas de réduction automatique et proportionnelle des concentrations atmosphériques en polluants. Ainsi, lorsque des actions sont prises pour diminuer les émissions, les impacts sur la qualité de l'air et sur la santé ne sont pas forcément immédiats mais c'est néanmoins le principal levier pour améliorer la qualité de l'air. D'où la nécessité de réduire efficacement et durablement les émissions de polluants.

4.2 Etudes *in vitro* et *in vivo* : mécanismes d'action des particules de la pollution atmosphérique

Différents modèles *in vitro* et *in vivo* ont permis de caractériser les effets toxiques des différentes particules atmosphériques (PM, NPs et particules diesel) et leurs mécanismes d'action. Les travaux de cette thèse ne portent pas sur les particules diesel (DEPs dans la littérature), mais au vue du nombre important d'études publiées, elles seront évoquées dans cette partie. Comme les PM_{2.5}, les DEPs sont des particules complexes avec une taille et une composition chimique variable. Elles sont constituées d'un noyau carboné avec des composés organiques (quinones, HAP...) et des métaux lourds (Fe, Cu, Ni...) adsorbés à leurs surfaces (312). Le stress oxydant et l'inflammation sont considérés comme des mécanismes clés impliqués dans les effets nocifs des particules, mais d'autres perturbations cellulaires sont également induites (313).

4.2.a Internalisation des particules

Les membranes plasmiques sont une des premières cibles cellulaires des NPs, pour entrer dans les cellules. La membrane plasmique des cellules contient des micro-domaines enrichis en protéines, des lipides (phospholipides, les glycolipides et le cholestérol) et des glucides qui forment des radeaux lipidiques. Ces derniers assurent de nombreuses fonctions, et notamment agissent sur la fluidité membranaire et sur le trafic des protéines membranaires. Ces radeaux sont également importants pour l'adhésion des cellules à la matrice extracellulaire (MEC) et la liaison du cytosquelette à la membrane plasmique. De plus, il y a de nombreux récepteurs membranaires présents à la membrane qui sont impliqués dans l'initiation de cascades de signalisations intracellulaires.

Les particules sont internalisées selon différents mécanismes (fig. 34). Il existe deux grands mécanismes d'internalisation (314):

- La phagocytose (internalisation de grosses particules > 1 µm de diamètre)
- La pinocytose (internalisation de solutés comme les particules nanométriques)

- La phagocytose

La phagocytose est un mécanisme d'internalisation présent dans la majorité des types cellulaires mais, particulièrement dans les cellules phagocytaires (macrophages et monocytes, les neutrophiles et les cellules dendritiques). C'est une voie endocytaire qui dépend de l'actine du cytosquelette et qui est initiée par l'interaction entre un récepteur du phagocyte et un ligand à la surface de la particule internalisée. C'est un mécanisme pouvant être à l'origine de la formation de pseudopodes (extensions cytoplasmiques) afin d'envelopper les particules (taille > 0.5 µm). La phagocytose a un rôle de défense des cellules, cependant lorsque la particule est trop grosse ou a une forme complexe à

phagocytose (nanofibres ou nanotubes) ce mécanisme peut conduire à des réactions d'inflammation, de stress oxydant ou d'apoptose.

- La pinocytose

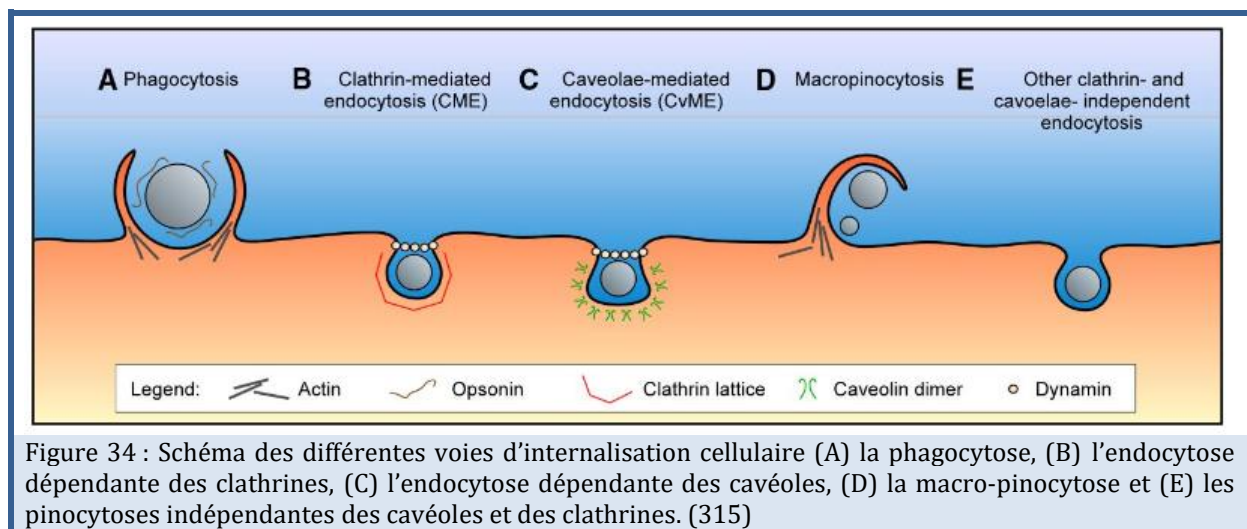
La pinocytose est présente dans tous les types cellulaires. Il existe au moins quatre mécanismes différents :

-la macro-pinocytose, non spécifique et formant de larges vésicules d'environ 1 μm de diamètre

-l'endocytose médiée par les clathrines

-l'endocytose médiée par les cavéoles. Pour ces dernières, les vésicules sont formées au niveau de la membrane et ont un diamètre $< 0,1\mu\text{m}$

-l'endocytose indépendante de la clathrine et des cavéoles, qui induit également la formation de petites vésicules et se produit en continu dans la cellule.



De nombreuses études ont montré que les voies d'internalisation dépendent des propriétés physico-chimiques des nanoparticules ainsi que du type cellulaire (316). Pour des NPs d'environ 100 nm, les mécanismes d'internalisation sont différents en fonction du type cellulaire :

-La phagocytose a été observée dans des macrophages pour des NPs de gadolinium (Gd) de 100 nm (317).

-L'endocytose dépendante de la clathrine a été observée dans les cellules mésenchymateuses pour des NPs d'argent (Ag) de 80 nm (318).

-L'endocytose dépendante des cavéoles a été observée dans des cellules endothéliales humaines pour différents types de NPs de 100 nm (319, 320).

-La pinocytose a été observée dans des cellules HeLa pour des particules de polystyrène de 113 nm (321).

Dans les cellules endothéliales, la voie de l'endocytose semble être un processus dépendant de la taille des particules. Les NPs de taille de 20 nm seraient internalisées

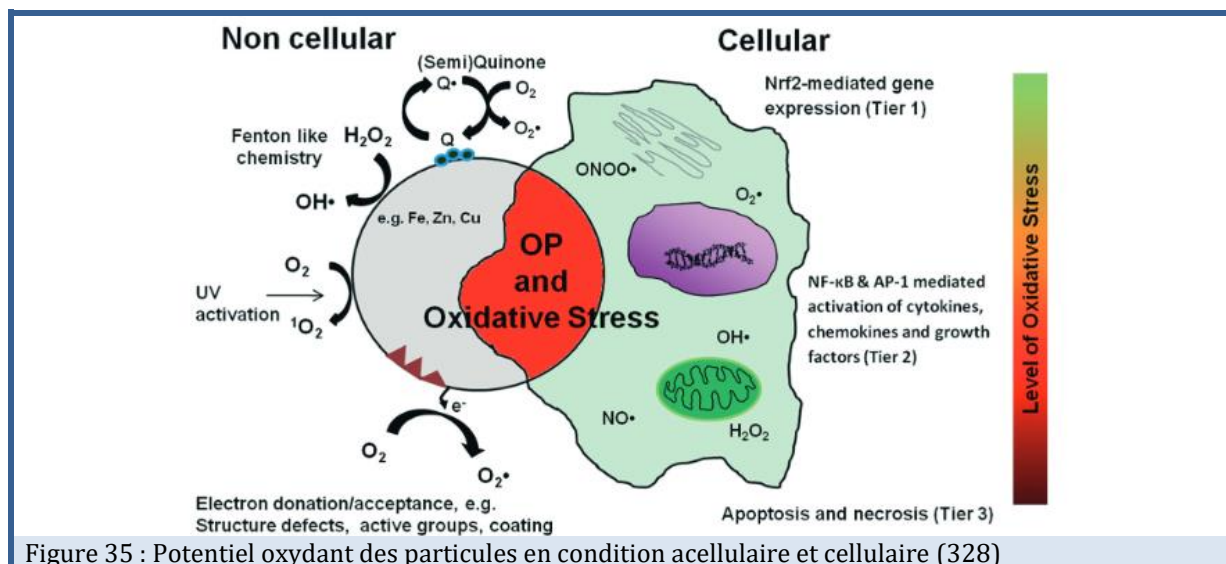
par l'endocytose dépendante des cavéoles, et les NPs de 40 nm par l'endocytose dépendante des clathrines ou par macropinocytose (320).

Les interactions, entre les membranes plasmiques des cellules et les particules, peuvent affecter la localisation de celles-ci, leur trafic intracellulaire, leur compartimentation et leur rétention cellulaire. Des observations au microscope électronique à transmission (MET) ont montré que dans des cellules épithéliales alvéolaires (A549), après 3 h d'exposition avec des PM_{2.5} (10 µg/cm²), les particules sont retrouvées au niveau de la membrane des cellules, et après 6 h et 24 h d'exposition, des agrégats de particules sont retrouvés dans des vésicules ou libres dans le cytoplasme ainsi que dans les mitochondries (322).

4.2.b Les particules et le stress oxydant

Une production élevée d'ERO conduit à de nombreuses perturbations de l'homéostasie intracellulaire. Les trois principales cibles cellulaires des ERO sont l'ADN, les lipides membranaires et les protéines. En effet, elles sont capables d'interagir avec les macromolécules intracellulaires entraînant des dysfonctions cellulaires comme la peroxydation lipidique (oxydation des acides gras polyinsaturés constitutifs des membranes cellulaires), la modification des protéines (perturbation des activités enzymatiques, oxydation massive et irréversible des protéines...) et l'oxydation de l'ADN (formation de bases oxydées de l'ADN, comme le 8-OH-dG, etc.). Les ERO peuvent également causer des dommages au niveau de différents organites (réticulum endoplasmique, mitochondries...), des perturbations au niveau du cycle cellulaire et la mort cellulaire (323-326).

Les particules atmosphériques, en raison de leur taille et de leur composition chimique, ont un fort potentiel oxydant et sont capables d'initier des réactions de cycles rédox et/ou de produire des ERO dans des solutions physiologiques (milieu de culture) et dans un environnement biologique (cellules et tissus) (fig. 35) (327, 328). Plusieurs études ont montré la capacité des particules à produire de manière intrinsèque des ERO dans différents milieux acellulaires (eau, milieu de culture cellulaire) (329-331). De plus, des études ont montré que l'exposition de cellules humaines à des PM et à des NPs conduisait à la surproduction d'ERO (332-334).



Les particules peuvent donc induire un stress oxydatif dans les cellules par différents mécanismes (335): (i) génération intrinsèque d'ERO en raison de leurs propriétés physico-chimiques, (ii) génération indirecte d'ERO et d'espèces radicalaires azotées (ERA).

La production d'ERO peut dépendre des caractéristiques intrinsèques physico-chimiques des particules (PM et NPs), à savoir la surface/taille des particules, ainsi que leur composition en métaux et fractions organiques.

- Production d'ERO et la taille des particules:

La toxicité des particules ne dépend pas exclusivement de leurs propriétés physico-chimiques mais également de leur diamètre aérodynamique (336). Plus le diamètre des particules est petit, plus le nombre de particules collectées par unité de masse est important et plus la réactivité de surface est importante. Les NPs, en raison de leur petite taille, ont une plus grande réactivité de surface que les PM, ce qui les rend plus réactive vis-à-vis de l'organisme (313, 337-339). En effet, lors de l'internalisation des NPs, ces dernières peuvent également modifier l'organisation de la membrane plasmique par interaction avec les protéines liées à la membrane. Ainsi, la liaison des NPs à la NADPH-oxydase (NOX) réduite conduit à la génération d'ERO et à des modifications intracellulaires (340-343).

- Production d'ERO et la composition chimique des particules:

La toxicité des particules peut dépendre des composés adsorbés à leur surface (métaux, quinones, HAP...) (336) qui peuvent présenter des interactions additives ou synergiques avec la surface des particules (344, 345). En fonction de leurs caractéristiques physico-chimiques, les particules vont produire plus ou moins d'ERO.

Les principaux métaux de transition adsorbés sur les PM sont le Fe, le Cu, le Cr et le Vanadium (V). Ces métaux sont capables de produire des ERO très réactifs (OH[·]), notamment via la réaction de Fenton (346).

Par ailleurs, la métabolisation des composés organiques tels que les quinones, les HAP ou les COV s'accompagne de la production d'ERO et la génération de métabolites électrophiles susceptibles de dépléter le glutathion, principal acteur de la défense anti-oxydante (347, 348).

Il a été montré qu'au niveau pulmonaire, les composés organiques, le benzène inclus, sont associés au stress oxydant et la peroxydation des lipides dans les macrophages alvéolaires (349). Concernant les particules plus fines, des études ont montré que des NPs de même taille mais possédant des compositions différentes (noires de carbone, titane...) peuvent entraîner des niveaux de stress oxydant différents (350-354).

Le stress oxydant peut également avoir un rôle dans la diminution de la biodisponibilité de NO et la production de peroxy-nitrites.

- La voie du NO, production de peroxy-nitrites:

Les études divergent en ce qui concerne les effets des particules sur la production de NO. Certaines études montrent une augmentation de la production du NO. Une augmentation significative de la production d'ERO et de NO est observée, notamment, dans des HUVEC après exposition avec des NPs TiO₂ (5 à 40 µg/cm²) (355), dans des cellules endothéliales humaines après exposition avec des NPs de silice (Si) (12.5 à 100 µg/ml) (356), avec des NPs ZnO (20 - 150 µg/ml) (357) et avec des PM_{2.5} (20- 50 µg/ml) (358). Certaines études, au contraire, montrent une diminution significative de la teneur en NO suite à l'exposition de cellules endothéliales aortiques humaines avec des PUF (359). De plus, des études *in vivo* montrent une diminution de la biodisponibilité en NO, dans la paroi microvasculaire de rats après exposition avec des TiO₂ (360). Enfin des études *ex-vivo*, chez des rongeurs, ont montré que l'exposition aux PM_{2.5} et à des NPs noire de carbone diminue la relaxation dépendante du NO dans les artères systémiques et intrapulmonaires (4, 6, 361, 362).

Les perturbations observées concernant les taux de NO cellulaires, après exposition des cellules avec les particules, peuvent dépendre de plusieurs mécanismes (augmentation de l'expression et activation de la iNOS, découplage de la eNOS et formation de peroxy-nitrites).

Ces modifications de la teneur en NO après exposition de cellules avec les particules peuvent s'expliquer par une dérégulation de l'expression des NO synthases. En effet, il a été observé une augmentation du taux d'ARNm de la iNOS et une diminution du taux d'expression de l'ARNm de la eNOS dans les cœurs (isolés) de rats exposés pendant 2 jours aux PM₁₀ par rapport aux témoins (363). De plus une augmentation de l'expression de la iNOS a également été observée sur des cœurs (isolés) de rats exposés avec des NPs d'argent (Ag) (0,1 et 1 µg/ml) (364). Certains auteurs ont montré une augmentation de

l'activité de la iNOS dans des HUVEC exposées à des NPs noires de carbone (10 et 100 µg/ml) ainsi qu'une augmentation de l'ARN de la iNOS suite à l'exposition avec des NPs de silice (Si) (12.5 à 100 µg/ml) (302, 365, 366).

Par ailleurs, des études *in vivo*, ont montré des altérations de la biodisponibilité du NO dans des veines mésentériques de rat, dans des aortes et dans des artérioles de muscles squelettiques après exposition avec des PM (302, 367, 368). Ces altérations seraient dues au découplage de la eNOS qui produirait des ERO plutôt que du NO. Le découplage de la eNOS se traduirait par une diminution des taux de tétrahydrobioptérine (BH4) endogènes après exposition aux particules.

Enfin, de nombreuses études, ont montré que la production de NO et d'ERO (O_2^-) était associée à une augmentation des taux de peroxy-nitrites entraînant de nombreux dommages cellulaires (230).

Une telle altération de la voie du NO dans la circulation pulmonaire peut favoriser la vasoconstriction, le remodelage et la thrombose, tout en augmentant la résistance artérielle, ce qui peut avoir un impact négatif sur la fonction cardiaque (4). La diminution de la biodisponibilité du NO ainsi que la formation de peroxy-nitrites induits par les particules seraient donc des mécanismes responsables de la dysfonction endothéliale. L'exposition aux particules pourrait donc altérer l'homéostasie vasculaire.

- Le calcium intracellulaire:

Une surproduction des ERO, telles que l' H_2O_2 , suite à l'exposition aiguë ou chronique avec des particules, peut induire une élévation du calcium intracellulaire dans divers types cellulaires (macrophages alvéolaires, HUVEC, cellules épithéliales bronchiques humaines, monocytes humains) (369-373).

L'augmentation de calcium peut provenir de source extracellulaire et/ ou de sources intracellulaires. Plusieurs études ont montré que suite à l'exposition aux particules atmosphériques, l'augmentation de calcium intracellulaire proviendrait des stocks intracellulaires. Différents mécanismes ont été observés :

- Une diminution de l'activité de la Ca^{2+} -ATPase au niveau du RE, dans les cœurs de rats exposés aux $PM_{2.5}$ (374),
- Une altération des pompes SERCA dans des homogénats de cœur entier de souris exposées aux $PM_{2.5}$ comparé aux souris contrôles (375),
- Une réduction de l'activité des pompes SERCA au niveau du RE dans les cardiomyocytes de rats adultes (376),
- Une l'altération de la voie IP_3 dans des HUVEC (373).

D'autres études ont, néanmoins, montré que l'augmentation de calcium intracellulaire observée proviendrait du milieu extracellulaire. Les différents mécanismes observés sont :

-Une altération de la membrane plasmique en diminuant l'activité des canaux du type Na^+/K^+ -ATPase et $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -ATPase, dans des macrophages alvéolaires de rat exposés à des $\text{PM}_{2.5}$ et dans des macrophages alvéolaires de rat et des monocytes sanguins humains exposés à des NPs de carbone (12 à 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$),

-Une ouverture des canaux calciques de la membrane plasmique (372, 377).

Cependant, une autre étude a également montré que l'augmentation de calcium observée dans les CML d'artère pulmonaire de rat après exposition à des NPs SiO_2 (1 à 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$) proviendrait de sources de calcium extracellulaire et intracellulaire (378).

Un des mécanismes qui pourrait expliquer l'altération de l'homéostasie calcique perturbée, via le stress oxydant, est l'affinité entre les ERO (H_2O_2 et $\text{O}^{\cdot-}$) et les protéines contenant des résidus de cystéine. Les résidus de cystéine sont particulièrement sensibles aux réactions redox dues à la présence de radicaux sulfhydryles qui peuvent être convertis en thiolates ($\text{R-S}^{\cdot-}$), un radical hautement nucléophile. En raison de ses propriétés physicochimiques, le thiolate peut facilement réagir avec les oxydants dans le microenvironnement protéique, de manière réversible ou irréversible, et donc altérer la fonction protéique (379). De nombreuses protéines présentes dans les tissus de mammifères possèdent dans leur structure des cystéines, y compris des facteurs de transcription tels que le facteur nucléaire κB (NF- κB), les myofilaments, les protéines kinases et les canaux à la membrane (canaux calciques tels que $\text{Ca}^{2+} / \text{K}^+$ dépendants et les canaux TRP (218, 380-383).

En résumé, l'exposition aux particules entraîne des perturbations de l'homéostasie calcique. Cependant, les mécanismes semblent différents selon le type de particules et le type de cellule étudié. Il est important de noter l'absence d'étude sur les NPs noires de carbone sur la signalisation calcique dans des cellules endothéliales d'artère pulmonaire humaine.

Les altérations de l'homéostasie calcique peuvent être à l'origine de processus de stress au niveau du RE.

- Le RE:

Le stress oxydant est considéré comme un initiateur et un contributeur au stress du RE (384, 385) et à l'autophagie (386). Le stress du RE peut se produire suite à une perturbation de l'homéostasie calcique, suite à des lésions par oxydations protéiques sur les membranes du RE, ou à un signal de stress (UPR) lié à l'accumulation de protéines mal repliées dans le RE (387).

Plusieurs études ont montré que suite à l'exposition avec des PM_{2.5}, des perturbations au niveau du RE ont été observées, associées au stress oxydant généré par les particules ou par l'activation du signal UPR. Par exemple, des études ont observé le signal UPR et une apoptose liée au stress du RE après exposition à des PM_{2.5} dans des tissus adipeux, sur des cellules épithéliales alvéolaires de type II (cellules AEC II), dans des cellules épithéliales bronchiques humaines BEAS-2B et des HUVEC (388-391). D'autres études ont montré que certaines NPs (Si, TiO₂, ZnO, Au) induisent un stress du RE associé au signal UPR dans les cellules endothéliales, dans des HUVECS, dans des macrophages, des cellules endothéliales du cerveau, respectivement (392-396).

Le RE, est un organite qui peut donc être une cible des particules.

- La mitochondrie:

Les mitochondries peuvent également être la cible des particules. Les altérations mitochondriales sont considérées comme un des événements clés dans la cytotoxicité induite par les particules, ce qui peut conduire à la génération d'ERO, en particulier l'anion superoxyde (397). Le dysfonctionnement mitochondrial pourrait résulter d'une interférence directe des particules avec les structures mitochondriales ou indirecte causée par la génération d'ERO cytosoliques (398-400). Cependant, les études actuelles sur la relation entre les particules fines/ultrafines et les mitochondries sont limitées et nécessitent une évaluation plus approfondie.

Dans les cellules HUVEC et également dans des cellules endothéliales aortiques humaines (HAEC), la dysfonction mitochondriale observée se traduit par un stress oxydant mitochondrial (surproduction d'O₂⁻), après exposition avec des PM_{2.5}, des particules DEP, des NPs TiO₂ ou des PUF de diesel (352, 401-403). Ces effets s'expliqueraient pour les DEP et les PM_{2.5}, par la présence de composés adsorbés à la surface de ces particules, tels que les quinones et les HAP, qui perturberaient le pore de transition de perméabilité (PTP) mitochondrial via leur capacité à induire la production d'O₂⁻ mitochondrial. Ce qui déclencherait des effets dépolarisants sur la membrane interne.

Une autre caractéristique de la dysfonction mitochondriale est une perturbation du potentiel de membrane mitochondrial (PMM). Des études ont montré qu'il y a une diminution du PMM dans des cellules épithéliales bronchiques humaines (BEAS-2B) exposées aux PM_{2.5} (où une diminution du nombre de copies de l'ADN mitochondrial a aussi été observée) (404), mais également dans les cellules hépatique (HepG2), lieu de détoxification, exposées à des NPs d'oxyde de Zinc (ZnO), d'oxyde de cuivre (CuO) et des NPs d'argent (Ag) (405-407).

Des études ont également montré que les particules pouvaient induire une altération du calcium mitochondrial. En effet, une étude a montré une diminution du taux de calcium mitochondrial dans des cellules bronchiques épithéliales humaines (16HBE14o)

exposées avec des NPs TiO₂. Cependant, une autre étude a montré une augmentation du taux de calcium mitochondrial dans des cellules hépatique et de fibroblastes (V79-4) humains exposés avec des NPs Ag (408, 409).

Les particules peuvent donc entraîner un dysfonctionnement mitochondrial, avec une surproduction d'O₂⁻, une dépolarisation du PMM et une perturbation de la signalisation calcique, mais elles peuvent également entraîner des altérations de la biogénèse et de la dynamique mitochondriale (410, 411). L'ensemble de ces altérations peut varier en fonction du type cellulaire et de la nature physico-chimique des particules.

Il a également été observé *in vivo*, des altérations de la morphologie mitochondriale (gonflement) avec une dérégulation de l'expression des gènes de fission/fusion mitochondriales dans les cœurs de rats qui ont été exposés avec des PM_{2.5} (374).

En revanche, il y a très peu d'étude sur la biogénèse des mitochondries après exposition à des NPs. Une étude très récente (2018) a évalué l'effet de NPs de silice (Si) sur les perturbations mitochondriales et particulièrement sur la dynamique et la biogénèse mitochondriale dans des HUVEC. La dynamique mitochondriale est perturbée après 24h d'exposition avec ces NPs (50 µg/ml), caractérisée par un phénotype de fission (observation au MET) (412).

Une meilleure compréhension, des mécanismes responsables des altérations mitochondriales induites par les particules atmosphériques, est donc essentielle afin de mieux caractériser les mécanismes d'action toxique des PM. La production du stress oxydant générée par les particules peut donc provenir de différentes sources cellulaires (fig. 36) (196).

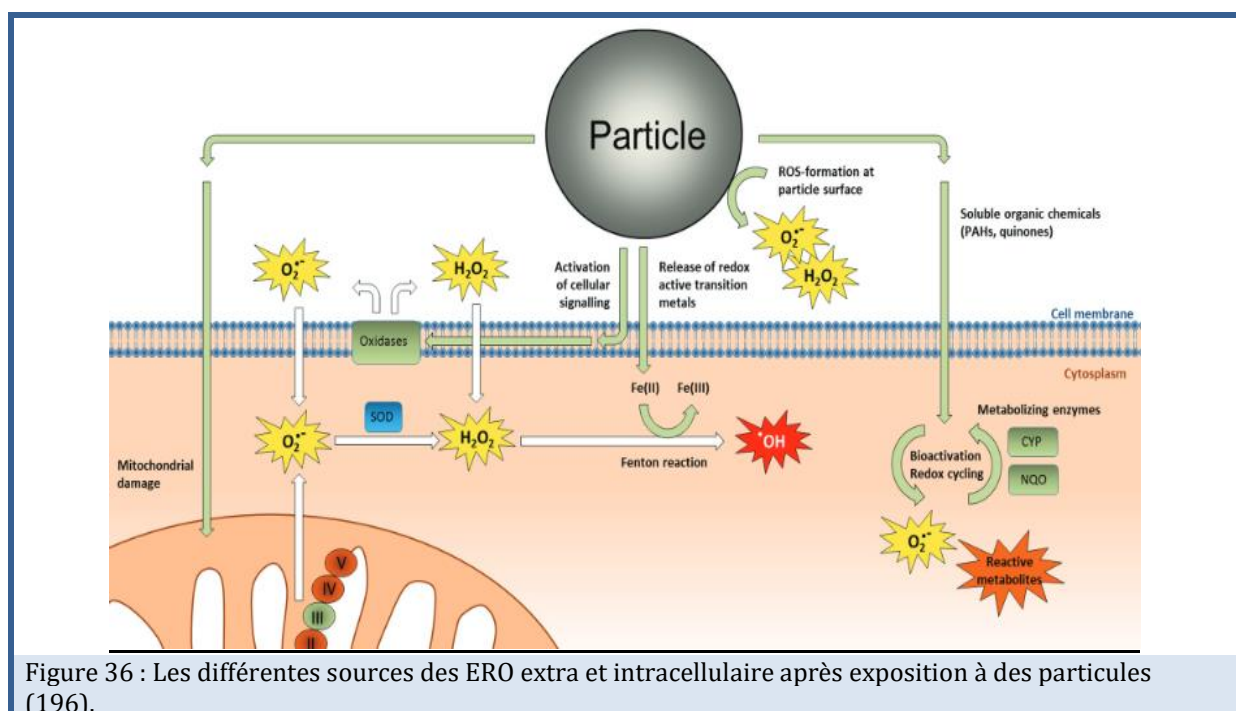
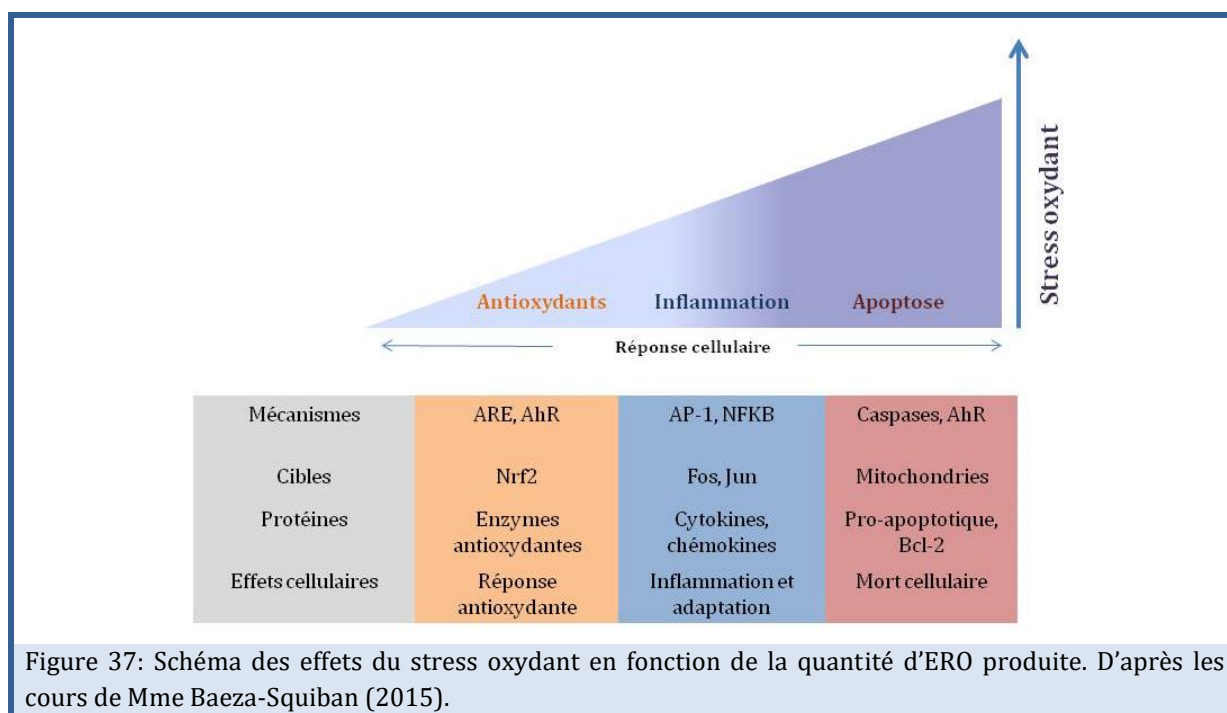


Figure 36 : Les différentes sources des ERO extra et intracellulaire après exposition à des particules (196).

Selon l'intensité du stress oxydant, les réponses cellulaires et moléculaires vont varier (fig. 37). Lors d'un stress oxydant faible, la cellule répond par l'activation de son système de défense (dont la surexpression des gènes codant pour les enzymes de détoxication qui sont contrôlés par le facteur de transcription Nrf2). Pour un stress oxydant intermédiaire, la cellule active d'autres voies de signalisation impliquées dans la réponse pro-inflammatoire (comme les facteurs de transcription NF- κ B et AP-1). Quand le niveau de stress oxydant est trop élevé, différents dommages cellulaires peuvent se produire (lésion oxydatives, lipoperoxydation, génotoxicité, adduits aux protéines,) qui conduisent à la mort cellulaire par apoptose (413, 414).



4.2.c Les particules et la réponse pro-inflammatoire

Bien que les mécanismes, impliqués dans les perturbations cellulaires induites par les particules, soient complexes et non totalement élucidés, il a été démontré que le stress oxydatif est largement impliqué dans la réponse pro-inflammatoire après l'exposition des cellules avec des particules (326, 415, 416). En effet, les médiateurs inflammatoires induits par les particules atmosphériques sont majoritairement régulés par des facteurs de transcription sensibles au statut redox de la cellule, tels que NF- κ B et AP-1 (fig. 38) (401, 417, 418). D'après les études *in vitro* et *in vivo*, les deux principaux marqueurs de la réponse pro-inflammatoire, induits par les PM et les DEP, sont la sécrétion des médiateurs de l'inflammation tels que les interleukines IL-6, IL-8, IL-13, IL-1 β et le TNF- α (419, 420), ainsi que l'augmentation de la production des molécules d'adhésions telles que ICAM-1, PCAM-1, VCAM-1 et la E-selectine, qui permettent l'adhésion des monocytes sur l'endothélium vasculaire (421-423).

Comme pour le stress oxydant, la réponse inflammatoire semble dépendre de la taille des particules (PM et NPs) et des composés adsorbés à leur surface (341).

- Influence de la taille des particules sur la réponse pro-inflammatoire:

Les particules provenant de la combustion incomplète (DEP, noire de carbone...) ont une grande réactivité de surface et déclencheraient, à elles seules, une inflammation pulmonaire (69). Certaines NPs (TiO_2 , SiO_2) déclenchent une réponse pro-inflammatoire plus importante que celle observée avec des particules plus grosses (176, 424-426). Une étude *in vivo*, sur des rongeurs, montre que les NPs provoquent une réponse inflammatoire supérieure à celle observée avec des particules plus grosses, pour une même masse donnée (427).

- Influence des composés adsorbés à la surface des particules sur la réponse pro-inflammatoire:

Des études ont montré que la teneur en composants organiques adsorbés sur les noyaux des PM peut être déterminante sur les effets pro-inflammatoires observés (358, 428, 429). Le stress oxydatif induit par les métaux de transition adsorbés à la surface des PM affecte par la suite le système immunitaire en provoquant des lésions pulmonaires (attirant des neutrophiles) et la libération de médiateurs inflammatoires dans les cellules épithéliales pulmonaires humaines (430, 431). Une étude a montré que les PM constituées d'une quantité importante d'HAP et une quantité faible en métaux étaient plus cytotoxiques et entraînaient une sécrétion plus importante de médiateurs pro-inflammatoires dans les cellules épithéliales bronchiques que les PM comportant une faible quantité d'HAP à leur surface (432). Par ailleurs, la réponse pro-inflammatoire peut être liée, également à la présence d'endotoxines à la surface des particules. Les endotoxines sont des lipopolysaccharides (LPS) présents dans la membrane externe de la plupart des bactéries à GRAM négatif et des cyanobactéries. Ces petits fragments bactériens peuvent se retrouver adsorbés sur les PM et sont également mis en cause dans les effets cytotoxiques et dans l'inflammation (433, 434).

La réponse pro-inflammatoire sera également différente pour des NPs de même taille (environ 14 nm), selon leur nature chimique. Des NPs de carbone ont un potentiel oxydatif plus important que des NPs TiO_2 et vont donc induire une réponse pro inflammatoire plus importante (435). Ces résultats peuvent s'expliquer en partie par une capacité intrinsèque à produire des ERO en milieu acellulaire plus importante comparé aux NPs TiO_2 (436).

Plusieurs études ont montré que les $\text{PM}_{2.5}$ augmentent la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires comme les $\text{IL-1}\beta$, IL-6 , IL-8 et le $\text{TNF-}\alpha$ de manière dose-dépendante et temps-dépendant dans des macrophages, des cellules épithéliales et des cellules endothéliales (15, 437-440). Par ailleurs, l'inhalation de faibles doses de NPs carbonées peut provoquer une inflammation pulmonaire chez les rongeurs dès une exposition de 6 heures (IL-6) et provoquer un afflux de neutrophiles dans les poumons (289, 441). Ces

études suggèrent que les réponses inflammatoires pulmonaires et systémiques induites par les particules atmosphériques contribuent aux altérations vasculaires associées à leur exposition (442).

La réponse pro-inflammatoire observée dans les cellules endothéliales, suite à l'exposition avec des particules atmosphériques peut s'expliquer par différents mécanismes (428) :

-La libération de médiateurs pro-inflammatoires (réponse inflammatoire locale), par les macrophages ou les cellules épithéliales pulmonaires bronchiques, qui pourraient se retrouver en contact avec les CE après passage dans la circulation sanguine au niveau de la barrière capillo-alvéolaire.

Des modèles de milieux conditionnés ou de co-culture ont été développés pour étudier ces effets (443-445).

-Par contact direct des particules ou des composés solubles adsorbés à leur surface avec les cellules endothéliales. En effet, il a été montré que les particules, les plus fines et en particulier les NPs peuvent être transloquées dans la circulation sanguine et atteindre la circulation pulmonaire et notamment les CE (68, 401, 446).

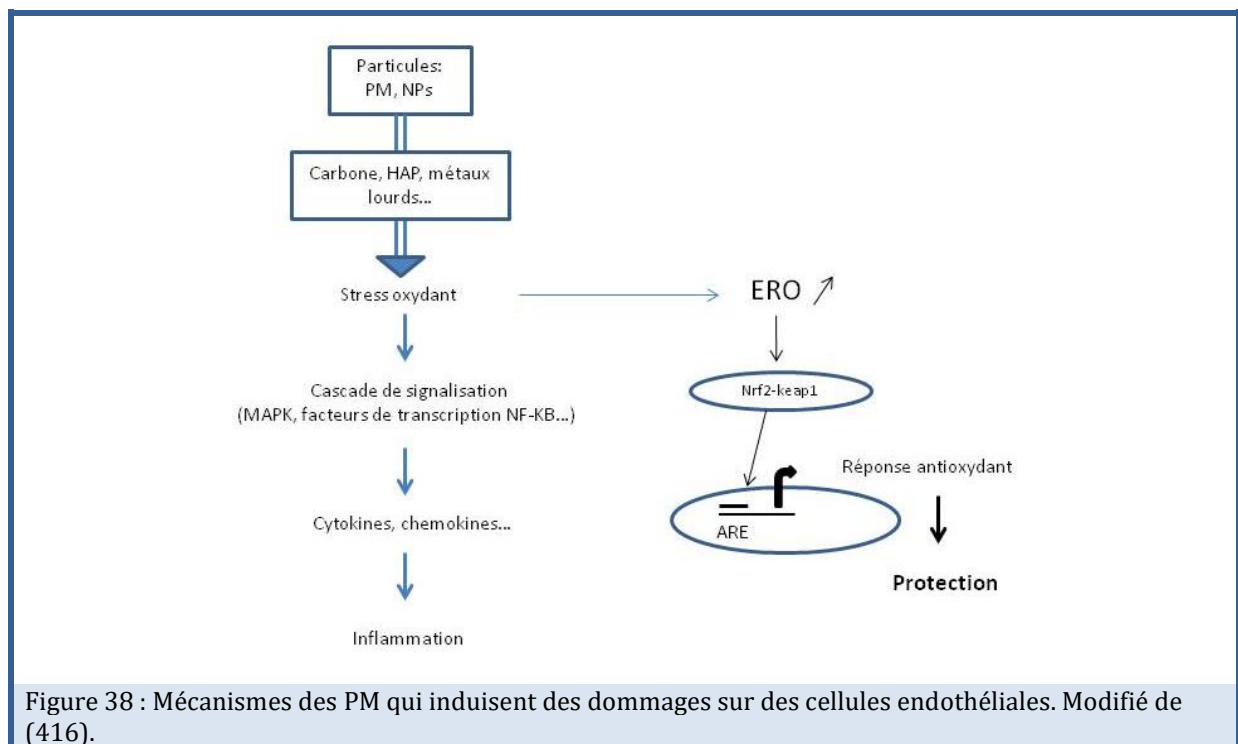


Figure 38 : Mécanismes des PM qui induisent des dommages sur des cellules endothéliales. Modifié de (416).

Les particules peuvent également induire, au niveau cellulaire d'autres effets cytotoxiques médiés par le stress oxydant.

4.2.d Les particules et l'apoptose

L'apoptose, ou mort cellulaire programmée, est impliquée dans des processus physiologiques distincts, notamment la morphogenèse, le développement et la sénescence des organes et des tissus (447). Certains facteurs de stress environnementaux (pesticides, polluants, xénobiotiques) sont connus pour induire la mort cellulaire par apoptose et contribuer à diverses pathologies (448). La production d'ERO et la sécrétion de cytokines inflammatoires peuvent induire la mort cellulaire par apoptose (426, 449, 450).

Il existe deux voies principales initiatrices de l'apoptose:

- La voie extrinsèque médiée par les récepteurs de la mort à la surface de la cellule (protéines transmembranaires) (451, 452).
- La voie intrinsèque médiée par les mitochondries (453-457).

Il est devenu évident qu'il existe une diaphonie complexe et étroite entre les différentes voies apoptotiques.

Récemment, il a été décrit que le stress du RE pouvait être considéré comme une troisième voie de l'apoptose (458).

Certaines études ont montré que les particules (PM_{2.5}, PM₁₀) n'induisaient pas de mort cellulaire apparente dans les cellules épithéliales pulmonaires, en raison d'un phénomène de prolifération cellulaire qui se produirait simultanément (459-463). Cependant, d'autres études ont montré une augmentation des mécanismes de mort cellulaire apoptotique dans des cellules épithéliales alvéolaires exposées avec des PM_{2.5} (389, 464).

Des études ont montré que la toxicité des particules entraînant l'apoptose, était principalement médiée par la voie intrinsèque. L'apoptose est induite par la voie mitochondriale dans les cellules épithéliales bronchiques (16HBE-14o) après exposition avec des NPs de carbone. La voie mitochondriale est mise en cause dans les cellules épithéliales pulmonaires et des HUVEC après exposition avec des NPs, telles que les TiO₂, CuO et ZnO (400, 406, 465).

Cependant, parfois l'apoptose peut être médiée par la voie extrinsèque. La mort cellulaire est induite par une déstabilisation de la membrane lysosomale et par peroxydation lipidique dans les cellules épithéliales bronchiques pulmonaires exposées avec les NPs TiO₂. L'activation de la voie extrinsèque a également été observée dans des macrophages et des cellules épithéliales pulmonaires exposés avec des PM (466, 467).

Par ailleurs, certaines études ont montré que l'apoptose est induite par la voie intrinsèque et par la voie extrinsèque dans les cellules épithéliales pulmonaires et dans des HAEC exposées avec des NPs ZnO et des PM_{2.5} (357, 468).

Différents mécanismes ont été observés :

- Une étude a montré, dans les cellules épithéliales pulmonaires humaines, que les ERO produites par les PM_{2.5} induiraient une diminution du PMM qui entrainerait à la fois à l'apoptose et à l'autophagie (467),
- Une étude a montré, dans des CE, que des DEP et des NPs ZnO induisent la génération d'O[•]₂⁻ mitochondrial, qui conduit à une déplétion d'ATP suivie d'une dépolarisation du cytosquelette d'actine, tout cela conduisant à l'apoptose (401, 469),
- Une autre étude a montré, des cellules épithéliales des voies aériennes (SAEC), que ce serait la surcharge en calcium via les canaux TRPV1 qui induirait l'apoptose suite à l'exposition de PM (470).

En résumé, l'intensité du stress oxydatif semble jouer un rôle majeur dans la voie initiatrice de la mort cellulaire (471). L'hétérogénéité des mécanismes peut être lié au type cellulaire utilisé, aux conditions de culture, aux caractéristiques des particules (taille, composition physico-chimiques, concentration) et au temps d'exposition. Tous ces paramètres vont influencer la réactivité et la toxicité des particules vis-à-vis de l'organisme (472, 473).

Les personnes atteintes d'hypertension pulmonaire pourraient donc être plus sensibles à la pollution particulaire. Des études ont montré une corrélation épidémiologique et clinique, en revanche les mécanismes d'action toxique des particules sur les cibles vasculaires humaines sont peu décrits dans la littérature. Et en particulier les effets de PM_{2.5} et de NPs FW2 sur les cellules cibles endothéliales humaines. Il n'y a également peu d'études sur les effets de ces particules sur la signalisation calcique dans les cellules endothéliales, le calcium ayant un rôle clé dans la régulation du tonus vasculaire.

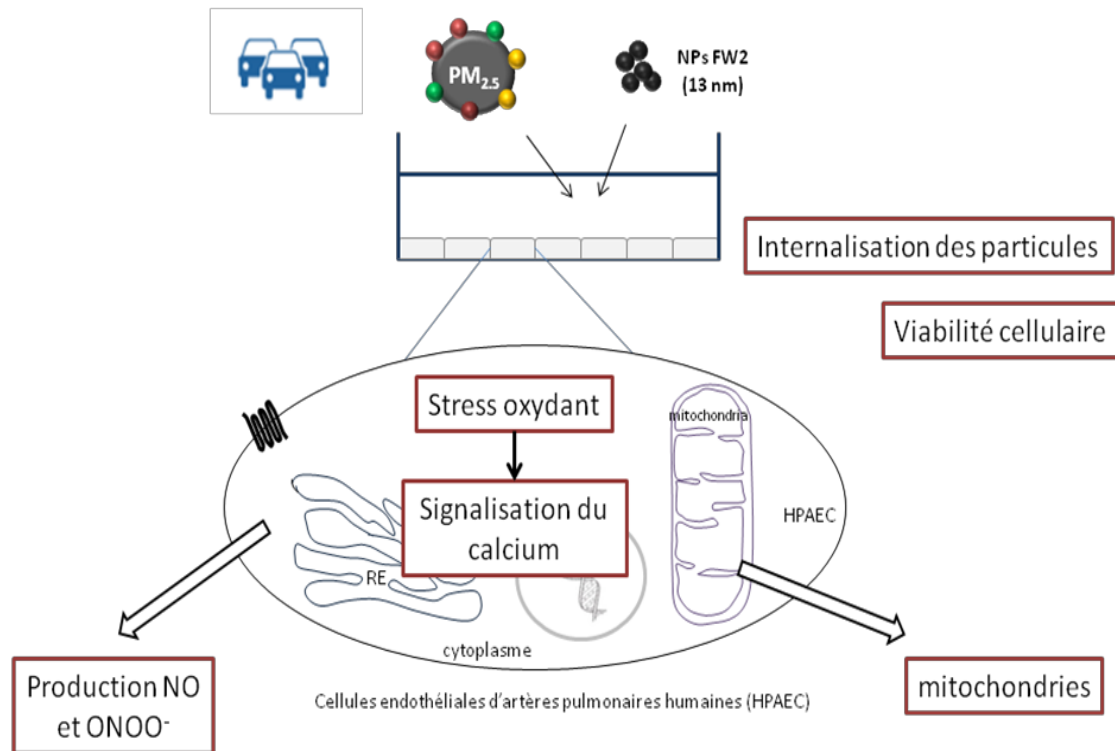
Objectifs

Dans ce contexte, l'objectif principal de ce travail de thèse est d'étudier l'implication de la pollution particulaire, dans le déclenchement et/ou l'exacerbation de l'HTP. Nous avons choisi deux types de particules, d'une part des PM_{2.5} prélevées dans l'atmosphère, à proximité d'un axe routier et, d'autre part, des NPs de composition physico-chimique connue (NPs carbonée 13 nm de diamètre) que l'on peut retrouver également dans l'atmosphère à proximité du trafic routier.

Pour répondre à cet objectif, nous avons développé deux axes de recherche visant, d'une part, à mieux caractériser les mécanismes à l'origine d'effets biologiques induits par les PM_{2.5} et les NPs au niveau cellulaire et moléculaire dans les cellules endothéliales d'artères pulmonaires humaines (HPAEC), et d'autre part, à comparer les effets de l'exposition aux particules atmosphériques dans des conditions expérimentales physiologiques et dans des conditions expérimentales pathologiques mimant l'HTP *in vitro*.

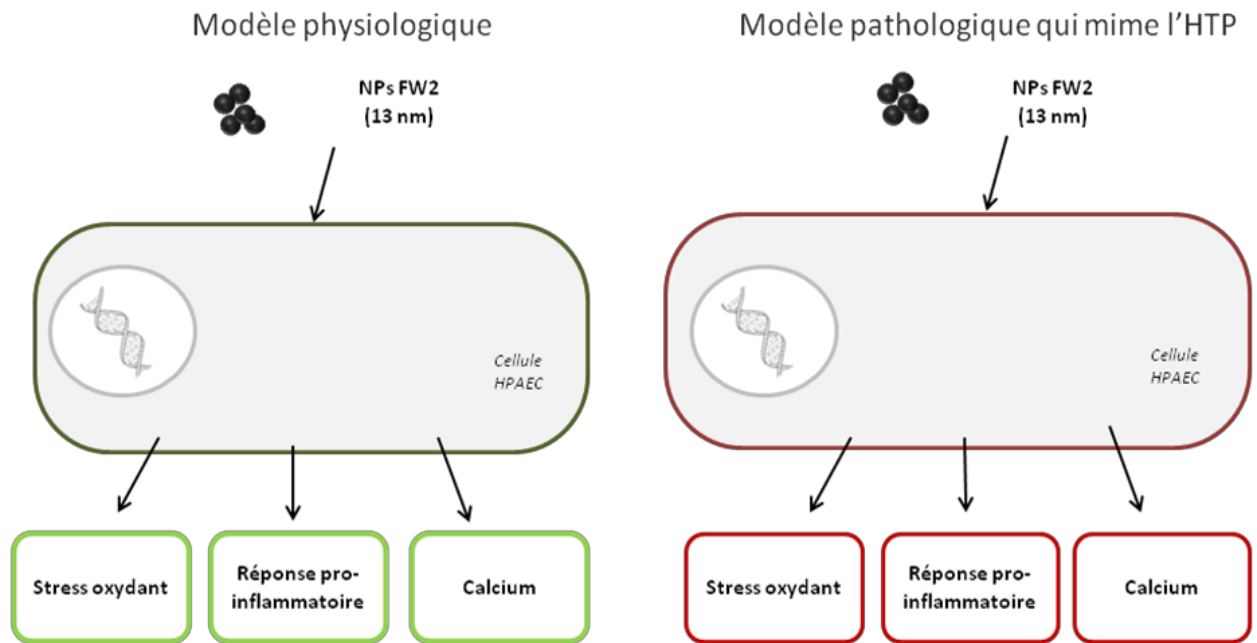
Objectif I : Etude des mécanismes cellulaires et moléculaires induits par les particules dans les HPAEC.

Une des questions importantes est de déterminer comment l'inhalation des particules atmosphériques au niveau pulmonaire peut affecter le système cardiovasculaire. Plusieurs hypothèses ont pu être émises, et notamment, une selon laquelle la rétention pulmonaire des PM déclencherait *in situ* un stress oxydant associé à une réaction pro-inflammatoire locale avec un relargage de médiateurs de l'inflammation dans la circulation générale qui entraîneraient des effets délétères sur le système cardiovasculaire. Une autre hypothèse serait que les particules les plus fines et/ou les composés solubles adsorbés à la surface des PM pourraient franchir la barrière alvéolo-capillaire pour se retrouver dans la circulation générale et y exercer leurs effets délétères par des interactions directes avec les organes cibles. Il a été démontré (i) que l'altération de la signalisation calcique avait un rôle prépondérant dans la physiopathologie de l'HTP, (ii) une augmentation de la concentration calcique intracellulaire $[Ca^{2+}]_i$ liée à une augmentation de l'activité des canaux calciques mécano-sensibles SAC (Stretch-Activated Channels) de type TRP (Transient Receptor Potential), (iii) que ces canaux sont impliqués dans le remodelage vasculaire observé dans l'HTP. Malgré le rôle fondamental du calcium dans la physiopathologie vasculaire, les effets des PM_{2.5} et des NPs sur la signalisation calcique sont peu décrits. Le stress oxydant est un autre événement critique dans les effets cardiovasculaires induits par les particules. Les ERO étant, également, impliqués dans l'HTP le stress oxydant induit par les PM pourrait être à l'origine du déclenchement d'une réponse inflammatoire, observée dans l'HTP. Dans la mesure où le calcium est un des éléments clés dans la régulation de l'homéostasie vasculaire et dans l'HTP, un des objectifs de ce travail est d'évaluer, *in vitro*, sur des cellules endothéliales, l'impact de NPs et de PM_{2.5} sur la signalisation calcique intracellulaire. L'hypothèse du rôle central d'une perturbation de l'homéostasie redox, étant avancée pour expliquer la relation entre la pollution particulaire et les pathologies cardiovasculaires, nous nous sommes, également, intéressés au rôle du stress oxydant dans les effets observés suite à une exposition avec les particules.



Objectif II : Comparaison des effets dans deux conditions: physiologique et pathologique mimant l'HTP *in vitro*.

La dysfonction endothéliale est un mécanisme clé à l'origine du développement de nombreuses pathologies cardiovasculaires. Afin d'évaluer si une exposition aux PM peut être un facteur de risque pour l'exacerbation de l'HTP, ce projet est mené sur des cellules HPAEC, dans des conditions physiologiques et pathologiques mimant la dynamique vasculaire observée dans l'HTP (culture en hypoxie 1 % O₂ sur support étirable en silicone, étirement à 20 %). L'objectif de cette étude a été, d'une part, de développer et valider un nouveau modèle *in vitro* qui mime l'HTP (culture des cellules en hypoxie sur système d'étirement cellulaire STREX®), et d'autre part, d'évaluer les effets des NPs noires de carbone dans les deux conditions expérimentales. Les résultats devraient nous permettre d'estimer l'impact des particules dans un contexte sain et pathologique, afin d'observer si l'exposition aux NPs FW2 pourrait être un facteur de risque dans l'exacerbation de l'HTP.



Ce projet de thèse permettra d'apporter de nouvelles connaissances sur les impacts cardiovasculaires des particules sur la santé des populations à risque et, notamment, sur la santé de personnes souffrant de pathologies vasculaires telles que l'HTP.

Matériels et méthodes

1 Les milieux de culture et les réactifs

Le milieu rouge complet (MRC) contient de l'ECGM (Endothelial Cell Growth Medium) complétement avec du SupplementMix (PromoCell®) contenant 2 % de sérum de veau foetal (SVF), 0.4 % d'Endothelial Cell Growth Supplement (ECGS), 0.1 ng/ml d'Epidermal Growth Factor (EGF), 1 ng/ml de Basic Fibroblast Growth Factor (BFGF), 90 µg/ml d'héparine et 1 µg/ml d'hydrocortisone.

Le milieu blanc complet (MBC) contient de l'ECGM (Endothelial Cell Growth Medium) sans rouge de phénol complétement avec du SupplementMix (PromoCell®) selon les recommandations du fournisseur.

Les antioxydants, tels que la PEG-SOD et la PEG-CAT, sont utilisés pour contrer la formation de radicaux libres dans le cytoplasme. La SOD et la CAT sont couplées à du polyéthylène glycol (PEG) afin d'avoir la propriété de pénétrer dans le cytoplasme de la cellule. Avant l'exposition aux particules pendant 4 h ou 24 h, les cellules sont prétraitées pendant 1 h avec la PEG-SOD (300 U/ml) et la PEG-CAT (600 U/ml).

Un chélateur de calcium extracellulaire, l'EGTA (acide egtazique), est utilisé afin d'observer l'impact du calcium extracellulaire sur le calcium intracellulaire. Avant l'exposition aux particules pendant 4 h, les cellules sont prétraitées pendant 1 h avec l'EGTA (5 mM). Un chélateur de calcium intracellulaire, le BAPTA-AM, est utilisé afin d'observer l'impact du calcium intracellulaire sur les différents organites et sur la production des radicaux libres. Avant l'exposition aux particules pendant 4 h, les cellules sont prétraitées pendant 30 min avec le BAPTA-AM (5 µM).

Les solutions physiologiques utilisées :

Krebs-HEPES Buffer	Concentrations (mmol/L)
Chlorure de sodium (NaCl)	118.4
Chlorure de potassium (KCl)	4.7
Sulfate de magnésium (MgSO ₄)	1.2
Sodium hydrogencarbonate (NaHCO ₃)	4
Potassium dihydrogenophosphate (KH ₂ PO ₄)	1.2
Chlorure de calcium (CaCl ₂)	2
HEPES	10
D-Glucose	6

Tableau 5 : Composition du Krebs-HEPES bicarbonate (KHB), pH ajusté à 7.4 à l'aide du NaOH et filtré (0.2 µm)

HBSS	Concentrations (mmol/L)
Chlorure de sodium (NaCl)	145
Chlorure de potassium (KCl)	4
Chlorure de magnésium (MgCl ₂)	1
Chlorure de calcium (CaCl ₂)	0.1
HEPES	10
D-Glucose	10
Albumine de sérum de bœuf (BSA)	1 mg/ml

Tableau 6 : Composition de la solution de HBSS

Mac/Krebs	Concentrations (mM)
Chlorure de sodium (NaCl)	130
Chlorure de potassium (KCl)	5.6
HEPES	8
D-Glucose	11
Magnésium	1
Calcium	2

Tableau 7 : Composition du MAC/Krebs, pH ajusté à 7.4 à l'aide du NaOH et filtré (0.2 µm)

Les sondes utilisées en microscopie confocale pour la détection des organelles de la cellule:

Organelles	Sondes fluorescentes	Concentrations (longueur d'onde em/ex)
Mitochondries	Mitotracker	1 µM (488/515 nm)
Réticulum Endoplasmique	ER-tracker	2 µM (408/450 nm)
Noyau	Hoeschst 33342	2 µM (408/450 nm)

Tableau 8 : Détection des organites de la cellule par sonde fluorescente

2. Les particules étudiées

2.a Les particules atmosphériques PM_{2.5}

Prélèvement des particules

Les PM_{2.5} ont été obtenues dans le cadre d'un projet (POTOX) soutenu par l'ADEME (convention N° 12 62 c 0037) dans le cadre de l'Appel à Projet de Recherche 2012 de l'ANSES (Projet n° 2012-2-013). Les prélèvements ont été réalisés à la station AIRPARIF de Porte d'Auteuil à Paris sur une période de 11 semaines (début septembre à mi-novembre 2013) à partir de prélèvements de 24 heures, réalisés sur 2 préleveurs Leckel bas volume (2,3 m³/h), en PM_{2.5} (fig. 39). L'utilisation de filtres Téflon de 47 mm de diamètre a servi aux travaux des biologistes. Les mesures de carbone (élémentaire et organique : EC/OC) ont nécessité un support Quartz et l'ensemble des analyses chimiques (ions, carbohydrates, métaux, hydrocarbures aromatiques polycycliques: HAP) s'est fait sur l'un ou l'autre des supports (Quartz/Téflon), en fonction des contraintes d'échantillonnage.

Analyses chimiques

Les pesées gravimétriques, les analyses d'ions (anions/cations), de carbohydrates (levoglucosan, traceur de feux de biomasse) et de carbone (EC, OC) ont été réalisées au SIRTA-LSCE. La description plus précise des techniques analytiques mises en place, se trouve dans les publications Sciare et coll. (474) pour les analyses ioniques, Yttri et coll. (475) pour les analyses de carbohydrates et Panteliadis et coll. (476) pour les analyses EC/OC. L'analyse des ions comprend les anions/cations majeurs (chlore, nitrate, sulfate, sodium, ammonium, potassium, magnesium, calcium). L'analyse des carbohydrates comprend le levoglucosan, mannosan, galactosan, mannitol, arabitol, glucose, inositol. L'analyse du carbone comprend le carbone élémentaire et organique (EC, OC). L'ensemble de ces techniques participe régulièrement à des exercices d'inter-comparaison internationaux qui garantissent un contrôle qualité sur une base annuelle à minima. Les analyses de métaux et HAP ont été réalisées par prestation de service analytique de l'unité « Sciences de l'Atmosphère et Génie de l'Environnement (SAGE) » de l'Ecole Nationale Supérieure des Mines de Douai.

Les PM_{2.5} étudiées dans ces travaux de thèses sont composées de carbone organique et élémentaire sur lesquels sont adsorbés différents polluants dont des HAP (principalement du pyrène, du benzo(e)pyrène, du benzo(a)anthracène et du chrysène) et de nombreux métaux (principalement du Fe, Cu, Mn, Pb, Mo, Sb, Sn).

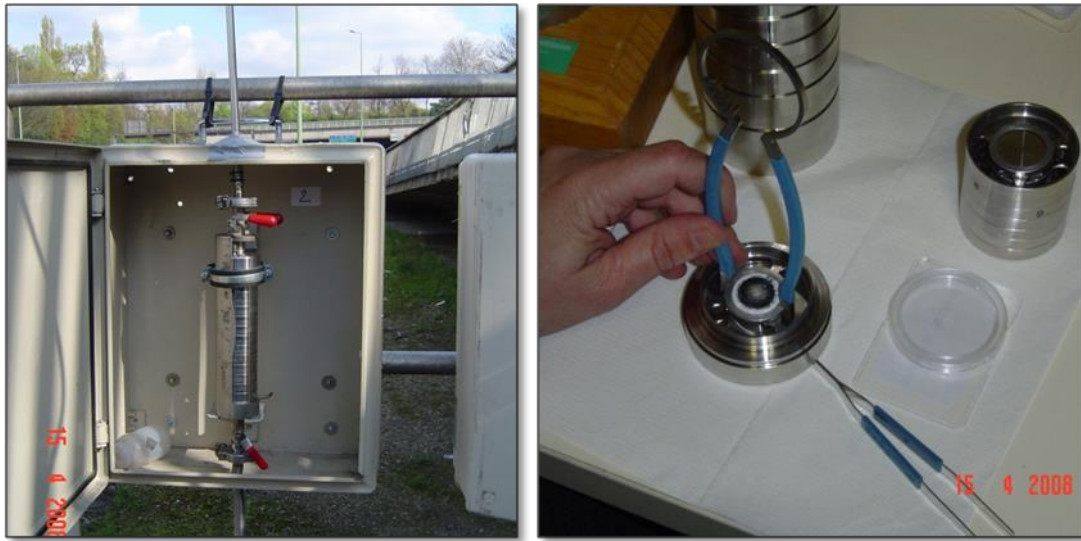


Figure 39 : Prélèvements des particules $PM_{2.5}$ sur un site à proximité du trafic. (a) photographie du préleveur Leckel et (b) photographie de la récupération des filtres avec les $PM_{2.5}$ à partir du préleveur Leckel (projet POTOX).

Préparation des suspensions particulaires $PM_{2.5}$

Un certain nombre de filtres ont été rassemblés pour avoir une quantité importante de particules (fig. 40). Les particules ont été récupérées à partir de filtres dans le laboratoire UMR-CNRS 8251, unité de biologie fonctionnelle et adaptative à l'Université Paris Diderot, selon une procédure adaptée de Janssen et al. 2014 (477).

La procédure de récupération/ extraction des particules a été effectuée en différentes étapes :

- Le filtre en Téflon est coupé en quatre, chaque quart de filtre est déposé dans un falcon de 50 ml contenant 3 ml de méthanol 100 % (2 falcons sont utilisés en parallèle par filtre).
- Le filtre est soniqué (*Branson Digital sonifier*) 30 sec à 50 % (200 W), puis un second quart du filtre est soniqué dans le même falcon.
- Les 6 ml de méthanol sont répartis dans 3 tubes eppendorf de 2 ml. Ensuite, le méthanol est évaporé à l'aide d'un concentrateur: *Concentrator plus* (1h/1h30 d'évaporation à 30 °C pour passer de 2 ml à 200 μ l de méthanol). Puis l'ensemble du méthanol contenant les PM du même lot est regroupé dans un minimum de tubes.
- Les tubes sont remis dans le concentrateur. Remarque : les tubes vides sont lavés avec 2 ml de méthanol propre (volume ajouté au volume final). Ces étapes sont répétées jusqu'à obtenir 2 ml.
- Les 2 ml, vortexés, sont mis dans 2 tubes eppendorf de 2 ml préalablement pesés afin de diviser la suspension finale de particule de chaque lot entre les deux laboratoires (RMCX et Univ Bordeaux).
- Les tubes finaux sont concentrés jusqu'à un volume total de 200 μ l environ. Pour finalement être évaporés par incorporation d'azote gazeux (10/15 min par tube).

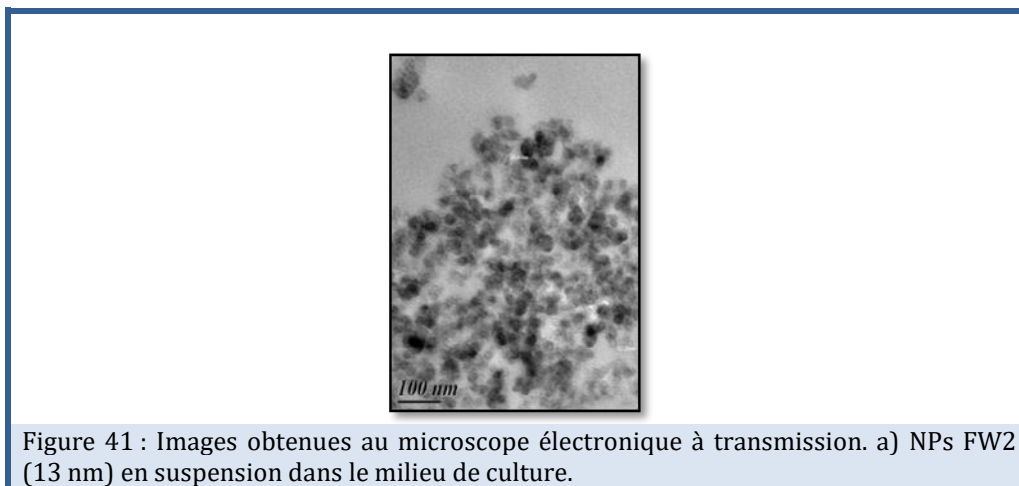
Pour finir, les particules ont été pesées, afin de déterminer la quantité de particule présente, et remises en suspension dans du milieu de culture MBC (la composition de ce milieu est décrite dans la partie II.1). Les suspensions particulaires sont conservées au congélateur à -20 °C jusqu'à utilisation.



Figure 40 : Photographie des filtres en Téflon avec des PM_{2.5}, récupérés après 24 h sur la station AIRPARIF, provenant des préleveurs Leckel (Projet POTOX).

2.b Les nanoparticules noires de carbone FW2: NPs FW2

Pour des raisons techniques, nos études n'ont pas été réalisées avec des PM_{0.1} provenant du trafic routier, en raison des quantités trop faibles prélevées pour étudier leur mécanisme d'action toxique. Notre choix s'est porté sur des NPs manufacturées qui sont standardisées dont la composition est connue. Les NPs FW2 sont commercialisées par la société Degussa (Francfort, Allemagne), elles sont constituées de carbone élémentaire (carbone pur) et possède les caractéristiques suivantes: diamètre aérodynamique moyen de 13 nm, surface de 350 m²/g, pH = 2.5 (436). Afin de constituer une suspension de NPs FW2 à 2 mg/ml, les NPs sont pesées directement dans un flacon en verre étant donné qu'elles sont fortement électrostatiques, puis elles sont remises en suspension dans du milieu de culture MBC (fig. 41a). La suspension particulaire est conservée à 4 °C.



3. La culture cellulaire

3.a Cellules endothéliales d'artères pulmonaires humaines

Notre étude a porté sur des cellules endothéliales d'artères pulmonaires humaines, étant donné qu'elles constituent une des premières cibles des particules inhalées et leur rôle clé dans la physiopathologie vasculaire. Les cellules endothéliales d'artères pulmonaires humaines (HPAEC pour Human Pulmonary Artery Endothelial Cells), commercialisées par PromoCell®, sont isolées à partir de l'artère pulmonaire principale d'un patient Caucasiens de 23 ans ayant subi une exérèse pulmonaire. Les cellules sont cultivées, en monocouche, dans des flasques de culture de 25 cm² à raison de 20 000 cellules par cm² dans du milieu de culture MRC (la composition de ce milieu est décrite dans la partie II.1). Les cellules sont incubées, à 37 °C, en atmosphère humide contrôlée à 5 % de CO₂, à pH 7.4.

Les lots de cellules utilisés sont: le lot#4091902, le lot#4010202, le lot#399Z034 et le lot#430Z016.1 (PromoCell®).

3.b Condition de culture cellulaire

Lorsque les cellules sont à environ 80 % de confluence (fig. 42), elles sont décollées, selon les recommandations du fournisseur, à l'aide du DetachKit (PromoCell®) contenant de l'HEPES-BSS, de la Trypsine/EDTA et un inhibiteur de trypsine (TNS). Les cellules sont ensuite centrifugées (5 min, 300 g, 4°C) et le culot cellulaire est remis en suspension dans 2 ml de MRC. La densité cellulaire est déterminée par comptage à l'aide d'une cellule de Neubauer en présence de bleu Trypan (colorant d'exclusion). Les cellules sont alorsensemencées dans des plaques 24, 12 ou 96 puits selon l'expérimentation choisie à une densité de 20 000 à 50 000 cellules/cm². Les cellules en culture primaire ont été utilisées entre les passages 2 et 8. Toutes les expérimentations cellulaires ont été effectuées en environnement stérile, sous hotte à flux laminaire.

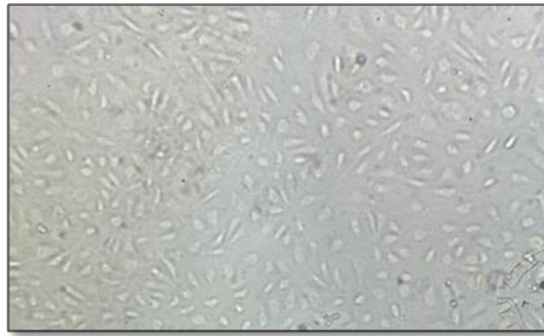


Figure 42 : HPAEC en culture, images obtenues au microscope à contraste de phase (X200)

3.c Modèle in vitro qui mime l'hypertension pulmonaire: culture cellulaire dans les chambres d'étirements et en hypoxie.

Principe

Les cellules ont, également, été cultivées sur des supports étirables en silicone (système d'étirement STREX® commercialisé par B-bridge International). Ce système permet d'étirer les cellules de façon chronique en les soumettant à des étirements dont la fréquence et l'intensité peuvent être contrôlées par le dispositif (fig. 43). Ce système innovant permet d'imposer des contraintes uniaxiales et donc de reproduire *in vitro* les contraintes physiques que peuvent subir *in vivo* les cellules présentes dans la paroi vasculaire, en mimant la dynamique vasculaire observée lors de l'hypertension pulmonaire (HTP).

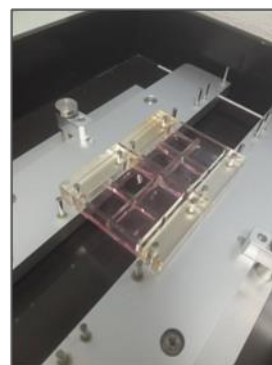


Figure 43 : Appareil d'étirement STREX® commercialisé par B-bridge International.

Protocole

Avant l'ensemencement, les chambres en silicone sont recouvertes avec de la fibronectine ($5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ dans du PBS 1X) et placées dans l'incubateur, pendant 30 min (37°C , 5 % CO_2).

Les cellules sontensemencées dans les chambres de culture en silicone à une densité de 30 000 cellules/cm² et cultivées, pendant 24 h (37 °C, 5 % CO₂). Les cellules sont ensuite placées dans deux conditions expérimentales distinctes:

- Condition physiologique: les cellules sont soit non étirées, soit subissent un étirement de 5 % avec l'appareil STREX® (1 Hz) et sont placées dans l'incubateur en normoxie (21 % O₂), pendant 20 h (37 °C, 5 % CO₂).
- Condition pathologique mimant l'HTP : les cellules sont étirées grâce à l'appareil STREX®, à raison de 30 cycles par minute et 20 % d'étirement (STREX®, 1 Hz), et, placées dans un incubateur à hypoxie (1 % O₂), pendant 20 h (37 °C, 5 % CO₂).

Les cellules sont, ensuite, exposées ou non, pendant 4 ou 6 h, avec les NPs FW2 à différentes concentrations (0 ; 5 ; 7,5 et 10 µg/cm²).

3.d Comptage des cellules (chambres en silicone)

Les cellules sontensemencées dans des chambres de culture en silicone à une densité de 30 000 cellules/cm² et cultivées, pendant 24 h (37 °C, 5 % CO₂). Puis, les cellules sont pré-conditionnées dans les deux conditions expérimentales (physiologique et pathologique) pendant 20 h (37 °C, 5 % CO₂). Après 20 h, les cellules sont décollées à l'aide de la trypsine (DetachKit de PromoCell®), centrifugées (5 min, 250 g, 4 °C) puis le culot cellulaire est remis en suspension dans 100 µl de MBC. Les cellules sont ensuite comptées à l'aide d'un compteur de cellule Luna™ Automated Cell Counting (Logos biosystems).

3.e Exposition des cellules avec les différentes particules

Afin d'éviter l'agrégation des particules, les suspensions particulaires à 2 mg/ml sont soniquées dans un bain à ultra-sons (3 x 3 minutes à 230 V et 100 Hz, modèle usc100t) et vortexées 3 fois avant d'être diluées aux concentrations nécessaires. Les différentes dilutions sont effectuées dans du milieu blanc complet (MBC). Pour les PM_{2.5}, une solution d'antibiotique et d'antifongique (pénicilline à 100 U/ml, streptomycine à 0.1 µg/ml et Fongizone à 0.25 µg/ml) a été ajoutée dans le MBC afin d'éviter les contaminations bactériennes et fongiques susceptibles, liées aux prélèvements atmosphériques. Les cellules sont exposées, pendant 30 min, 4 heures ou 24 heures, avec les différentes suspensions particulaires: PM_{2.5} ou de NPs FW2 à différentes concentrations infratoxiques (de 1 à 20 µg/cm²) déterminées à l'aide du test WST-1 (II.5).

4. Internalisation des particules (MET)

Les cellules ont étéensemencées d'une part dans des chambres en verre type Lab-Tek (8 puits, Dutscher, France) préalablement recouverte de fibronectine, et d'autre part dans les chambres en silicone, à une densité de 20 000 cellules/cm² et cultivées, pendant 24 h (37 °C, 5 % CO₂). Puis les cellules ont été exposées ou non avec les particules (0 ; 5 ou 7.5 µg/cm²) pendant 1 h ou 4 h selon l'expérimentation. Les cellules ont été ensuite rincées avec du milieu blanc sans sérum et fixées avec du paraformaldéhyde (1.6 %, v/v) et du glutaraldéhyde (2 %, v/v) dans une solution tampon de cacodylate (0.08 M), pH = 7.4 pendant 1 heure, à température ambiante (TA). Les cellules sont ensuite post-fixées dans un mélange contenant du tétroxyde d'osmium (1 %, v/v), du ferricyanide de potassium K₃Fe(CN)₆ (1 %, p/v) dilués dans du tampon cacodylate (0.1 M), pendant 2 heures sur la glace et à l'obscurité. Les échantillons ont ensuite été rincés avec de l'eau et coloré dans une solution aqueuse d'acétate uranyle (0.5 %, p/v) pendant 30 min à TA et à l'obscurité. Puis, les cellules ont été rincées et déshydratées à travers un gradient d'éthanol ; et incorporées dans un mélange d'éthanol pur et de la résine époxy 50/50 (v/v) (Epon 812 ; Delta Microscopie, Toulouse, France) pendant 2 h, puis dans une résine pure pendant la nuit à TA. La polymérisation de la résine a été réalisée pendant 24 - 48 h à 60 °C. Les échantillons ont ensuite été coupés à l'aide d'un couteau à diamant (Diatome, Biel-Bienne, Suisse) avec un ultramicrotome (EM UCT, Leica Microsystems, Vienne, Autriche), des coupes ultrafines (65 nm) ont été récupérées sur des grilles en cuivre et colorées avec l'uranyless (Delta Microscopies, Toulouse, France) et du citrate de plomb. Les grilles ont été observées avec un Microscope Electronique à Transmission (MET) (H7650, Hitachi, Tokyo, Japon) à 80 kV.

5. Evaluation de la cytotoxicité

Principe

La cytotoxicité des différentes particules a été évaluée par le test WST-1 (Water Soluble Tetrazolium) à l'aide du kit de dosage « Cell Prolifération Reagent WST-1 », (Roche®). Cette méthode permet d'évaluer la viabilité cellulaire. Ce test colorimétrique est basé sur le clivage des sels de tétrazolium WST-1 (4-[3-(4-Iodophényl)-2-(4-nitrophényl)-2H-5-tétrazolio]-1,3-benzene disulfonate) incolore, en un dérivé formazan soluble, de couleur jaune, par les succinates deshydrogénases mitochondriales des cellules vivantes (478).

Protocole

Les cellules HPAEC sontensemencées dans des plaques 96 puits à une densité de 20 000 cellules/cm² et cultivées, pendant 24 h (37 °C, 5 % CO₂). Avant l'exposition, les cellules sont rincées avec du MBC, puis elles sont intoxiquées, pendant 24 h (37 °C, 5 % CO₂), avec différentes concentrations de NPs FW2 ou de PM_{2.5} (0 ; 5 ; 7,5 ; 10 et 15 µg/cm²) en 8 réplicats (n = 3). Après avoir retiré les milieux contenant les particules, le tapis cellulaire est rincé deux fois avec du MBC. Puis, les cellules sont incubées pendant 3 h (37 °C, 5 % CO₂), avec du MBC contenant 10 % de WST-1.

Analyse

L'absorbance est mesurée directement par spectrophotométrie à 450 nm corrigée à 630 nm, à l'aide d'un lecteur de plaques SPECTROstarNano 2.10 et du logiciel MARS Data Analysis Software 2.41 (BMG Labtech®). Les résultats sont analysés sur Excel et GraphPad.

6. Evaluation du stress oxydant acellulaire

6.a Evaluation du stress oxydant acellulaire par la sonde CM-H₂DCFDA

Principe

Les différentes espèces réactives de l'oxygène (ERO) produites ont été quantifiées, par spectrofluorométrie, en utilisant la sonde CM-H₂DCFDA (5-(and-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluoresceine diacétate, acétyl ester, Fisher Scientific®). Le principe de cette technique consiste en l'oxydation, par les ERO, de H₂DCF (après hydrolyse de la forme diacétate), non fluorescente, en DCF (2',7'-dichlorofluoresceine), fluorescente. L'excitation de la molécule DCF à 485 nm émet une fluorescence verte proportionnelle à la quantité d'ERO présente, qui peut être détectée à 520 nm par un lecteur de microplaques à fluorescence (479).

Protocole

Afin d'évaluer la production intrinsèque d'ERO des différentes particules, les suspensions particulières sont diluées, dans de l'eau pour obtenir des solutions à des concentrations de 0 à 150 µg/ml, puis disposées dans une plaque 96 puits. La sonde CM-H₂DCFDA est solubilisée dans de l'éthanol absolu (DCFH₂-DA à 0.33 mM), et ajoutée à une solution de NaOH à 10 mM afin de cliver le groupement diacétate. Après 30 min d'activation, à TA et à l'obscurité, la solution est neutralisée par du PBS 10X. La solution obtenue est utilisée extemporanément, en prenant soin de ne pas l'exposer à la lumière. La sonde CM-H₂DCF activée est ensuite incorporée (concentration finale: 16.5 µM) dans les puits contenant les particules (250 µl final). Une gamme étalon d'H₂O₂, diluée dans un tampon Tris-HCl (40 mM, ajusté au pH 7.4), de 1 à 150 µM, est également préparée et incorporée avec de la sonde CM-H₂DFC (16.5 µM) et du sulfate ferreux FeSO₄ (50 µM). Pour finir, la plaque est incubée 60 min (37 °C et 5 % CO₂).

Analyse des résultats

L'intensité de fluorescence est mesurée, par spectrofluorimétrie, à l'aide d'un lecteur de plaques (FLUOstar Omega 2.10) à une longueur d'onde d'excitation de 485 nm et d'émission de 520 nm, à raison de 13 cycles de 600 sec à 37 °C. Les données sont extraites à l'aide du logiciel d'analyse MARS Data Analysis Software 2.30 R3 (BMG Labtech®) et les résultats sont analysés sur Excel et GraphPad.

6.b Evaluation du stress oxydant acellulaire par résonance paramagnétique électronique

Principe

La résonance paramagnétique électronique (RPE) est une méthode de spectroscopie sous champ magnétique qui permet de connaître la qualité et la quantité des espèces magnétiques d'un échantillon. C'est une technique sensible et spécifique qui permet une détection directe de toute espèce paramagnétique, c'est-à-dire caractérisées par la présence d'un électron non apparié sur la couche de valence, la rendant particulièrement bien adaptée à la mesure des radicaux libres (OH^\cdot , $\text{O}_2^{\cdot-}$). La notion de « spin » provient du fait que les électrons d'un atome sont en rotation autour d'un noyau atomique et également en rotation sur eux-mêmes. Le « spin » permet la mise en place d'un champ magnétique et les électrons se comportent comme des petits aimants. Lorsque les électrons d'une molécule s'apparient, les champs magnétiques qui leur sont associés s'annulent, en revanche, si le nombre d'électrons est impair (comme l' $\text{O}_2^{\cdot-}$), il y a un électron non apparié. Les radicaux se comportent à leur tour comme des petits aimants. Le principe de base de la RPE repose sur la propriété des électrons non appariés, lorsque qu'ils sont placés dans un champ magnétique extérieur intense B_0 , à absorber puis réémettre l'énergie d'un rayonnement électromagnétique $h\nu$ perpendiculaire à B_0 et d'amplitude plus faible.

Les espèces radicalaires (OH^\cdot , $\text{O}_2^{\cdot-}$) ont une demi-vie trop courte pour pouvoir être détectées directement et nécessitent une stabilisation préalable. L'utilisation de « spin probe » tel que le CMH (1-hydroxy-3-méthoxycarbonyl-2,2,5,5-tétraméthyl-pyrrolidine) permet de former, en présence d'anion superoxyde, un radical nitroxyde (CM^\cdot) stable avec une demi-vie de plusieurs heures, qui peut être facilement détecté par spectroscopie RPE (fig. 44). Cette sonde a, de plus, la propriété d'être liposoluble, et permet donc de mesurer l'anion superoxyde extra et intracellulaire.

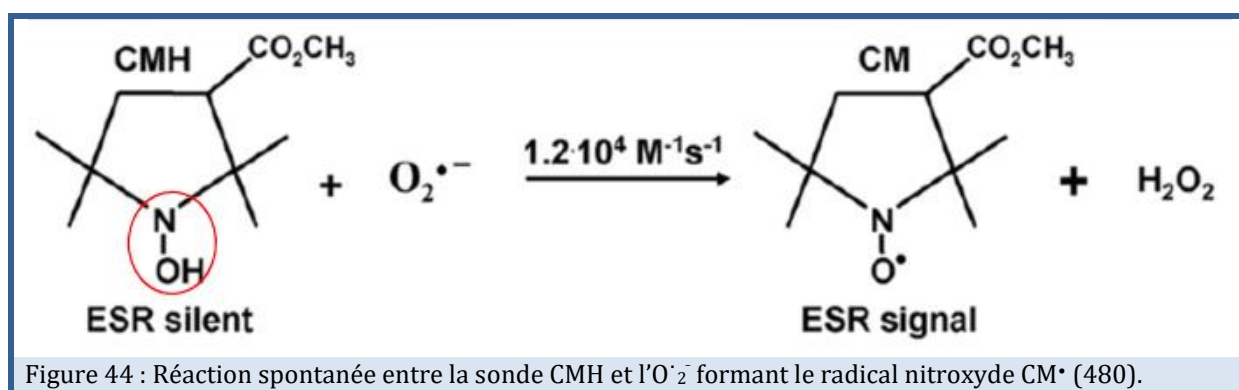


Figure 44 : Réaction spontanée entre la sonde CMH et l' $\text{O}_2^{\cdot-}$ formant le radical nitroxyde CM^\cdot (480).

Le spectre d'absorption obtenu (forme, position, ...) est caractéristique de l'élément magnétique dosé. Ainsi, pour l'anion superoxyde, le radical nitroxyde CM^\cdot entre en résonance lorsque B_0 a une intensité aux alentours de 335 mT. L'amplitude de la variation d'absorption correspond à la quantité d'anions superoxyde générés (481).

Les échantillons sont mis en présence d'un mélange « spin probe » qui contient la sonde CMH en excès afin de piéger l' O_2^- , ainsi que du diéthylthiocarbamate de sodium (DETC) et de la déféroxamine (DF) (deux antioxydants) afin que la sonde CMH soit oxydée uniquement par l' O_2^- . La DF, étant un chélateur du fer, inhibe l'auto-oxydation de la sonde CMH catalysée par les traces de métaux de transition présentes dans l'échantillon. Le DETC, un chélateur de cuivre, empêche l'auto-oxydation de la sonde CMH et en même temps la dégradation de l' O_2^- par la SOD Cu/Zn.

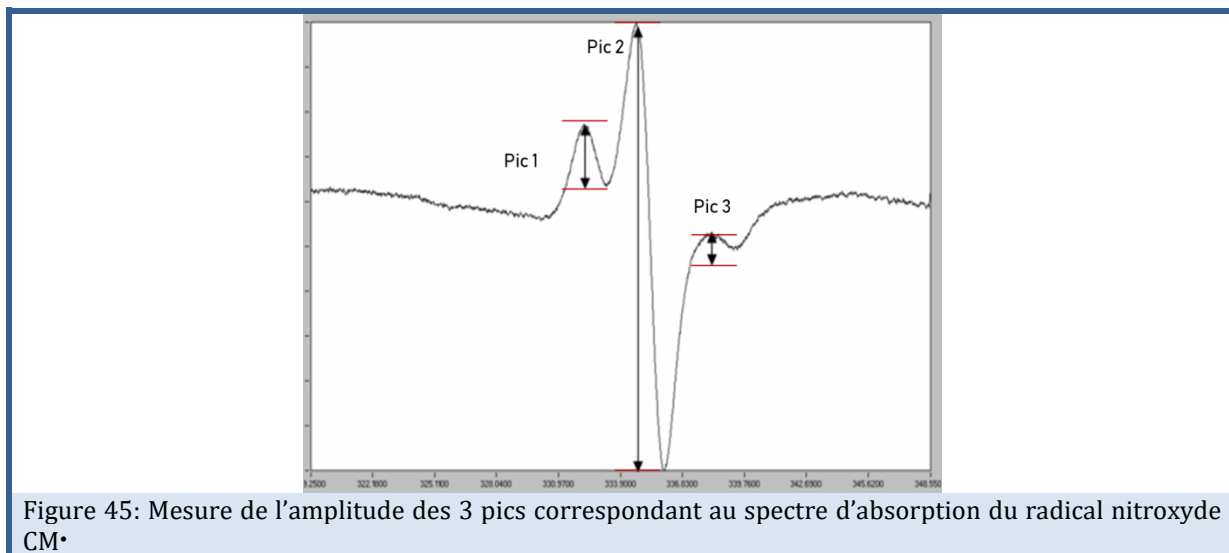
Protocole

Afin d'évaluer la production intrinsèque d' O_2^- des différentes particules, les suspensions particulières sont diluées, dans de l'eau (0 à 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$), puis disposées dans une plaque 24 puits. La sonde CMH (1.25 mM, Noxygen®) est solubilisée dans du KHB bullé à l'azote (la composition de cette solution est décrite dans la partie II.1) en présence de DETC (6.25 μM , Sigma®) et de DF (31.25 μM , Sigma®), appelé le mélange « spin-probe ». Ce mélange est ensuite incorporé dans les puits contenant les particules (500 μl final). Puis, la plaque est incubée 60 min (37°C et 5% CO_2). Finalement, les surnageants sont aspirés dans une seringue (dont l'extrémité a été préalablement coupée). La réaction est arrêtée en congelant immédiatement les seringues dans l'azote liquide (77 °K) et elles sont stockées à -80 °C.

Analyse

Les seringues stockées au -80 °C sont transportées dans de l'azote liquide. Les échantillons sont placés dans un Dewar qui est ensuite placé dans le résonateur (chambre de lecture). Le logiciel Miniscope est organisé en deux interfaces : « Control 6.51 » et « Analysis 2.02 ». La partie « Control 6.51 » est connectée au spectromètre à bande X Miniscope MS200 (Magnetech, Berlin), et il est utilisé pour le réglage des paramètres et l'acquisition des spectres. Les paramètres sont les suivants : B0 field: 3339,4 G ; B0 sweep: 293,84 G ; Sweep time: 60 sec ; Modulation amplitude: 0,5 ; Modulation frequency: 100 kHz ; Modulation: 5000 mG ; MW atten: 10 dB ; Samples: 4096 steps ; Gain : 100 ; Number (pass): 3.

La quantité d' O_2^- dans l'échantillon est proportionnelle à l'intensité d'absorption des photons. Les spectres sont analysés avec le module « Analysis 2.02 ». L'amplitude de chaque pic est quantifiée, moyennée et reportée dans un tableau Excel. La moyenne finale correspond aux 3 lectures (fig. 45).



7. Evaluation du stress oxydant cellulaire

7.a Evaluation globale des ERO par la sonde CM-H₂DCFDA

Principe

Les différentes ERO cellulaires produites dans les HPAEC ont été quantifiées, par spectrofluorométrie, en utilisant la sonde CM-H₂DCFDA (5-(and-6)-chlorométhyl-2',7'-dichlorodihydrofluoresceine diacétate, acétyl ester, Fisher Scientific®). La sonde CM-H₂DCFDA, est un dérivé chlorométhylé de la sonde H₂DFC, modifiée pour améliorer sa rétention dans les cellules. La forme diacétate CM-H₂DCF-DA est une molécule non polaire qui diffuse dans la cellule où elle est convertie en CM-H₂DCF par les estérases cytosoliques. Le groupement chlorométhyle thiol-réactif permet une liaison covalente à des composants intracellulaires, ce qui permet une rétention encore plus longue à l'intérieur de la cellule. Cette molécule, hydrophile et non fluorescente, est séquestrée dans le cytoplasme et peut être oxydée par les ERO en un dérivé fluorescent, le DCF qui peut être facilement quantifié en fluorescence (fig. 46). Ainsi l'intensité de fluorescence est directement proportionnelle à la quantité d'ERO présentes dans la cellule (482, 483).

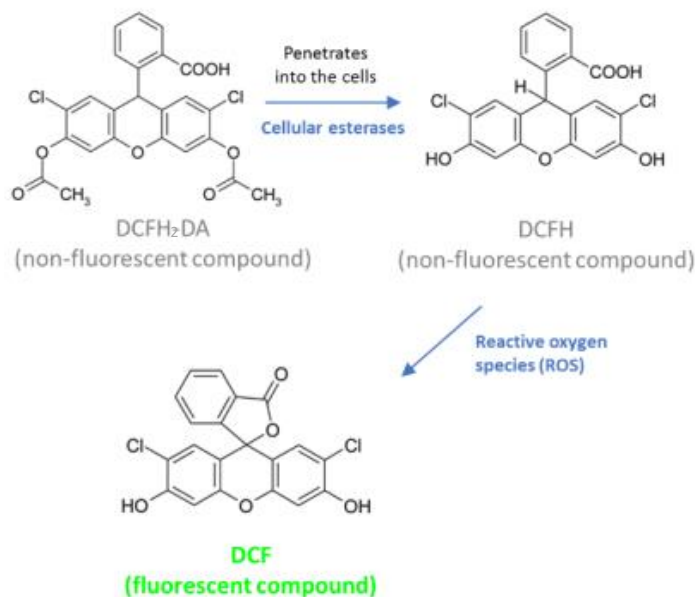


Figure 46 : Principe de la réaction du test d'évaluation du stress oxydant par la sonde CM-H₂DCFDA (484).

Protocole (plaque 24 puits)

Les expérimentations ont été réalisées en prenant soin d'exposer le moins possible la sonde et les cellules à la lumière. Les cellules HPAEC sontensemencées dans des plaques 24 puits à une densité de 50 000 cellules/cm² et cultivées, pendant 24 h (37 °C, 5 % CO₂). Avant l'exposition, les cellules sont rincées avec une solution d'HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) sans rouge de phénol (la composition de cette solution est décrite dans la partie II.1) et incubées, pendant 20 min (37 °C, 5 % CO₂), avec une solution d'HBSS contenant 20 µM de sonde. Après avoir retiré la sonde non incorporée, le tapis cellulaire est rincé deux fois avec le MBC et les cellules sont ensuite intoxiquées, pendant 4 h (37 °C, 5% CO₂), avec différentes concentrations de NPs FW2 ou de PM_{2.5} (0 ; 5 ; 7,5 ; 10 et 15 µg/cm²) en 3 réplicats (n = 3). Un contrôle positif a été réalisé en exposant les cellules à une solution d'H₂O₂ à 1 mM.

Protocole (chambre en silicone)

Les cellules HPAEC sontensemencées dans les chambres en silicone (4 puits) à une densité de 30 000 cellules/cm² et cultivées, pendant 24 h (37 °C, 5 % CO₂). Puis, les cellules sont pré-conditionnées dans les deux conditions expérimentales (physiologique et pathologique) pendant 20 h (37 °C, 5 % CO₂). Avant l'exposition, les cellules sont rincées avec une solution d'HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) sans rouge de phénol et incubées, pendant 20 min (37 °C et 5 % CO₂), avec une solution d'HBSS contenant 20 µM de sonde. Après avoir retiré la sonde non incorporée, le tapis cellulaire est rincé deux fois avec le MBC et les cellules sont intoxiquées, pendant 4 h (37 °C, 5 % CO₂), avec différentes concentrations de NPs FW2 (0 ; 5 ; 7,5 et 10 µg/cm²) en 4 réplicats (n = 3). Les surnageants de chaque puits de chacune des chambres sont transférés dans une plaque 24 puits.

Analyse

L'intensité de fluorescence est mesurée, par spectrofluorimétrie, à l'aide d'un lecteur de plaques (FLUOstar Omega 2.10) à une longueur d'onde d'excitation de 485 nm et d'émission de 520 nm, à raison de 13 cycles de 600 sec à 37 °C. Les données sont extraites à l'aide du logiciel d'analyse MARS Data Analysis Software 2.30 R3 (BMG Labtech®) et les résultats sont analysés sur Excel et GraphPad.

7.b Dosage de l'anion superoxyde cytoplasmique intracellulaire par résonance paramagnétique électronique

Protocole

PREPARATION DES ECHANTILLONS (PLAQUE 12 PUIITS)

Les cellules HPAEC sontensemencées dans des plaques 12 puits à une densité de 50 000 cellules/cm² et cultivées, pendant 24 h (37 °C, 5 % CO₂). Avant l'exposition, les cellules sont rincées avec du MBC. Les cellules sont ensuite intoxiquées, pendant 4 h (37 °C, 5 % CO₂), avec différentes concentrations de NPs FW2 ou de PM_{2.5} (0 ; 5 ; 7,5 ; 10 et 15 µg/cm²) en 3 réplicats (n = 3). Après avoir retiré les milieux contenant les particules, le tapis cellulaire est rincé deux fois avec une solution de KHB préalablement bullé à l'azote. Puis, les cellules sont incubées pendant 20 min (37 °C, 5 % CO₂), avec le mélange de « spin probe » (500 µl par puits) constitué de 40 µl de DETC (500 µM, Sigma®), 40 µl de DF (2,5 mM, Sigma®) et 80 µl de CMH (50 mM, Noxygen®) dans 3840 µl de KHB bullé à l'azote (*Falcon 15ml*). Après 20 min, dans chaque puits, les cellules sont grattées (avec un grattoir), homogénéisées (sans faire de bulles) et les surnageants sont aspirés dans une seringue (dont l'extrémité a été préalablement coupée). La réaction est arrêtée en congelant immédiatement les seringues dans l'azote liquide (77 °K) et elles sont stockées à - 80 °C.

PREPARATION DES ECHANTILLONS (CHAMBRE EN SILICONE)

Les cellules HPAEC sontensemencées dans des chambres en silicone 4 puits à une densité de 50 000 cellules/cm² et cultivées, pendant 24 h (37 °C, 5 % CO₂). Puis, les cellules sont pré-conditionnées dans les deux conditions expérimentales (physiologique et pathologique) pendant 20 h (37 °C, 5 % CO₂). Avant l'exposition, les cellules sont rincées avec du MBC. Les cellules sont ensuite intoxiquées, pendant 4 h (37 °C, 5 % CO₂), avec différentes concentrations de NPs FW2 (0 ; 5 ; 7,5 et 10 µg/cm²) en 4 réplicats (n = 3). Après avoir retiré les milieux contenant les particules, le tapis cellulaire est rincé deux fois avec une solution de KHB (Krebs-Hepes-Buffer) préalablement bullé à l'azote. Puis, les cellules sont incubées pendant 20 min (37 °C, 5 % CO₂), avec le mélange de « spin probe » (500 µl par puits) constitué de DETC (500 µM), de DF (2,5 mM) et de CMH (50 mM) dans du KHB bullé à l'azote. Après 20 min, dans chaque puits, les cellules sont grattées (avec un grattoir), homogénéisées (sans faire de bulles) et les surnageants sont aspirés dans une seringue (dont l'extrémité a été préalablement coupée). La réaction est

arrêtée en congelant immédiatement les seringues dans l'azote liquide (77 °K) et elles sont stockées à - 80 °C.

LECTURE DES ECHANTILLONS

Les seringues, stockées au - 80 °C, sont transportées dans de l'azote liquide. Les échantillons sont placés dans un Dewar qui est ensuite placé dans le résonateur (chambre de lecture). Le logiciel Miniscope est organisé en deux interfaces : « Control 6.51 » et « Analysis 2.02 ». La partie « Control 6.51 » est connectée au spectromètre à bande X Miniscope MS200 (Magnetech, Berlin), et il est utilisé pour le réglage des paramètres et l'acquisition des spectres. Les paramètres sont les suivants : B0 field: 3339,4 G ; B0 sweep: 293,84 G ; Sweep time: 60 sec ; Modulation amplitude: 0,5 ; Modulation frequency: 100 kHz ; Modulation: 5000 mG ; MW atten : 10 dB ; Samples: 4096 steps, Gain: 100 ; Number (pass): 3. Les spectres sont analysés avec le module « Analysis 2.02 ». L'amplitude de chaque pic est quantifiée, puis la moyenne des 3 pics des 3 lectures est calculée et reportée dans un tableau Excel. Une fois la lecture au spectromètre effectuée les échantillons sont récupérés dans des eppendorfs et sont conservés dans l'azote liquide et stockés à -80 °C, afin d'effectuer la normalisation des pics par rapport à la quantité de protéines.

Analyse

Les spectres de RPE sont analysés avec le module « Analysis 2.02 ». L'amplitude de chaque pic est quantifiée et reportée dans un tableau Excel. Le dosage des protéines permet de normaliser les résultats de la moyenne des pics observés en RPE (UA = unité arbitraire). Les analyses des résultats du test de Lowry sont faites sur Excel et GraphPad. Les résultats sont exprimés en UA/ (mg/ml).

EXTRACTION PROTEIQUE

Les échantillons sont décongelés dans la glace et centrifugés (10 min à 350 g, 4 °C). Le surnageant est éliminé et le culot repris dans un Mix RIPA Buffer avec des anti-protéases (CHemCruz™). Une nouvelle centrifugation (10 min à 11000 g, 4 °C) est réalisée et les protéines contenues dans le surnageant sont conservées à - 80 °C.

DOSAGE DES PROTEINES

Les protéines sont dosées par colorimétrie selon la méthode de Lowry. Cette technique est basée sur la réaction des protéines contenues dans les échantillons avec une solution alcaline de cuivre. La chélation des ions Cu^{2+} par les protéines entraîne leur réduction en ions Cu^+ . Les échantillons sont ensuite mis en présence du réactif de Folin en milieu acide. Ce dernier est réduit en dérivés colorés bleus en présence de différents acides aminés constitutifs des protéines et des ions Cu^+ . Le dosage est réalisé en fonction des recommandations du fournisseur (BioRad DC Protein assay reagent package). Une gamme étalon est réalisée à partir d'albumine de sérum de bœuf (BSA) de 0 à 2 mg/ml. L'absorbance est mesurée par spectrophotométrie à 750 nm, à l'aide d'un lecteur de

plaques SPECTROstarNano 2.10 et du logiciel MARS Data Analysis Software 2.41 (BMG Labtech®). Les résultats sont analysés sur Excel et GraphPad.

7.c Dosage de l'anion superoxyde mitochondrial par microscopie confocale

Principe

La sonde fluorescente MitoSOX (Red mitochondrial superoxide indicator, ThermoFischer®) est utilisée pour mesurer la production d'anion superoxyde (O_2^-) dans les mitochondries des cellules vivantes. L'oxydation de la sonde MitoSOX par l' O_2^- produit une fluorescence rouge (485, 486). La fluorescence de la sonde est mesurée au microscope confocal. Une fois excitée à 510 nm, la sonde émet une fluorescence à 580 nm dont l'intensité est proportionnelle au taux d'oxydation de la sonde.

Protocole

Les cellules HPAEC sontensemencées dans des plaques 96 puits à une densité de 20 000 cellules/cm² et cultivées, pendant 24 h (37 °C, 5 % CO₂). Avant l'exposition, les cellules sont rincées avec du MBC. Les cellules sont ensuite intoxiquées, pendant 4 h (37 °C, 5 % CO₂), avec différentes concentrations de NPs FW2 ou de PM_{2.5} (0 ; 5 ; 7,5 ; 10 et 15 µg/cm²) en 6 réplicats (n = 3). Après avoir retirée les milieux contenant les particules, le tapis cellulaire est rincé deux fois avec du MAC-Krebs (la composition de cette solution est décrite dans la partie II.1). Puis, les cellules sont incubées pendant 10 min, à 37 °C et à l'obscurité, avec la sonde MitoSOX (5 µM) diluée dans le MAC-Krebs. Pour finir, la plaque est vidée par retournement et 100 µl de la solution de MAC-Krebs sont ajoutés dans chaque puits avant l'analyse.

Analyse

L'intensité de fluorescence (mesure de l'anion superoxyde mitochondrial) est mesurée à l'aide d'un microscope confocal (TE2000 couplé à une station confocal Eclipse, Nikon). Les plaques sont observées au grossissement X200, avec l'huile à immersion. Les cellules sont stimulées à 543 nm et l'émission est enregistrée à 605 nm. Les résultats sont ensuite analysés à l'aide d'un logiciel NIS-Elements AR 3.0 et Microsoft Office Excel 2007. Les résultats sont exprimés en intensité de fluorescence en valeurs absolues.

8. Evaluation de la sécrétion de cytokines et de facteurs de croissance

8.a Quantification des cytokines pro-inflammatoires IL-6 et IL-8

La quantification des cytokines pro-inflammatoires (IL-6 et IL-8) dans les HPAEC a été étudiée selon 3 conditions expérimentales :

(1) Les cellules HPAEC sontensemencées dans des plaques 24 puits à une densité de 20 000 cellules/cm² et cultivées, pendant 24 h (37 °C, 5 % CO₂). Avant l'exposition, les

cellules sont rincées avec du MBC. Les cellules sont ensuite intoxiquées, pendant 24 h (37 °C, 5 % CO₂), avec différentes concentrations de NPs FW2 ou de PM_{2.5} (0 ; 5 ; 7,5 ; 10 et 15 µg/cm²) en 3 réplicats (n = 3). Les surnageants sont ensuite récupérés et congelés.

(2) Les cellules HPAEC sontensemencées dans des chambres en silicone 4 puits à une densité de 30 000 cellules/cm² et cultivées, pendant 24 h (37 °C, 5 % CO₂). Puis, les cellules sont pré-conditionnées dans les deux conditions expérimentales (physiologique et pathologique) pendant 20 h (37 °C, 5 % CO₂). Les surnageants sont ensuite récupérés et congelés.

(3) Les cellules HPAEC sontensemencées dans des chambres en silicone 4 puits à une densité de 30 000 cellules/cm² et cultivées, pendant 24 h (37 °C, 5 % CO₂). Puis, les cellules sont pré-conditionnées dans les deux conditions expérimentales (physiologique et pathologique) pendant 20 h (37 °C, 5 % CO₂). Avant l'exposition, les cellules sont rincées avec du MBC. Les cellules sont ensuite intoxiquées, pendant 6 h (37 °C, 5 % CO₂), avec différentes concentrations de NPs FW2 (0 ; 5 ; 7,5 et 10 µg/cm²) en 4 réplicats (n = 3). Les surnageants sont ensuite récupérés et congelés.

Les surnageants sont décongelés et centrifugés (10 min, 11000 g, 4 °C) afin d'éliminer les débris cellulaires et les particules. Le dosage des cytokines (IL-6 et IL-8) dans les surnageants de culture est réalisé par la technique d'enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), en utilisant les kits Duoset® (R&D Systems), selon les recommandations du fournisseur. La lecture de la plaque est réalisée, à l'aide d'un lecteur de plaques SPECTROstarNano 2.10 et du logiciel MARS Data Analysis Software 2.41 (BMG Labtech®). Les résultats sont ensuite analysés sur GraphPad.

8.b Dosage du facteur de croissance des fibroblastes-2 (FGF-2)

Les cellules HPAEC sontensemencées dans des chambres en silicone 4 puits à une densité de 30 000 cellules/cm² et cultivées, pendant 24 h (37 °C, 5 % CO₂). Puis, les cellules sont pré-conditionnées dans les deux conditions expérimentales (physiologique et pathologique) pendant 20 h (37 °C, 5 % CO₂). Les surnageants sont décongelés et centrifugés (10 min, 11000 g, 4 °C) afin d'éliminer les débris cellulaires et les particules. Le dosage du facteur FGF-2 dans les surnageants de culture a été effectué par la technique d'ELISA, en utilisant le kit « Human Fibroblast Growth Factor basic FGF-2 ELISA Kit » (Promocell®), selon les recommandations du fournisseur. La lecture de la plaque est réalisée à l'aide d'un lecteur de plaques SPECTROstarNano 2.10 et du logiciel MARS Data Analysis Software 2.41 (BMG Labtech®). Les résultats sont ensuite analysés GraphPad.

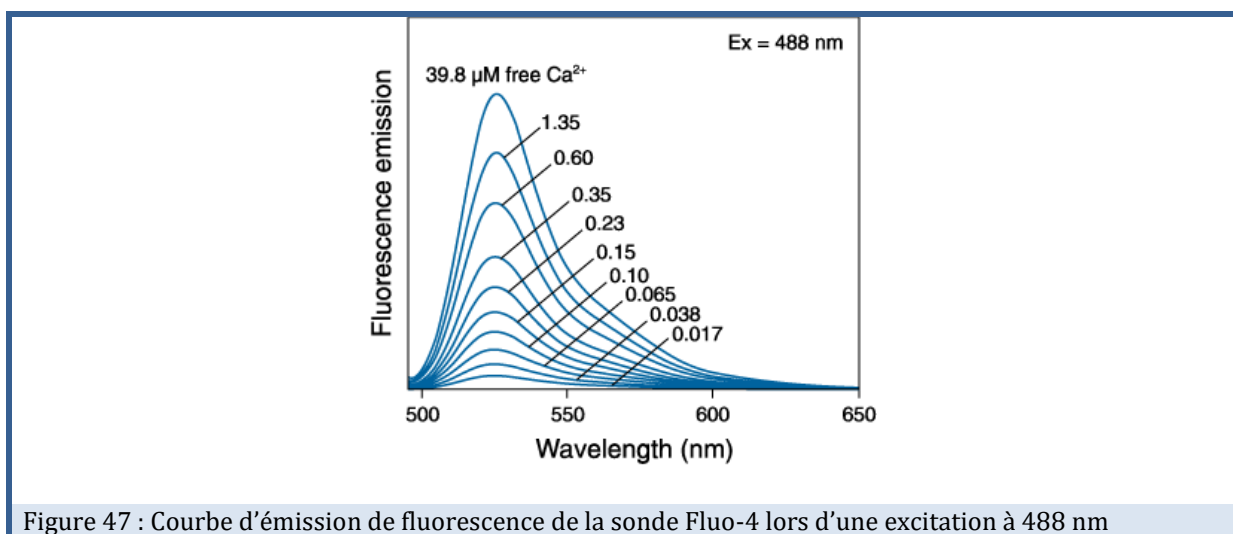
9. Mesures du calcium au microscope confocal

Les sondes calciques fluorescentes sont des outils pour suivre en direct les flux calciques intracellulaires dans des cellules vivantes. Il existe différentes sondes calciques pour suivre le calcium dans plusieurs compartiments cellulaires (cytoplasme, mitochondries, réticulum endoplasmique). Ces sondes sont dérivées de l'EGTA ou du BAPTA (chélateurs du calcium) afin de se lier au calcium dans les cellules (487). Une fois excitée par une longueur d'onde appropriée, la sonde émet une fluorescence dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de calcium. A l'aide d'une caméra qui va transformer l'énergie lumineuse émise en énergie électrique détectée par l'ordinateur au microscope confocal (488).

9.a Mesure du calcium cytoplasmique

Principe

Les variations du taux de calcium cytoplasmique sont mesurées à l'aide de la sonde Fluo-4-AM (1-[2-amino-5-(2,7-difluoro-6-hydroxy-3-oxo-9-xanthenyl)phenoxy]-2-(2-amino-5-methylphenoxy) ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid, pentaacetoxymethyl ester) (ThermoFischer®) qui est un chélateur de calcium. Sous sa forme Fluo4-AM, la fonction acétoxyméthyl ester (AM) lui permet de rentrer dans les cellules depuis le milieu extracellulaire. La fonction AM rend la sonde non polarisée, insensible au calcium et également perméable à la membrane plasmique des cellules. Une fois incorporée dans les cellules, la fonction AM va être clivée par des estérases endogènes, donnant la forme Fluo-4, piégée dans le cytoplasme et dont la fluorescence est sensible au calcium. La sonde Fluo-4 a un K_d de 345 nM, ce qui lui permet d'être sensible aux variations de Ca^{2+} intracellulaire qui vont généralement de 50 nM à 1 μ M. Une fois excitée à la longueur d'onde appropriée (494 nm), la sonde émet une fluorescence à 516 nm (fig. 47) (489). L'intensité fluorescente de la sonde Fluo-4 est directement proportionnelle à la quantité de Ca^{2+} présent dans le cytoplasme des cellules.



Protocole

Les cellules HPAEC sont ensemencées dans des plaques 96 puits à une densité de 20 000 cellules/cm² et cultivées, pendant 24 h (37 °C, 5 % CO₂). Avant l'exposition, les cellules sont rincées avec du MBC. Les cellules sont ensuite intoxiquées, pendant 4 h (37 °C, 5 % CO₂), avec différentes concentrations de NPs FW2 ou de PM_{2.5} (0 ; 5 ; 7,5 ; 10 et 15 µg/cm²) en 6 réplicats (n = 3). Après avoir retiré les milieux contenant les particules, le tapis cellulaire est rincé deux fois avec du MAC-Krebs. Puis, les cellules sont incubées pendant 30 min, à 37 °C et à l'obscurité, avec la sonde Fluo-4-AM (1 µM) diluée dans le MAC-Krebs. Pour finir, la plaque est vidée par retournement et 100 µl de la solution de MAC-Krebs sont ajoutés dans chaque puits avant l'analyse.

Etude des réponses calciques :

La réponse à l'ATP (adénosine triphosphate) : ajout de l'ATP dilué pour une concentration finale de 2*10⁻⁵ M

La réponse à la thapsigargine est mesurée en aigüe à la concentration finale de 1 µM.

La réponse au GSK1016790A (agoniste des canaux TRPV4) est mesurée à la concentration finale de 100 nM.

Analyse

L'intensité de fluorescence (mesure du calcium cytoplasmique) est mesurée à l'aide d'un microscope confocal (TE2000 couplé à une station confocal Eclipse, Nikon). Les plaques sont observées au grossissement X200, avec l'huile à immersion. Les cellules sont stimulées à 488 nm et l'émission est enregistrée à 515 nm. Les résultats sont ensuite analysés à l'aide d'un logiciel NIS-Elements AR 3.0 et Microsoft Office Excel 2007. Les résultats sont exprimés soit en valeur absolue de fluorescence, soit en ratio (F/F₀) d'augmentation de la fluorescence (F) par rapport au niveau basal (F₀).

9.b Mesure du calcium mitochondrial

Principe

Les variations du taux de calcium mitochondrial sont mesurées à l'aide de la sonde Rhod-2-AM (Euromedex) qui est également un chélateur de calcium. La sonde Rhod-2 a un K_d de 570 nM. Elle va préférentiellement être attirée par les mitochondries car elle possède une charge positive ce qui lui donne la propriété de s'accumuler dans la mitochondrie (dont le potentiel de membrane interne est chargé négativement, environ -150 mV) (490). L'intensité fluorescente de la sonde Rhod-2 est directement proportionnelle à la quantité de Ca²⁺ présent dans les mitochondries des cellules.

Protocole

Les cellules HPAEC sont ensemencées dans des plaques 96 puits à une densité de 20 000 cellules/cm² et cultivées, pendant 24 h (37 °C, 5 % CO₂). Avant l'exposition, les cellules

sont rincées avec du MBC. Les cellules sont ensuite intoxiquées, pendant 4 h (37 °C, 5 % CO₂), avec différentes concentrations de NPs FW2 ou de PM_{2.5} (0 ; 5 ; 7,5 ; 10 et 15 µg/cm²) en 6 réplicats (n = 3). Après avoir retiré les milieux contenant les particules, le tapis cellulaire est rincé deux fois avec du MAC-Krebs. Puis, les cellules sont incubées pendant 30 min, à 37 °C et à l'obscurité, avec la sonde Rhod-2-AM (1 µM) diluée dans le MAC-Krebs. Pour finir, la plaque est vidée par retournement et 100 µl de la solution de MAC-Krebs sont ajoutés dans chaque puits avant l'analyse.

Analyse

L'intensité de fluorescence (mesure du calcium mitochondrial) est mesurée à l'aide d'un microscope confocal (TE2000 couplé à une station confocal Eclipse, Nikon). Les plaques sont observées au grossissement X200, avec l'huile à immersion. Les cellules sont stimulées à 543 nm et l'émission est enregistrée à 605 nm. Les résultats sont ensuite analysés à l'aide d'un logiciel NIS-Elements AR 3.0 et Microsoft Office Excel 2007. Les résultats sont exprimés en intensité de fluorescence en valeurs absolues.

9.c Mesure du calcium du réticulum endoplasmique (RE)

Principe

Les variations du taux de calcium dans le RE sont mesurées à l'aide de la sonde Fluo-4FF, AM (ThermoFischer®). La sonde Fluo-4FF a un K_d de 9.7 µM, ce qui lui permet de détecter des variations de calcium plus élevées comme dans le RE. Cette sonde a la propriété d'augmenter sa fluorescence lors de la liaison au Ca²⁺ (491). L'intensité fluorescente de la sonde Fluo-4FF est directement proportionnelle à la quantité de Ca²⁺ présent dans le RE des cellules.

Protocole

Les cellules HPAEC sontensemencées dans des plaques 96 puits à une densité de 20 000 cellules/cm² et cultivées, pendant 24 h (37 °C, 5 % CO₂). Avant l'exposition, les cellules sont rincées avec du MBC. Les cellules sont ensuite intoxiquées, pendant 4 h (37 °C, 5 % CO₂), avec différentes concentrations de NPs FW2 ou de PM_{2.5} (0 ; 5 ; 7,5 ; 10 et 15 µg/cm²) en 6 réplicats (n = 3). Après avoir retiré les milieux contenant les particules, le tapis cellulaire est rincé deux fois avec du MAC-Krebs. Puis, les cellules sont incubées pendant 30 min, à 37 °C et à l'obscurité, avec la sonde Fluo-4FF-AM (10 µM) diluée dans le MAC-Krebs. Pour finir, la plaque est vidée par retournement et 100 µl de la solution de MAC-Krebs sont ajoutés dans chaque puits avant l'analyse.

Analyse

L'intensité de fluorescence (mesure du calcium réticulaire) est mesurée à l'aide d'un microscope confocal (TE2000 couplé à une station confocal Eclipse, Nikon). Les plaques sont observées au grossissement X200, avec l'huile à immersion. Les cellules sont stimulées à 488 nm et l'émission est enregistrée à 515 nm. Les résultats sont ensuite

analysés à l'aide d'un logiciel NIS-Elements AR 3.0 et Microsoft Office Excel 2007. Les résultats sont exprimés en intensité de fluorescence en valeurs absolues.

10. Mesure du potentiel membranaire des mitochondries

Principe

La mesure du potentiel de membrane mitochondrial ($\Delta\Psi_m$) a été évalué à l'aide d'une sonde cationique lipophile (perméable à la membrane) : le tétraméthylrhodamine, méthyl ester (TMRM) (ThermoFischer®). Il s'agit d'une sonde de la famille des rhodamines qui est séquestrée par les mitochondries actives. En raison du potentiel de membrane très négatif de la membrane interne des mitochondries, le TMRM s'accumule préférentiellement dans la mitochondrie par rapport au cytoplasme. Plus le potentiel de membrane est négatif, plus la sonde se fixe dans les mitochondries (492). La fluorescence émise varie en fonction du potentiel mitochondrial. L'intensité fluorescente de la sonde TMRM est directement proportionnelle au $\Delta\Psi_m$, plus il est négatif, plus la fluorescence émise est élevée.

Protocole

Les cellules HPAEC sontensemencées dans des plaques 96 puits à une densité de 20 000 cellules/cm² et cultivées, pendant 24 h (37 °C, 5 % CO₂). Avant l'exposition, les cellules sont rincées avec du MBC. Les cellules sont ensuite intoxiquées, pendant 4 h (37 °C, 5 % CO₂), avec différentes concentrations de NPs FW2 ou de PM_{2.5} (0 ; 5 ; 7,5 ; 10 et 15 µg/cm²) en 6 réplicats (n = 3). Après avoir retiré les milieux contenant les particules, le tapis cellulaire est rincé deux fois avec du MAC-Krebs. Puis, les cellules sont incubées pendant 20 min, à 37 °C et à l'obscurité, avec la sonde TMRM (100 nM) diluée dans le MAC-Krebs. Puis, la plaque est vidée par retournement et 100 µl de la solution de MAC-Krebs sont ajoutés dans chaque puits avant l'analyse.

Analyses

L'intensité de fluorescence (mesure potentiel membranaire mitochondrial) est mesurée à l'aide d'un microscope confocal (TE2000 couplé à une station confocal Eclipse, Nikon). Les plaques sont observées au grossissement X200, avec l'huile à immersion. Les cellules sont stimulées à 543 nm et l'émission est enregistrée à 605 nm. Les résultats sont analysés à l'aide d'un logiciel NIS-Elements AR 3.0 et Microsoft Office Excel 2007. Les résultats sont exprimés en intensité de fluorescence en valeurs absolues.

11. Mesure de la dynamique mitochondriale

Principe

La dynamique mitochondriale a été évalué en utilisant la sonde MitoTracker Green (ThermoFischer®). Cette sonde possède un demi-groupement chlorométhyle thiol

réactif, elle diffuse de manière passive à travers la membrane plasmique et les membranes des organites. Par un processus de conjugaison à des protéines mitochondriales, via son groupement thiol, la sonde reste piégée dans les mitochondries. La sonde initialement réduite ne produit pas de fluorescence, et va finalement s'oxyder une fois dans les mitochondries et émettre de la fluorescence. Cela permet de visualiser en direct leur dynamique (fission/fusion par exemple).

Protocole

Les cellules HPAEC sontensemencées dans des plaques 96 puits à une densité de 20 000 cellules/cm² et cultivées, pendant 24 h (37 °C, 5 % CO₂). Avant l'exposition, les cellules sont rincées avec du MBC. Les cellules sont ensuite intoxiquées, pendant 4 h (37 °C, 5 % CO₂), avec différentes concentrations de NPs FW2 ou de PM_{2.5} (0 ; 5 ; 7,5 ; 10 et 15 µg/cm²) en 6 réplicats (n = 3). Après avoir retiré les milieux contenant les particules, le tapis cellulaire est rincé deux fois avec du MAC-Krebs. Puis, les cellules sont incubées pendant 30 min, à 37 °C et à l'obscurité, avec la sonde Mitotracker (1 µM) diluée dans le MAC-Krebs. Puis, la plaque est vidée par retournement et 100 µl de la solution de MAC-Krebs sont ajoutés dans chaque puits avant l'analyse. Un contrôle positif est utilisé en exposant les cellules pendant 10 min avec du Carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone (CCCP) (5 µM).

Analyses

L'intensité de fluorescence (mesure de la dynamique mitochondriale) est mesurée à l'aide d'un microscope confocal (TE2000 couplé à une station confocal Eclipse, Nikon). Les plaques sont observées au grossissement X600, avec l'huile à immersion. Les cellules sont stimulées à 488nm et l'émission est enregistrée à 515nm. Les résultats sont ensuite analysés à l'aide d'un logiciel NIS-Elements AR 3.0 et Microsoft Office Excel 2007. Les résultats sont exprimés qualitativement.

12. Mesure du monoxyde d'azote et des peroxynitrites

12.a Mesure du monoxyde d'azote (NO) au microscope confocal

Principe

La détection et la quantification des concentrations de NO sont mesurées à l'aide de la sonde DAF-FM (4-Amino-5-Methylamino-2',7'-Difluorofluorescein Diacetate) (ThermoFischer®). La sonde DAF-FM est non fluorescente jusqu'à ce qu'elle réagisse avec du NO pour former un dérivé de benzotriazole fluorescent (493). L'intensité fluorescente de la sonde DAF-FM est directement proportionnelle à la quantité de NO présent dans les cellules.

Protocole

Les cellules HPAEC sontensemencées dans des plaques 96 puits à une densité de 20 000 cellules/cm² et cultivées, pendant 24 h (37 °C, 5 % CO₂). Avant l'exposition, les cellules

sont rincées avec du MBC. Les cellules sont ensuite intoxiquées, pendant 4 h (37 °C, 5 % CO₂), avec différentes concentrations de NPs FW2 ou de PM_{2.5} (0 ; 5 ; 7,5 ; 10 et 15 µg/cm²) en 6 réplicats (n = 3). Après avoir retiré les milieux contenant les particules, le tapis cellulaire est rincé deux fois avec du MAC-Krebs. Puis, les cellules sont incubées pendant 20 min, à 37 °C et à l'obscurité, avec la sonde DAF-FM (5 µM) diluée dans le MAC-Krebs. Puis, la plaque est vidée par retournement et 100 µl de la solution de MAC-Krebs sont ajoutés dans chaque puits avant l'analyse.

Analyse

L'intensité de fluorescence (mesure du NO cytoplasmique) est mesurée à l'aide d'un microscope confocal (TE2000 couplé à une station confocal Eclipse, Nikon). Les plaques sont observées au grossissement X200, avec l'huile à immersion. Les cellules sont stimulées à 488 nm et l'émission est enregistrée à 515 nm. Les résultats sont ensuite analysés à l'aide d'un logiciel NIS-Elements AR 3.0 et Microsoft Office Excel 2007. Les résultats sont exprimés en intensité de fluorescence en valeurs absolues.

12.b Dosage du NO et des peroxynitrites (ONOO⁻) par le Réactif de Griess

Principe

La production du monoxyde d'azote (NO) et des peroxynitrites (ONOO⁻) a été déterminée indirectement dans les surnageants des HPAEC. En raison de son instabilité dans les solutions physiologiques, la plus grande partie du NO est rapidement convertie en nitrite (NO₂⁻) puis en nitrate (NO₃⁻). Le NO peut réagir avec diverses molécules présentes dans la cellule telles que l'O₂, l'O₂⁻ et le dioxygène d'azote (NO₂) (tableau 9). L'association du NO et de l'O₂⁻ conduit à la production de peroxynitrites (ONOO⁻) qui réagissent rapidement avec les ions H⁺ pour produire des nitrates (NO₃⁻).

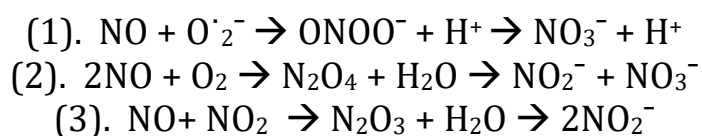


Tableau 9: Les différentes réactions de transformation du NO en nitrates (NO₃⁻) et en nitrites (NO₂⁻).

D'après la réaction (1), la concentration de NO₃⁻ est directement proportionnelle à la concentration d'ONOO⁻ ; elle-même dépendante de la concentration de NO. Le test de Griess, permet d'une part, de quantifier la concentration de NO₂⁻ basal (réactions 2 et 3) et d'autre part, la concentration totale de NO₂⁻ produit (réactions 1 et 2), reflet de la quantité de NO₃⁻, à l'aide de l'enzyme nitrate réductase et le co-facteur de la nitrate réductase. Pour finir, en soustrayant les concentrations de NO₂⁻ totaux (réaction 1, 2 et 3) des concentrations de NO₂⁻ basal (réaction 2 et 3), les concentrations de NO et d'ONOO⁻ seront déterminées.

Protocole

(1) Les cellules HPAEC sontensemencées dans des plaques 24 puits à une densité de 20 000 cellules/cm² et cultivées, pendant 24 h (37 °C, 5 % CO₂). Avant l'exposition, les cellules sont rincées avec du MBC. Les cellules sont ensuite intoxiquées, pendant 24 h (37 °C, 5 % CO₂), avec différentes concentrations de NPs FW2 ou de PM_{2.5} (0 ; 5 ; 7,5 ; 10 et 15 µg/cm²) en 3 réplicats (n = 3). Les surnageants sont ensuite récupérés et congelés.

(2) Les cellules HPAEC sontensemencées dans des chambres en silicone 4 puits à une densité de 30 000 cellules/cm² et cultivées, pendant 24 h (37 °C, 5 % CO₂). Puis, les cellules sont pré-conditionnées dans les deux conditions expérimentales (physiologique et pathologique) pendant 20 h (37 °C, 5 % CO₂). Avant l'exposition, les cellules sont rincées avec du MBC. Les cellules sont ensuite intoxiquées, pendant 6 h (37 °C, 5 % CO₂), avec différentes concentrations de NPs FW2 (0 ; 5 ; 7,5 et 10 µg/cm²) en 4 réplicats (n = 3). Les surnageants sont ensuite récupérés et congelés.

Analyse

Les surnageants sont décongelés et centrifugés (10 min, 11000 g, 4 °C) afin d'éliminer les débris cellulaires et les particules. Le dosage du NO et des ONOO⁻ dans les surnageants de culture a été effectué par la technique du réactif de Griess en utilisant le kit « Griess Reagent Kit for nitrite determination » (Invitrogen®), selon les recommandations du fournisseur. L'absorbance est mesurée par spectrophotométrie à 550 nm, à l'aide d'un lecteur de plaques SPECTROstarNano 2.10 et du logiciel MARS Data Analysis Software 2.41 (BMG Labtech®). Les résultats sont analysés sur Excel et GraphPad.

13. Analyses statistiques

Les résultats sont exprimés en moyenne ± l'erreur standard de la moyenne (SEM). Chaque expérimentation a été réalisée plusieurs fois (n indique le nombre d'expérimentations), indépendantes les unes des autres. Pour comparer deux échantillons indépendants, si n > 30, un test paramétrique (t de Student) a été utilisé et si le n < 30, un test non paramétrique (Mann & Whitney) a été réalisé. Pour comparer plusieurs échantillons indépendants, si n > 30, un test paramétrique (ANOVA) suivi du test de comparaison multiple de Tukey a été réalisé et si n < 30, un test non paramétrique (Kruskal & Wallis) suivi du test de comparaison multiple de Dunn a été réalisé. Les différences sont considérées statistiquement significatives lorsque $P < 0.05$. * indique une différence significative pour $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**) et $P < 0.001$ (***) ; $P < 0.05$ (#), $P < 0.01$ (##) et $P < 0.001$ (###) et $P < 0.05$ (\$), $P < 0.01$ (\$\$) et $P < 0.001$ (\$\$\$). Toutes les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism 5.0.

Résultats et Discussion

Objectif I : Etude des mécanismes cellulaires et moléculaires induits par les PM_{2.5} et les NPs FW2 dans les HPAEC.

1) Le premier axe de recherche a pour objectif de caractériser, dans les HPAEC, les mécanismes à l'origine des effets induits par les PM_{2.5} au niveau du stress oxydant et de la signalisation calcique. Cette étude est réalisée dans le cadre du projet POTOX (ADEME/ANSES, convention N° 12 62 c 0037) qui consistait à comparer les effets de PM_{2.5}, provenant de différentes sources, sur la génération du stress oxydant dans des cellules épithéliales pulmonaires et des cellules endothéliales vasculaires humaines. Cette étude fait l'objet d'un article: "Involvement of oxidative stress and calcium signaling in airborne particulate matter - induced damages in human pulmonary artery endothelial cells" publiée en juillet 2017 dans le journal « *Toxicology in Vitro* », présentée dans ce travail de thèse sous forme d'article.

2) Le deuxième axe de recherche a pour objectif de caractériser, dans les HPAEC, les mécanismes à l'origine des effets induits par des particules de composition physico-chimique différente des PM_{2.5}, les NPs FW2, au niveau du stress oxydant et de la signalisation calcique. Cette étude fait l'objet d'un article: "Effect of carbon black nanoparticles on human pulmonary artery endothelial cells: role of oxidative stress on calcium signaling and mitochondrial function " en soumission (août 2018), dans le journal « *Particle and Fibre Toxicology* », présentée dans ce travail de thèse sous forme d'article.

Objectif II : Comparaison des effets induits par les NPs FW2 dans les HPAEC dans deux conditions expérimentales: physiologique et pathologique mimant l'HTP *in vitro*.

3) Cette étude a pour objectif de mettre au point et de développer un modèle qui mime *in vitro* la dynamique vasculaire observée dans l'HTP, afin de comparer les effets des NPs FW2 dans des conditions physiologique et pathologique. Les résultats sont exposés sous forme de résultats/discussion dans cette troisième partie. Un article scientifique est en cours d'écriture.

1. Implication du stress oxydant et de la signalisation calcique dans les dommages causés par les PM_{2.5} sur des cellules endothéliales de l'artère pulmonaire humaine.

Contexte: Les particules fines (PM_{2.5}), qui font l'objet de notre étude, ont un diamètre aérodynamique moyen inférieur à 2,5 µm et leur composition physico-chimique varie selon leur source d'émission conduisant, ainsi, à des effets toxiques différents. En effet, différents polluants (métaux, HAP...) peuvent être adsorbés sur leur noyau carboné. Les émissions issues du trafic routier représentent à l'heure actuelle, les principales sources des PM_{2.5} dans les grandes agglomérations européennes, et des études récentes ont montré que les particules sont principalement impliquées dans l'augmentation de l'incidence des pathologies respiratoires et cardiovasculaires par rapport aux autres polluants atmosphériques. Le tractus respiratoire constitue la principale cible des particules inhalées. Cependant, le système cardiovasculaire et, en particulier, les CE qui tapissent la lumière des vaisseaux et qui sont impliquées dans la régulation de la vasomotricité, constituent également une cible privilégiée des PM_{2.5}, de leurs composés solubles ou des médiateurs pro-inflammatoires sécrétés par les cellules épithéliales bronchiques. Après inhalation, les PM_{2.5} peuvent s'accumuler dans les alvéoles et le parenchyme pulmonaires à proximité de la paroi artérielle pulmonaire. Ces particules peuvent, ensuite, franchir les barrières épithéliales et atteindre la circulation pulmonaire (60, 74, 494, 495). Il a été montré que la pollution atmosphérique particulaire pouvait, dans les artères intrapulmonaires, altérer la réactivité vasculaire en induisant une altération de la relaxation endothéliale dépendante du NO (4, 5, 7), ce qui pourrait entraîner une augmentation de la pression artérielle systémique ou pulmonaire (9, 295, 496, 497). En conséquence, l'accumulation et la rétention des PM_{2.5} pourraient être un facteur déterminant dans l'exacerbation de maladies cardiovasculaires préexistantes telles que l'HTP. Le stress oxydatif et l'altération de la signalisation calcique sont des événements critiques impliqués dans la physiopathologie de l'HTP (11, 12, 498, 499). De plus, des études ont montré qu'après l'inhalation, les particules entraînent un stress oxydatif et altèrent l'homéostasie calcique, souvent associées à une réponse pulmonaire pro-inflammatoire, qui sont également des caractéristiques de l'HTP (371, 378). Malgré le rôle majeur de la signalisation calcique et du stress oxydatif dans la pathogenèse de l'HTP, l'effet des PM_{2.5} sur ces cibles cellulaires vasculaires est peu décrit, en particulier sur les cellules endothéliales de l'artère pulmonaire humaine (HPAEC).

Les objectifs de cette étude sont d'évaluer les effets cellulaires et moléculaires induits par les PM_{2.5} issues du trafic routier sur les cellules HPAEC, en se focalisant en particulier sur le stress oxydant et la signalisation calcique, qui sont deux mécanismes altérés dans l'HTP. Les PM_{2.5} étudiées sont principalement composées de carbone élémentaire (EC), de HAP (principalement pyrène, benzo(e)pyrène, benzo(a)anthracène et chrysène), ainsi que des traces de métaux provenant d'émissions liées au trafic (principalement Fe, Cu, Mn, Pb, Mo, Sb, Sn).

Différents paramètres ont été étudiés (i) la production intrinsèque, acellulaire et intracellulaire, d'ERO globale par fluorimétrie (sonde CM-H₂DCF-DA) (ii) la production spécifique intrinsèque, acellulaire et intracellulaire et mitochondriale d'anion superoxyde (O₂^{·-}) par RPE et par microscopie confocale (sonde MitoSOX) (iii) la signalisation calcique par microscope confocal (sonde Fluo-4) (iv) l'internalisation des PM_{2.5} dans les HPAEC.



Involvement of oxidative stress and calcium signaling in airborne particulate matter - induced damages in human pulmonary artery endothelial cells

J. Deweirtd^{a,b}, J.F. Quignard^{a,b}, B. Crobeddu^c, A. Baeza-Squiban^c, J. Sciare^{d,e}, A. Courtois^{a,b,f}, S. Lacomme^{a,g}, E. Gontier^{a,g}, B. Muller^{a,b}, J.P. Savineau^{a,b}, R. Marthan^{a,b,f}, C. Guibert^b, I. Baudrimont^{a,b,*}

^a Université de Bordeaux, 146, rue Léo Saignat, Bordeaux F-33076, France

^b Inserm U1045, Centre de Recherche Cardio-Thoracique de Bordeaux, 146, rue Léo Saignat, Bordeaux F-33076, France

^c Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Unit of Functional and Adaptive Biology (BFA) UMR 8251 CNRS, F-75205 Paris, France

^d Laboratoire des Sciences du Climat et de l'Environnement (LSCE), CEA-CNRS, Centre de Saclay, F-91190 Gif sur Yvette, France

^e Energy Environment Water Research Center, The Cyprus Institute, 2121 Nicosia, Cyprus

^f Centre Hospitalier Universitaire de Bordeaux, Centre AntiPoison et de Toxicovigilance d'Aquitaine et de Poitou Charente et Service d'Exploration Fonctionnelle Respiratoire, Place Amélie Raba Léon, Bordeaux F-33076, France

^g Bordeaux Imaging Center UMS 3420 CNRS – US4 INSERM, Pôle d'imagerie électronique, 146, rue Léo Saignat, Bordeaux F-33076, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Particulate matter
PM_{2.5}
Pulmonary artery endothelial cells
Free radicals
Reactive oxygen species
Intracellular calcium
Calcium imaging

ABSTRACT

Recent studies have revealed that particulate matter (PM) exert deleterious effects on vascular function. Pulmonary artery endothelial cells (HPAEC), which are involved in the vasomotricity regulation, can be a direct target of inhaled particles. Modifications in calcium homeostasis and oxidative stress are critical events involved in the physiopathology of vascular diseases. The objectives of this study were to assess the effects of PM_{2.5} on oxidative stress and calcium signaling in HPAEC. Different endpoints were studied, (i) intrinsic and intracellular production of reactive oxygen species (ROS) by the H₂DCF-DA probe, (ii) intrinsic, intracellular and mitochondrial production of superoxide anion (O₂^{•-}) by electronic paramagnetic resonance spectroscopy and MitoSOX probe, (iii) reactive nitrosative species (RNS) production by Griess reaction, and (vi) calcium signaling by the Fluo-4 probe. In acellular conditions, PM_{2.5} leads to an intrinsic free radical production (ROS, O₂^{•-}) and a 4 h-exposure to PM_{2.5} (5–15 µg/cm²), induced, in HPAEC, an increase of RNS, of global ROS and of cytoplasmic and mitochondrial O₂^{•-} levels. The basal intracellular calcium ion level [Ca²⁺]_i was also increased after 4 h-exposure to PM_{2.5} and a pre-treatment with superoxide dismutase and catalase significantly reduced this response. This study provides evidence that the alteration of intracellular calcium homeostasis induced by PM_{2.5} is closely correlated to an increase of oxidative stress.

1. Introduction

Many epidemiological studies have revealed an association between airborne particulate matter (PM) pollution and an excess in cardiovascular and respiratory mortality and morbidity such as asthma, chronic obstructive pulmonary disease (COPD), cancers, myocardial infarction and pulmonary hypertension (PH) (Pope et al., 2004, 2015; Chen et al., 2014; Beelen et al., 2014). Mortality and morbidity due to respiratory and cardiovascular diseases increase by 0.5 to 1.5% for each increase of PM in the air of 5–6 µg/m³ (Lee et al., 2014). PM is a complex mixture of particles from different sources and different sizes

(coarse particles: PM₁₀ with a mean aerodynamic diameter < 10 µm, fine particles PM_{2.5} with a mean aerodynamic diameter < 2.5 µm and ultrafine particles: PM_{0.1} with a mean aerodynamic diameter < 0.1 µm). These particles also have different chemical compositions thus leading to different toxic effects. Transition metals (such as iron and copper), organic compounds such as polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), quinones... and microorganisms (bacteria, fungi...) can be adsorbed onto pre-existing particles (Thomson et al., 2016). Traffic emissions (fossil fuel combustion from mobile sources) are considered as the major health-relevant particulate pollution sources in industrialized urban centres (Hopke et al., 2006) and recent studies have

Abbreviations: PM, particulate matter; PH, pulmonary hypertension; HPAEC, human pulmonary artery endothelial cells; ROS, reactive oxygen species; PAHs, polycyclic aromatic hydrocarbons

* Corresponding author at: Inserm U1045, Centre de Recherche Cardio-Thoracique de Bordeaux, 146 rue Léo Saignat, F-33076 Bordeaux, France.

E-mail address: isabelle.baudrimont@u-bordeaux.fr (I. Baudrimont).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2017.07.001>

Received 10 February 2017; Received in revised form 19 June 2017; Accepted 4 July 2017

Available online 05 July 2017

0887-2333/ © 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

shown that the fine PM fraction of these emissions is mainly involved in the increased incidence of respiratory and cardiovascular diseases as compared to other atmospheric pollutants (Newby et al., 2015).

The respiratory tract is the first target of inhaled particles. However, the cardiovascular system and, more specifically, endothelial cells lining the inner surface of blood arteries that are involved in the vasomotricity regulation can also be a direct target of inhaled particles or some of their soluble constituents. In humans and animals, the finest inhaled particles may accumulate into pulmonary alveoli and the lung parenchyma close to pulmonary arterial wall. These particles may then cross the epithelial barriers and reach the pulmonary circulation, in particular the artery endothelial cells, where they can exert their deleterious effects on vascular function by increasing oxidative stress (Calderón-Garcidueñas et al., 2001; Kreyling et al., 2002; Nemmar et al., 2002, 2013; Mills et al., 2009). Alternatively, effects on endothelial cells can also be indirect resulting from secretions of pro-inflammatory mediators produced by bronchial epithelial cells. In previous studies, it has been shown that particulate pollution could alter the vascular reactivity by inducing impairment of endothelial NO-dependent relaxation in intrapulmonary arteries (Courtois et al., 2008, 2010; Barrier et al., 2016) that may be responsible for an increase in systemic or pulmonary blood pressure (Urch et al., 2005; Calderón-Garcidueñas et al., 2007; Mills et al., 2011; Mahne et al., 2012; Bellavia et al., 2013; Morishita et al., 2015). As a consequence, the accumulation and retention of PM could be determining factors for exacerbation of pre-existent cardiovascular diseases such as pulmonary hypertension (PH). PH is the main disease of the pulmonary circulation characterized by increase of pulmonary arterial resistances, remodeling of the pulmonary arteries, changes in pulmonary vascular reactivity, right heart hypertrophy and heart failure. Oxidative stress and alteration in calcium signaling are critical events involved in the physiopathology of PH (Touyz and Schiffrin, 2004; Guibert et al., 2007; Ducret et al., 2010; Martin et al., 2012; Freund-Michel et al., 2013; Xu et al., 2014; Gilbert et al., 2014; Lai et al., 2015; Parpaite et al., 2016).

Moreover, after inhalation, particles trigger an oxidative stress and alter calcium homeostasis with overproduction of reactive oxygen species (ROS), often associated with a pulmonary pro-inflammatory response, which is also a characteristic of PH (Stone et al., 2000; Chen et al., 2011; Dubes et al., 2017). Size and chemical composition are the main determinants of the PM-induced molecular and cellular effects via oxidative stress. The finest particles are associated with an increased surface reactivity that is involved in intrinsic free radical production (Ayres et al., 2008). Transition metals and organic compounds which are present in PM are known to produce oxidative stress respectively via the Fenton reaction or by the redox cycling (such as the superoxide anion and the reactive hydroxyl radical) and can induce oxidative lesions in cellular macromolecules (Donaldson et al., 1997; Squadrito et al., 2001). Moreover, previous studies have shown, that in rat pulmonary artery smooth muscle cells (PASMC), acute or chronic exposure to nanoparticles increases the intracellular calcium concentration ($[Ca^{2+}]_i$) via activation of calcium channels at the plasma membrane (Stone et al., 2000; Chen et al., 2011; Dubes et al., 2017). Despite this major role of calcium signaling and oxidative stress in the pathogenesis of PH, the effect of airborne particulate matter on these cellular targets is poorly described particularly on pulmonary artery endothelial cells.

In this context, the objectives of the present study were to assess the effects of PM_{2.5} exposure, in human pulmonary artery endothelial cells (HPAEC), on oxidative stress and calcium signaling, which both are deregulated in PH.

HPAEC were exposed for 4 h to PM_{2.5} (5 to 15 µg/cm²). Different endpoints were studied (i) PM_{2.5} internalization (ii) intracellular and acellular production of ROS by a fluorescent probe (H₂DCF-DA) (iii) intracellular and acellular production of superoxide anion by electronic paramagnetic resonance spectroscopy (EPR) (iv) production of mitochondrial superoxide anion by MitoSOX probe (confocal microscopy) (v) nitric oxide (NO) and peroxynitrite (ONOO⁻) productions by Griess

reaction (vi) calcium signaling using calcium imaging (fluorescent indicator dye Fluo-4) and confocal microscopy analysis.

2. Materials and methods

2.1. PM filter samples collection

Daily (24 h-integrated) PM_{2.5} was sampled continuously on 47-mm diameter Teflon filters, during September and October 2013, at a traffic urban site ("Porte d'Auteuil") in Paris with a low volume Leckel (2.3 m³/h) air sampler (Leckel, Germany) (Sciare et al., 2011).

Samples have been taken in this period in order to target a period that is usually optimal for sampling PM emissions from traffic (high pressure systems with low precipitation) and to avoid the winter period that may contain, out of traffic emissions, an additional source of combustion aerosol (domestic wood burning).

2.2. Extraction of PM filter samples

PM_{2.5} Teflon filters were extracted with methanol, sonicated (Branson Digital sonifier) during 30 s at 50% (200 W), reduced in volume using evaporator set (Concentrator plus, Eppendorf) at 30 °C, until about 200 µl was left, and then dried overnight at 30 °C under a constant flow of nitrogen, according to the method adapted from Janssen et al. (2014).

Dry extracts were resuspended in supplemented Endothelial Cell Growth Medium (ECGM without phenol red) supplemented with streptomycin (0.1 µg/ml), penicillin (100 U/ml) and fungizone (0.25 µg/ml). PM_{2.5} suspension stocks were stored at -20 °C until use and, immediately prior to use, stock suspensions were vortexed and freshly resuspended by sonication, 3 × 30 s (Vibracell 75186, 130 W, 56–60 Hz).

2.3. Cell culture

All experiments were done on HPAEC cultures isolated from pulmonary artery main branch of a 23-year old male Caucasian donor. HPAEC were purchased from PromoCell® (France) and grown in ECGM supplemented with a Supplement Mix [2% fetal bovine serum (FBS), 0.4% endothelial cell growth factor (ECGF), 0.1 ng/ml epidermal growth factor (EGF), 1 ng/ml basic fibroblast growth factor (BFGF), 90 µg/ml heparin, and 1 µg/ml hydrocortisone, PromoCell®]. Cells were seeded at 10,000 cells/cm² on 25 cm² culture flasks and were maintained at 37 °C, in a 95% humidified air and 5% CO₂. Cell passages were performed when about 80% confluence was achieved. All experiments were done on HPAEC from passages 2 to 8.

2.4. Cytotoxicity assay

Cell viability was assessed using the WST-1 (Water-Soluble Tetrazolium) cell proliferation reagent (Roche, France) according to the manufacturer's recommendations. It is a colorimetric method for determining mitochondrial metabolic activity (viable cells) in which a succinate-tetrazolium reductase enzyme can convert a tetrazolium salt compound (WST-1) into an aqueous soluble and coloured formazan. This assay assumes that the relative number of viable cells is proportional with the mitochondrial enzymatic activity. Cells were seeded in a 96-well culture plate at 20,000 cells/cm² and cultured in supplemented ECGM for 24 h at 37 °C and 5% CO₂. Cells were exposed or not (control cells) to PM_{2.5} in a concentration range from 1 to 10 µg/cm².

After a 24 h-treatment with PM_{2.5}, cells were rinsed with ECGM and incubated for 3 h with WST-1 reagent. The absorbance of supernatants was measured at 450 nm by spectrophotometry using a microplate spectrophotometer reader (SPECTROstarNano.2.10, BMG Labtech®, Germany). The working concentrations for all further experiments were determined by this test (mortality rate < 25%).

2.5. Internalization studies

Cells were seeded at 20,000 cells/cm² on plastic Lab-Tek chambers (Dutscher, France) and cultured in supplemented ECGM, for 24 h, at 37 °C and 5% CO₂. Cultures were then exposed or not (control cells) to PM_{2.5} at 7.5 µg/cm², at 37 °C and 5% CO₂. After a 1 h-exposure to PM_{2.5}, cells were fixed with 1.6% paraformaldehyde and 2% glutaraldehyde in 0.08 M cacodylate buffer (pH 7.4) during 2 h at room temperature (RT). After washing in 0.1 M cacodylate buffer, cells were post-fixed in a mix 1% osmium tetroxide (v/v)/1% potassium ferricyanide K₃Fe(CN)₆ (p/v) in 0.1 M cacodylate buffer during 2 h on ice in the dark. Then, samples were washed in water, and stained in block in 0.5% aqueous uranyl acetate solution during 30 min at RT in the dark. Subsequently, cells were washed and dehydrated through a series of graded ethanol and embedded in a mixture of pure ethanol and epoxy resin 50/50 (v/v) (Epon 812; Delta Microscopie, Toulouse, France) during 2 h and then in 100% resin overnight at RT. The polymerization of the resin was carried out during 48 h at 60 °C.

Samples were then sectioned using a diamond knife (Diatome, Biel-Bienne, Switzerland) on an ultramicrotome (EM UCT, Leica Microsystems, Vienna, Austria). Ultrathin sections (65 nm) were picked up on copper grids and then stained with Uranylless (Delta Microscopies, Toulouse, France) and lead citrate. Grids were examined with a Transmission Electron Microscope (H7650, Hitachi, Tokyo, Japan) at 80 kV.

2.6. Global reactive oxygen species production

2.6.1. Acellular global ROS production

The global ROS were detected using the CM-H₂DCFDA (5-(and-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluoresceine diacetate, acetyl ester) assay (Fisher Scientific®) according to the manufacturer's recommendations and using the method described by Foucaud et al. (2007) modified for this study.

Just before use, the CM-H₂DCFDA probe must be hydrolyzed. To do so, 50 µg were resuspended with a mix of absolute ethanol and a 10 mM sodium hydroxide solution (final concentration of the probe 66 µM). After a 30 min activation in the dark, at room temperature, the chemical reaction was stopped by adding PBS 10 × (final concentration of the probe 16.5 µM).

Finally, the activated CM-H₂DCF probe was added into the wells of a 96-well plate containing either H₂O₂ standard in the presence of FeSO₄ (10 µM) or PM_{2.5} suspension to obtain a final concentration of 3.3 µM CM-H₂DCF probe. Then, samples were incubated, for 1 h, at 37 °C and 5% CO₂. Thus, final concentrations of H₂O₂ standard range were 1–150 µM, and final concentrations of PM_{2.5} were 1–50 µg/ml. Fluorescence intensity was measured by spectrofluorimetry at λ_{ex} = 485 nm and λ_{em} = 530 nm using a FLUOstar Omega 2.10 plate reader (BMG Labtech®) and the analyses were performed with the MARS Data Analysis Software 2.30 R3 (BMG Labtech®).

2.6.2. Intracellular global ROS production

Intracellular ROS production was assessed using the CM-H₂DCFDA probe (Fisher Scientific®) according to the manufacturer's recommendations and using the method adapted from Wang and Joseph (1999) and Chen et al. (2010). The non-fluorescent CM-H₂DCFDA reagent rapidly diffuses through the cell membrane and is hydrolyzed by intracellular esterases to a non-fluorescent oxidative sensitive form (CM-H₂DCF) which is oxidized by ROS to generate a highly fluorescent adduct with a fluorescent intensity proportional to intracellular ROS production.

HPAEC cells were seeded at 50,000 cells/cm² in a 24-well plate and cultured for 24 h, at 37 °C and 5% CO₂. Cells were rinsed with Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) and were pre-incubated for 20 min with CM-H₂DCFDA probe (final concentration 20 µM) in HBSS. Cells were then rinsed with HBSS before a 4 h-exposure with PM_{2.5}, at different

concentrations (5–15 µg/cm²), at 37 °C. Fluorescence intensity was measured at λ_{ex} = 485 nm and λ_{em} = 520 nm in spectrofluorimetry by using FLUOstar Omega 2.10 plate reader and the analyses were performed with the MARS Data Analysis Software 2.30 R3 (BMG Labtech®).

2.7. Superoxide anion detection by electron paramagnetic resonance (EPR)-spin trapping

EPR spin-trapping is one of the specific technique used to study generation of free radicals such as the superoxide anions. However, their high activity, their very short life span and their relative low concentrations made their measurement difficult to develop. The detection of O₂^{•-} was carried out using the spin trap 1-hydroxy-3-methoxycarbonyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidine (CMH) probe (Noxygen®) which could be oxidized by O₂^{•-} to generate a stable nitroxide radical (CM•) easily detectable by EPR spectroscopy. The CMH probe has the property of being soluble and can measure intra and extracellular superoxide anion (Dikalov et al., 2011; Könczöl et al., 2012).

2.7.1. Acellular superoxide anion production

Superoxide anion was detected using the method described by Dellinger et al. (2001) and Nymark et al. (2014) modified for this study. A PM_{2.5} range of 25 to 250 µg/ml was prepared in ECGM. A Krebs-HEPES Buffer solution (118.4 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.2 mM MgSO₄, 4 mM NaHCO₃, 1.2 mM KH₂PO₄, 2.5 mM CaCl₂, 10 mM HEPES and 6 mM D-Glucose; adjusted at pH = 7.4) was prepared and just before use was filtered and put under a constant flow of nitrogen. Finally, PM_{2.5} (1–50 µg/ml final concentration) were incubated, in a 24-well plate for a 1 h-incubation, at 37 °C, 5% CO₂, with the spin-probe mix containing at final concentrations, CMH probe (1,25 mM), diethyl-dithiocarbamate (6,25 µM) and deferoxamine (31,25 µM) solubilized in the Krebs-HEPES Buffer solution. The mix was then removed in a syringe and the reaction was stopped by freezing the samples in liquid nitrogen before EPR analysis.

2.7.2. Cellular superoxide anion production

EPR assay was performed as previously described (Billaud et al., 2009; Deschacht et al., 2010; Dikalov et al., 2011) and was adapted for this study. HPAEC cells were seeded at 50,000 cells/cm² in a 12-well plate and cultured for 24 h, at 37 °C and 5% CO₂. After a 4 h-exposition with PM_{2.5}, at different concentrations (5–15 µg/cm²), at 37 °C and 5% CO₂, cells were incubated for 20 min with the spin-probe mix containing CMH (1 mM), diethyl-dithiocarbamate (5 µM) and deferoxamine (25 µM) in Krebs-HEPES Buffer solution. Then, cells were scraped, homogenized and frozen in a syringe in liquid nitrogen before EPR analysis. All the EPR spectra were recorded using a Spectrometer X Miniscope MS200 (Magnetech®, Berlin, Germany). The following EPR conditions were used: benchtop spectrometer working at X-band (9.4 GHz) with a B0 fields 3339.4 G, B0 sweep 293.84 G, sweep time 60 s, modulation amplitude 0.5, modulation frequency 100 kHz, modulation 5000 G, microwave attenuation 10 dB, gain 100. Spectra were quantified by peak amplitude measurement using the Miniscope software (control 6.51 and Analysis 2.02).

The results were normalized to protein quantities and expressed in EPR signal amplitude in arbitrary units (AU)/mg/ml of protein. After the reading of EPR spectra, protein quantities were measured by a Lowry-test (Lowry reagent, Sigma Aldrich) according to the manufacturer's recommendations.

2.8. Mitochondrial superoxide anion generation by confocal microscopy

Mitochondrial superoxide anion O₂^{•-} formation was assessed using MitoSOX™ red dye (ThermoFischer®) according to the manufacturer's recommendations. MitoSOX probe oxidation by superoxide anion

produces a red fluorescence. Fluorescence intensity is proportional to the rate of the probe oxidation (Tseng et al., 2015a).

HPAEC cells were seeded at 20,000 cells/cm² in a 96-well plate and cultured for 24 h, at 37 °C and 5% CO₂. After a 4 h-exposition with PM_{2.5}, at 37 °C and 5% CO₂, at different concentrations (5–15 µg/cm²), cells were incubated for 10 min at 37 °C, in the dark, with the MitoSOX™ probe (final concentration 5 µM) in a physiological salt solution (PSS) containing 130 mM NaCl, 5.6 mM KCl, 8 mM HEPES, 11 mM Glucose, 1 mM Mg²⁺ and 2 mM Ca²⁺; adjusted at pH = 7.4. In some experiments, MitoSOX™ probe was co-incubated with a mitochondrial probe (Mitotracker green - final concentration 1 µM) and a nucleus probe, Hoeschst 33342 (final concentration 2 µM) for colocalization experiments.

The plates were observed at × 600 magnification with an oil immersion objective on a laser scanning confocal microscope (TE 2000, Nikon). Fluorescence intensity were measured for MitoSOX at 543/605 nm, for Mitotracker at 488/515 nm and for Hoeschst at 408/450 nm (excitation/emission). The results are expressed in fluorescence intensity in absolute values.

The analyses were performed using NIS-Elements AR software 3.0 and Microsoft Office Excel 2007.

2.9. Nitric oxide and peroxynitrite productions

Nitric oxide (NO) and peroxynitrite (ONOO⁻) productions were assessed in HPAEC culture supernatants by Griess reaction according to the manufacturer's instructions (Molecular probes). HPAEC cells were seeded, in a 24-well culture plate at 20,000 cells/cm² and cultured for 24 h, at 37 °C and 5% CO₂. After a 4 h-exposure to PM_{2.5} (5–15 µg/cm²) the supernatants were collected and centrifuged at 1000g for 15 min for the NO determination. Levels of NO were quantified by measuring the stable metabolite of nitrite with Griess reagent according to the manufacturer's instructions (Molecular probes).

Supernatants were also used for the measurement of ONOO⁻. As peroxynitrites are rapidly transformed to nitrates, supernatants were first incubated with nitrate reductase (Cayman chemicals) to convert nitrates into nitrites. Levels of ONOO⁻ were then quantified from nitrites with Griess reagent according to the manufacturer's instructions (Molecular probes).

The absorbance of supernatants was measured at 550 nm by spectrophotometry using a microplate spectrophotometer reader (SPECTROstarNano2.10, BMG Labtech®, Germany).

Previously a standard curve was obtained using known concentrations of sodium nitrite (NaNO₂) and results were expressed in nanogram per microliter (ng/µl).

2.10. Cytosolic calcium measurement by confocal microscopy

Intracellular [Ca²⁺] was detected using the Fluo-4-AM dye (1-[2-amino-5-(2,7-difluoro-6-hydroxy-3-oxo-9-xanthenyl)phenoxy]-2-(2-amino-5-methylphenoxy) ethane-*N,N,N,N'*-tetraacetic acid, pentaacetoxymethyl ester) (ThermoFischer®). We first investigated the effect of PM_{2.5} on Fluo4 fluorescence with an acellular assay. Our results showed that PM_{2.5} did not interfere with the Fluo4 calcium assay (data not shown). Cells were seeded at 20,000 cell/cm² in a 96-well plate and cultured for 24 h, at 37 °C and 5% CO₂. HPAEC were exposed to the PM suspension (5–15 µg/cm²) for 4 h. After the exposure, cells were incubated for 30 min (in the dark) at 37 °C with 1 µM Fluo-4-AM probe in the PSS. Cells were rinsed three times with the PSS and 100 µl of this solution was added in each well for measurement by confocal laser microscope.

The plates were observed at × 200 magnification with an oil immersion objective. Cells were stimulated at 488 nm and emission was recorded at 515 nm. The results are expressed in fluorescence intensity in absolute values. The analyses were performed using NIS-Elements AR software 3.0 and Microsoft Office Excel 2007.

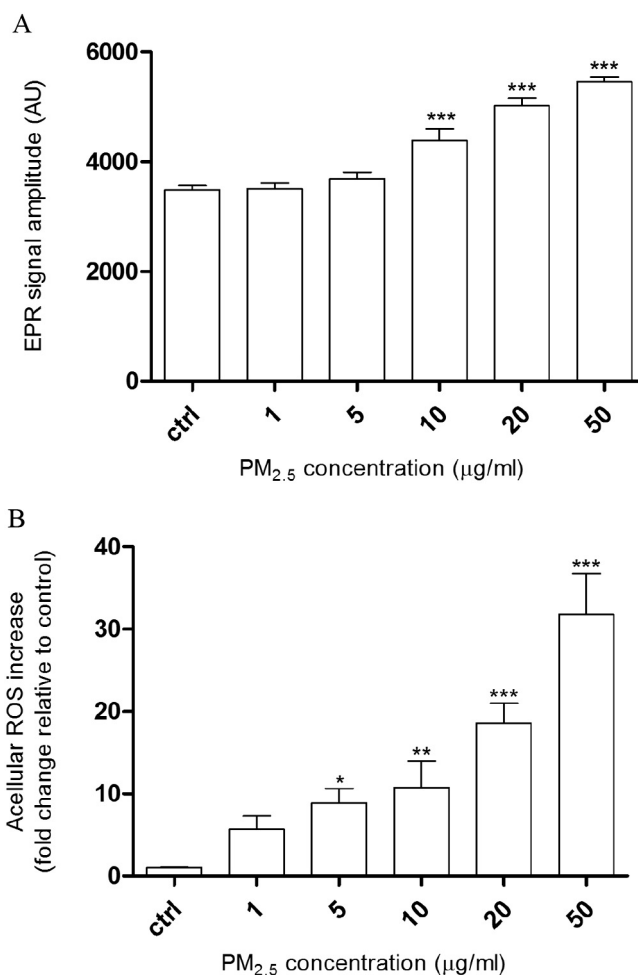


Fig. 1. PM_{2.5} intrinsic ROS production (acellular condition).

A: ROS production measured by spectrofluorimetry with the CM-H₂DCFDA probe assay. Water PM_{2.5} suspensions (1–50 µg/ml) were incubated with the probe for 1 h at 37 °C. The fluorescence intensity was measured by fluorimetry. Results were expressed in H₂O₂ equivalents (µM). The values were normalized to the control (ctrl) and expressed as the fold change of the CM-H₂DCF fluorescence intensity relative to the control (without treatment, ctrl). Data were mean ± SEM of three independent experiments, n = 3 (eight wells/concentration). Statistically significant at p < 0.05 (*), p < 0.01(**) and p < 0.001(***) as compared to controls, Mann-Whitney-U test.

B: Superoxide anion (O₂⁻) production measured by Electron Paramagnetic Resonance spectrometer with the CMH probe. PM_{2.5} (1–50 µg/ml) were incubated with the spin-probe mix: CMH, diethyldithiocarbamate and deferoxamine in Krebs-HEPES Buffer, for 1 h at 37 °C. Results were expressed in EPR signal amplitude in arbitrary unit (AU). Data were mean ± SEM of three independent experiments (n = 3) performed in triplicate. Statistically significant at p < 0.001(***) as compared to controls, Mann-Whitney-U test.

2.11. Statistical analysis

Each experimental condition was independently repeated three times and for each independent experiment 3 to 8 wells per condition were done. Data were expressed as mean ± Standard Error of the Mean (SEM) for 3 independent experiments (n = 3). Statistical analyses were performed using analysis of variance (one-way ANOVA) followed by Mann-Whitney-U test for multiple comparisons (*p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001) with GraphPad statistics software. p values < 0.05 were considered significant.

3. Results

3.1. PM_{2.5} increased intrinsic ROS production

The ability of PM_{2.5} to generate intrinsic reactive oxygen species

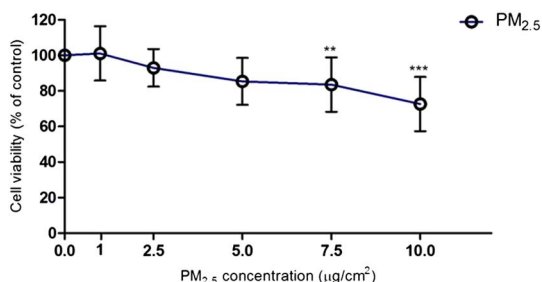


Fig. 2. HPAEC viability, after a 24 h incubation with PM_{2.5} (1–10 µg/cm²), measured by the WST-1 colorimetric assay. Cells were exposed for 24 h at 37 °C, 5% CO₂ to PM_{2.5}. Results were expressed as the percentage of cell viability in treated cells as compared to control cells (100%). Data were mean ± SEM of three independent experiments, n = 3 (eight wells/concentration). Statistically significant at p < 0.01(**) and p < 0.001(***), as compared to controls, Mann-Whitney-U test.

(ROS) was investigated through two different methods: oxidation of the CM-H₂DCFDA probe detected by fluorimetry and EPR technique to specifically measure superoxide anion.

PM_{2.5} induced a global ROS production in acellular condition (Fig. 1A). After a 1 h-incubation with the probe, PM_{2.5} (1–50 µg/ml) induced, in a concentration-dependent manner, a statistical significant increase of global ROS levels from 5 µg/ml (p < 0.001).

Furthermore, after a 1 h-incubation with the spin probe, PM_{2.5} (1–50 µg/ml) also induced specifically, and with a concentration-dependent pattern, a significant increase of acellular O₂^{•-} levels (p < 0.001), (Fig. 1B).

3.2. PM_{2.5} decreased HPAEC viability

To measure ROS production and intracellular calcium levels on HPAEC, we investigated first the non-toxic range of PM_{2.5} (mortality rate < 25%) that could be used based upon the WST-1 test. Cytotoxic assay was performed after a 24 h-treatment with PM.

Fig. 2 shows, that exposure of HPAEC to PM_{2.5} (1 to 10 µg/cm²) for 24 h, decreased concentration - dependently cell viability. Statistical significant reduction of cell viability was observed from 7.5 µg/cm² (p < 0.01, p < 0.001). At the highest concentration (10 µg/cm²), cell viability was decreased to no > 23.25% of control cells.

3.3. PM_{2.5} internalization in HPAEC

Transmission electronic microscopy (TEM) was performed to obtain information on the uptake and localization of PM_{2.5} in HPAEC exposed for 1 h to PM_{2.5} (7.5 µg/cm²). Representative micrographs are shown in Fig. 3. After a rapid internalization into cells, fine particles were mainly clustered into vesicles (Fig. 3B, C) but were also remained free in the cytoplasm (data not shown). Internalized PM was mainly organized in aggregates of various sizes but single or isolated particles were also observed. TEM images evidenced that PM was also localized very close to mitochondria (Fig. 3C), to the nucleus (Fig. 3B) and to the cytosolic membrane (data not shown).

3.4. PM_{2.5} increased HPAEC intracellular ROS production

Intracellular ability of PM_{2.5} to generate oxidative stress in cells was investigated through four different methods: oxidation of the CM-H₂DCFDA probe detected by fluorimetry for the evaluation of the global intracellular ROS production, the EPR technique to specifically determine PM_{2.5}-induced superoxide anion generation, the MitoSOX probe to measure more specifically oxidative stress produced in particular organelles such as mitochondria and the Griess reaction for the determination of NO and reactive nitrosative species (RNS) such as ONOO⁻.

3.4.1. Intracellular global ROS production (CM-H₂DCFDA)

Fig. 4 shows the concentration-dependent increase of ROS production by HPAEC in response to a 4 h-exposure to PM_{2.5} (5–15 µg/cm²). H₂O₂ (1 mM) was used as positive control. PM_{2.5} induced, with a concentration-dependent pattern, an increase of intracellular global ROS levels in HPAEC. At the highest concentrations (10 and 15 µg/cm²), the differences were significant as compared to control cells (respectively at p < 0.01, p < 0.001).

3.4.2. Intracellular superoxide anion (O₂^{•-}) production (EPR)

We have previously shown that PM_{2.5} induced intrinsic O₂^{•-} production (Fig. 1B) and intracellular ROS generation (Fig. 4). We investigated here by EPR the ability of these particles to generate O₂^{•-} production in HPAEC. A 4 h-exposure to PM_{2.5} (5–15 µg/cm²) induced, in a concentration-dependent manner, a statistical significant increase of intracellular O₂^{•-} levels in HPAEC from 7.5 µg/cm² (p < 0.01, p < 0.001) (Fig. 5).

3.4.3. PM_{2.5} increased mitochondrial superoxide anion O₂^{•-} production (MitoSOX probe)

We assessed the effects of PM_{2.5} on mitochondrial O₂^{•-} production by MitoSOX red probe.

Fig. 6A shows, in HPAEC, the concentration-dependent increase of mitochondrial O₂^{•-} production by HPAEC in response to a 4 h-exposure to PM_{2.5} (5–15 µg/cm²). Our results show that a 4 h-exposure to PM_{2.5} induced for all concentrations tested and in a concentration-dependent manner, a statistically significant rise in mitochondrial O₂^{•-} production in HPAEC compared to cell controls (p < 0.001). Fig. 6B and C show HPAEC cell imaging by confocal microscopy displaying an increase of mitochondrial MitoSOX probe red oxidation compared to control cells when cells were treated, for 4 h, with PM_{2.5} (10 µg/cm²). Some co-localization (yellow) between mitochondria (mitotracker green fluorescence) and O₂^{•-} (mitoSOX red fluorescence) were observed (Fig. 6C). Nuclei were stained with Hoechst (blue fluorescence).

3.4.4. PM_{2.5} increased peroxynitrites production (Griess reaction)

The effects of PM_{2.5} on NO production were first examined. Our results showed that a 4 h-exposure to PM_{2.5} (5–15 µg/cm²) induced in HPAEC with a concentration-dependent pattern, an increase of NO levels. At the highest concentrations (10 and 15 µg/cm²), the differences were significant as compared to control cells (p < 0.05*) (Fig. 7A). We have previously shown that, after a 4 h-exposure, PM_{2.5} induced intracellular O₂^{•-} production in HPAEC (Fig. 6A). Since NO can be oxidized by O₂^{•-} to form peroxynitrites (ONOO⁻), we measured here in HPAEC the peroxynitrite production by Griess reaction. Our results showed that a 4 h-exposure to PM_{2.5} (5–15 µg/cm²) induced for all concentrations tested and in a concentration-dependent manner, a statistically significant rise in ONOO⁻ production in HPAEC compared to control cells (p < 0.05* and p < 0.01**) (Fig. 7B). After a 1 h-pre-treatment of HPAEC with antioxidants enzymes such as polyethylene glycol-superoxide dismutase (PEG-SOD, 300 U/ml) and polyethylene glycol-catalase (PEG-CAT, 600 U/ml), followed by a 4 h-PM_{2.5} exposure (5–15 µg/cm²), no significant effect of PM_{2.5} on ONOO⁻ level was observed compared to control cells (Fig. 7B).

3.5. PM_{2.5} increased HPAEC cytoplasmic calcium levels [Ca²⁺]_i (Fluo-4-AM probe)

In a first set of experiments we investigated whether a 4 h-exposure to PM_{2.5} (5–15 µg/cm²) could increase cytoplasmic calcium level by calcium imaging (Fluo-4-AM probe). Fig. 8 shows, in HPAEC, a statistically significant and dose-dependent increase of the basal intracellular calcium ion level [Ca²⁺]_i (p < 0.05* and p < 0.001***). In a second set of experiments, and in order to elucidate whether the PM_{2.5}-induced impairment of intracellular calcium homeostasis was correlated to an increase of ROS production, the same experiments were performed

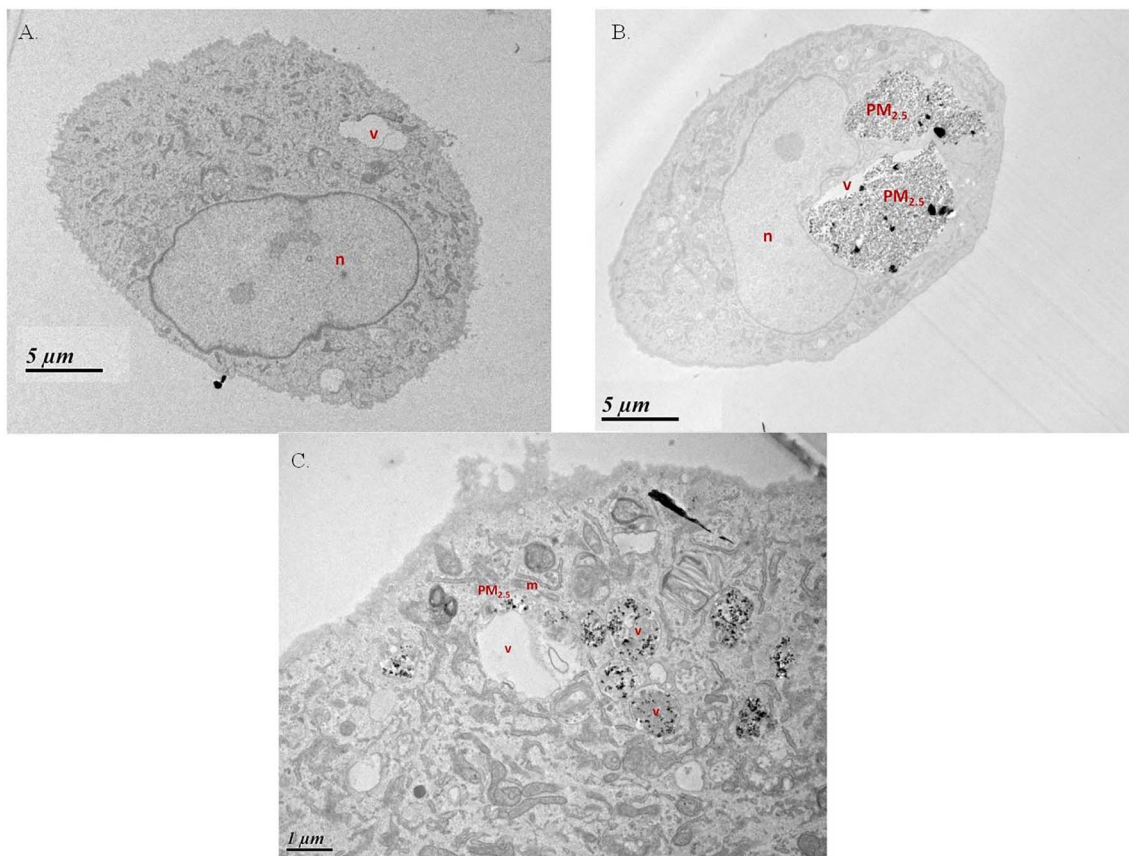


Fig. 3. PM_{2.5} internalization and intracellular localization in HPAEC, observed by transmission electronic microscopy (TEM). Cells were exposed, for 1 h, at 37 °C, 5% CO₂ with PM_{2.5} at 7.5 μg/cm². (A) Untreated cells, control (× 2900), (B) PM_{2.5} treated cells (× 2900) and (C) PM_{2.5} treated cells (× 11000). n correspond to the nucleus, m correspond to the mitochondria and v correspond to the vesicle. Scale bars, 5 μm (A, B) and 1 μm (C).

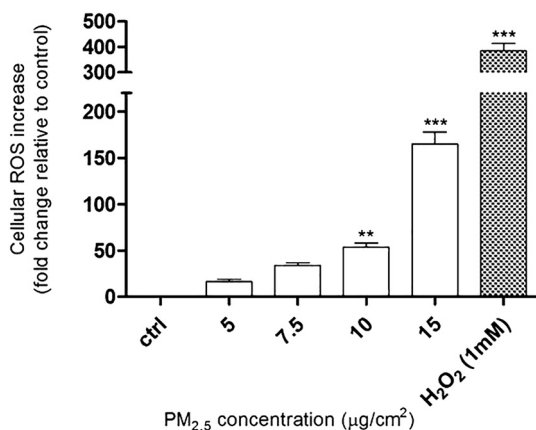


Fig. 4. Intracellular PM_{2.5}-induced ROS production in HPAEC, measured by spectrofluorimetry with the CMH₂DCF-DA probe assay. Cells were exposed or not (negative control) with PM_{2.5} (5–15 μg/cm²) or with H₂O₂ (1 mM, positive control) for 4 h at 37 °C and 5% CO₂. The fluorescence intensity was measured by fluorimetry. The values were normalized to the untreated cells (control, ctrl) and results were expressed as the fold change of the CMH₂DCF fluorescence intensity relative to the control cells. Data were mean ± SEM of three independent experiments, n = 3 (eight wells/concentration). Statistically significant at p < 0.01(**) and p < 0.001(***) as compared to controls, Mann-Whitney-U test.

using PEG-SOD (300 U/ml) and PEG-CAT (600 U/ml). After a 1 h-pre-treatment of HPAEC with both PEG-SOD and PEG-catalase, followed by a 4 h-PM_{2.5} exposure (5–15 μg/cm²), no significant effect of PM_{2.5} on basal intracellular calcium level was observed compared to control cells (Fig. 8).

Cells co-treated with PM_{2.5} and antioxidant enzymes fully reversed

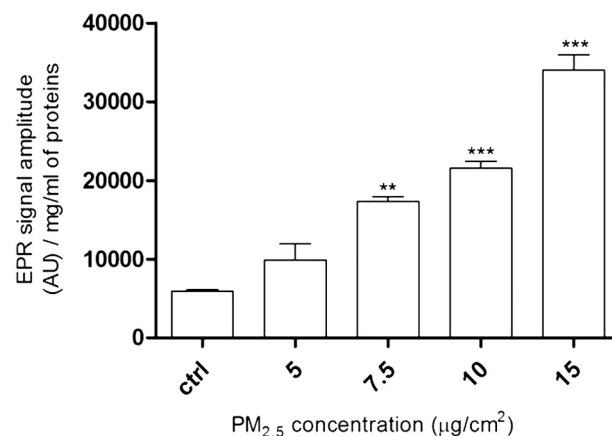


Fig. 5. Intracellular PM_{2.5}-induced O₂⁻ production in HPAEC, measured by EPR spectrometer with the CMH probe. Cells were exposed with PM_{2.5} (5–15 μg/cm²) for 4 h at 37 °C, 5% CO₂. Then, cells were incubated for 20 min with the spin-probe mix: CMH, diethyldithiocarbamate and deferoxamine in Krebs-HEPES Buffer. Protein concentration was performed with the Lowry test. Results were expressed in EPR signal amplitude in arbitrary unit (AU)/mg/ml of proteins. Data were mean ± SEM of three independent experiments (n = 3) performed in triplicate. Statistically significant at p < 0.01(**) and p < 0.001(***) as compared to controls, Mann-Whitney-U test.

the PM_{2.5}-induced increase in intracellular calcium basal level.

4. Discussion

An increased level of fine particles in the atmosphere is suspected to aggravate cardiovascular diseases. Primary particles, especially those from traffic (tail-pipe) emissions which are formed by combustion

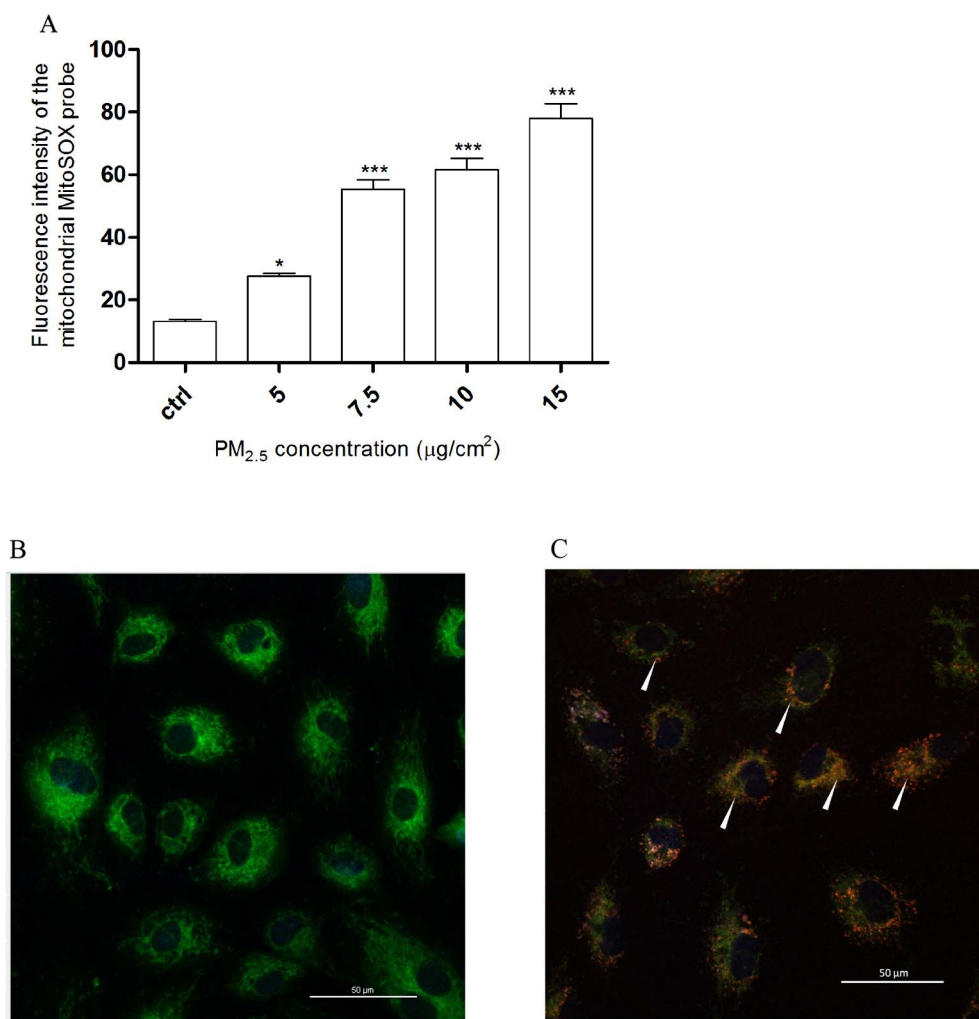


Fig. 6. Mitochondrial PM_{2.5}-induced O₂⁻ production in HPAEC, measured with the MitoSOX probe (5 µM), by confocal microscopy. Cells were exposed with PM_{2.5} (5–15 µg/cm²) for 4 h at 37 °C, 5% CO₂. (A) The mitochondrial O₂⁻ production was expressed as the oxidized MitoSOX fluorescence intensity and was compared to untreated cells (control, ctrl). Data were mean ± SEM of three independent experiments, n = 3 (six wells/concentration). Statistically significant at p < 0.05 (*), p < 0.001 (***) as compared to controls, Mann-Whitney-U test. (B, C) HPAEC cell imaging of MitoSOX probe oxidation by confocal microscopy. Cells were exposed, for 1 h, at 37 °C, 5% CO₂ with PM_{2.5} at 10 µg/cm² (B) untreated cells, control (× 600), (C) PM_{2.5} treated cells (× 600). Nucleus were stained with Hoechst (blue fluorescence), mitochondria with Mitotracker (green fluorescence) and mitochondrial superoxide anion with MitoSOX (red fluorescence). White arrows indicated some co-localization (yellow) between mitochondria (green) and O₂⁻ (red). Scale bars, 50 µm (B, C). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

processes of fossil fuel, are amongst the most harmful components of PM_{2.5} in urban environment (Hopke et al., 2006; Newby et al., 2015). This study focused for that purpose on PM_{2.5} sampled at a traffic site. Several studies provided evidence that ROS-induced oxidative damages in vascular cells play a major role in endothelial dysfunction and in the physiopathology of vascular diseases such as PH (Touyz and Schiffrin, 2004; Cioffi, 2011; Freund-Michel et al., 2013, 2014). Finally, only a few studies have investigated the direct effect of airborne particulate matter on pulmonary artery endothelial cells and the cellular mechanisms remain unclear. In the present study, the toxic effects of PM_{2.5} were investigated on HPAEC, which could be one of the primary target of inhaled particles, with a particular focus on (i) acellular and intracellular ROS and RNS generation, (ii) PM_{2.5} intracellular uptake and (iii) calcium homeostasis.

ROS and RNS were measured by different methods. The fluorimetric method using the CM-H₂DCFDA probe is a powerful assay, easy to carry out, and can detect different reactive oxygen species generated by particles (Cohn et al., 2008). This probe was used extensively to analyze global acellular and intracellular oxidative stress (Foucaud et al., 2007; Chen et al., 2010; Tseng et al., 2015b) but does not allow determining specific free radicals. The EPR method is an alternative to determine specific oxygen species (O₂⁻, ONOO⁻, OH•...) but requires an expensive instrumentation (Billaud et al., 2009; Dikalov et al., 2011; Nymark et al., 2014). As O₂⁻ can be scavenged by NO to form ONOO⁻, we also measured ONOO⁻ levels in HPAEC with Griess reaction as an alternative method to investigate PM_{2.5}-induced O₂⁻ increase (Genet et al., 2017). To measure more specifically oxidative stress produced in mitochondria we used confocal microscopy

techniques with the MitoSOX probe (Li et al., 2009; Tseng et al., 2015a). Combining these different methods, we demonstrated that the oxidative stress mediated by PM_{2.5} originated from several sources. Firstly we demonstrated that, in acellular conditions, different ROS and, in particular, free radical such as O₂⁻ were generated by PM_{2.5} themselves, in a concentration dependent manner, before any contact with HPAEC. These data are in line with those found in the literature for PM_{2.5} sampled at different sites or with nanoparticles (Dellinger et al., 2001; Latvala et al., 2016). Secondly, we tested the hypothesis that PM_{2.5} are able to generate an oxidative stress after they were taken up by cells (i.e. PM_{2.5} internalization into cells). We provided evidence that these particles were quickly (within 1 h) internalized into HPAEC mainly in vesicles or free in the cytoplasm. Some of them were found very close to the cytosolic membrane, to the nucleus and to mitochondria.

We then showed, that PM_{2.5} and/or their soluble components, could induce an intracellular oxidative stress in a concentration dependant manner. In HPAEC, particles induced (i) a global overproduction of ROS such as H₂O₂ mainly detected by the fluorescent probe CM-H₂DCFDA (up to 10 µg/cm²), (ii) an increase in some free radicals, in particular the superoxide anion specifically measured by EPR (up to 7.5 µg/cm²) and (iii) an overproduction of NO and RNS such as ONOO⁻ measured by the Griess reaction (up to 7.5 µg/cm²). These findings suggest that PM_{2.5}-induced oxidative stress could be correlated to their internalization. These data are in line with those from the literature with silica nanoparticles, diesel and urban SRM 1648-particles (Bai et al., 2001; Li et al., 2006; Guo et al., 2015).

The presence of PM near to mitochondria of exposed cells and the

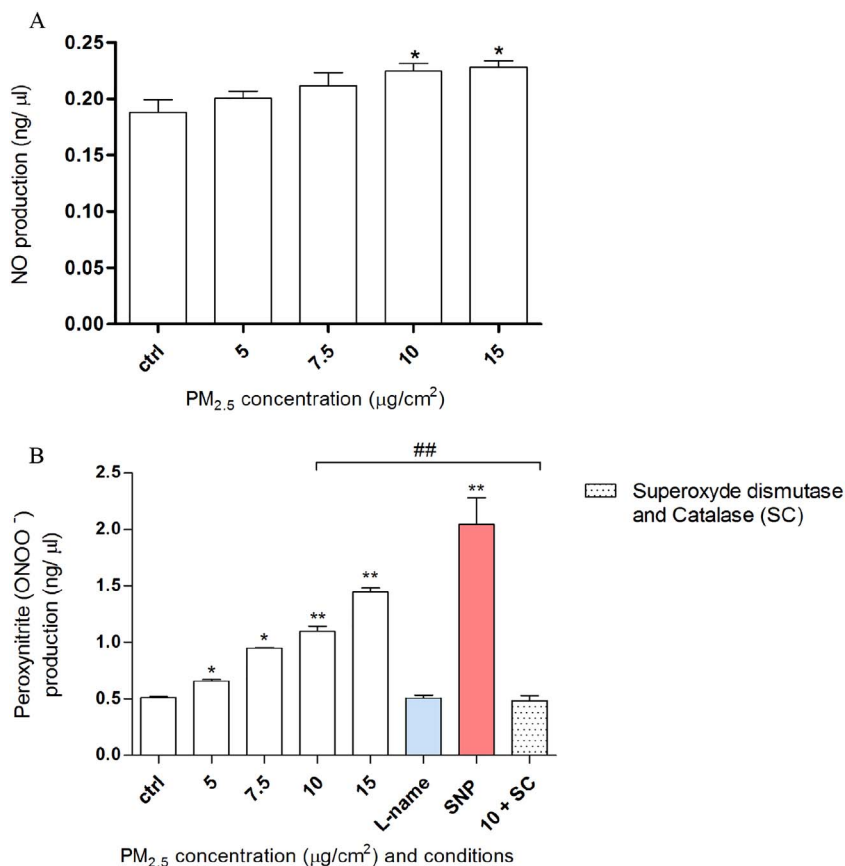


Fig. 7. Intracellular PM_{2.5}-induced RNS (NO and ONOO⁻) production in HPAEC, measured by the Griess reaction. Cells were exposed or not (negative control) with PM_{2.5} (5–15 μg/cm²) for 4 h at 37 °C and 5% CO₂. A: NO production in HPAEC. The results were expressed in ng/μl. Data were mean ± SEM of three independent experiments, n = 3 (three wells/concentration). Statistically significant at p < 0.05 (*) as compared to controls, Mann-Whitney-U test.

B: ONOO⁻ production in HPAEC after or not a 1 h pre-treatment with PEG-SOD (300 U/ml) and PEG-catalase (600 U/ml). The NO-donor sodium nitroprusside (SNP, 10⁻⁴ M) and the NO synthase inhibitor NG-L-Nitro Arginine Methyl Ester (L-Name, 10⁻⁴ M) were used respectively as positive and as negative controls. The results were expressed in ng/μl. Data were mean ± SEM of three independent experiments, n = 3 (three wells/concentration). Statistically significant at p < 0.05 (*) and p < 0.01(**) as compared to controls, Mann-Whitney-U test. Statistically significant at p < 0.01(##) between cells treated with PM_{2.5} at 10 μg/cm² and cells pre-treated with antioxidant enzymes followed by treatment with PM_{2.5} at 10 μg/cm², Mann-Whitney-U test.

overproduction of intracellular ROS suggest that functions of this organelle could be disturbed. In order to confirm this hypothesis, mitochondria-specific ROS production was assessed, in HPAEC, by confocal microscopy, after exposure to PM_{2.5}. Our results showed an increase of mitochondria endogenous superoxide anion production from 5 μg/cm². These results are in accordance with those reported in the literature in aortic and umbilical endothelial cells (Li et al., 2009; Tseng et al., 2015a).

Interestingly, for these concentrations, PM_{2.5} induced in HPAEC a slight decrease of mitochondrial activity (measured by the WST-1 assay) at 24 h which could be correlated to over production of mitochondrial superoxide anion observed after 4 h exposure.

Overall, these results indicate that no single assay was completely predictive of oxidative stress and confirm the interest of using various complementary assays for studying PM_{2.5}-induced ROS generation. These results also suggest that, at the lowest concentrations (5 μg/cm²), the confocal microscopy assay using MitoSOX probe was a better

predictor of oxidative stress than any of the other assays. In conclusion, this study provided evidence that PM_{2.5} contain stable free radicals and could generate intracellular ROS and RNS that can easily be detected by these methods.

The detailed chemical composition of PM_{2.5} is not available. But the physicochemical properties of PM_{2.5} sampled at the same traffic site were already well characterized in previous studies (Baulig et al., 2004, Val et al., 2011). As it is a site of sampling near traffic, particles are mainly composed by tail-pipe carbonaceous material, namely elemental carbon (EC), organic matter (OM), and PAHs (mainly pyrene, benzo(e) pyrene, benzo(a)anthracene and chrysene) but also include trace metals from non-tail-pipe (break wears) traffic emissions (mainly Fe, Cu, Mn, Pb, Mo, Sb, Sn). After PM_{2.5} inhalation these carbonaceous and trace metal components could be solubilized by macrophages and surfactants in pulmonary alveoli and could directly alter endothelial cells by inducing ROS production after cytochrome P450 1A1 (CYP1A1)-induced metabolism. PAHs are known to specifically induce CYP1A1, a

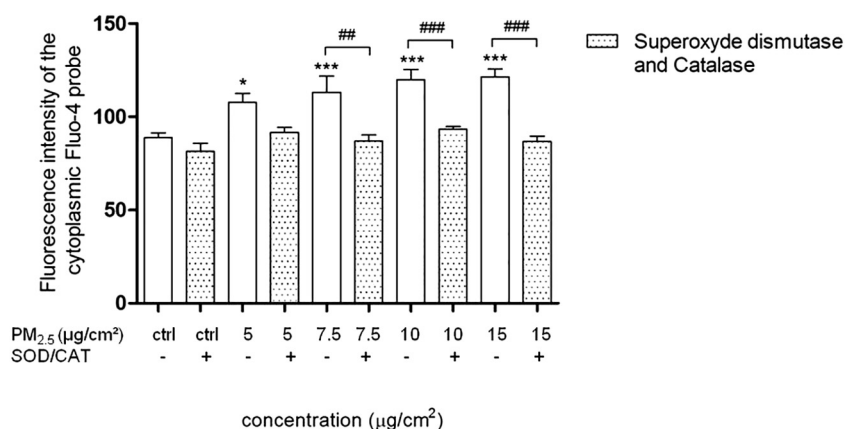


Fig. 8. Intracellular basal Ca²⁺ level in HPAEC, measured with Fluo-4-AM probe (1 μM), by confocal microscopy. Cells were exposed to PM_{2.5} (5–15 μg/cm²) for 4 h at 37 °C and 5% CO₂, after or not a 1 h pre-treatment with PEG-SOD (300 U/ml) and PEG-catalase (600 U/ml). The basal Ca²⁺ level was expressed as the fluorescence intensity of the Fluo-4 probe and was compared to untreated cells (control, ctrl). Data were mean ± SEM of three independent experiments, n = 3 (six wells/concentration). Statistically significant at p < 0.05 (*) and p < 0.001(***) as compared to controls. Statistically significant at p < 0.01(##) and p < 0.001(###) as compared to cells pre-treated with antioxidant enzymes, Mann-Whitney-U test.

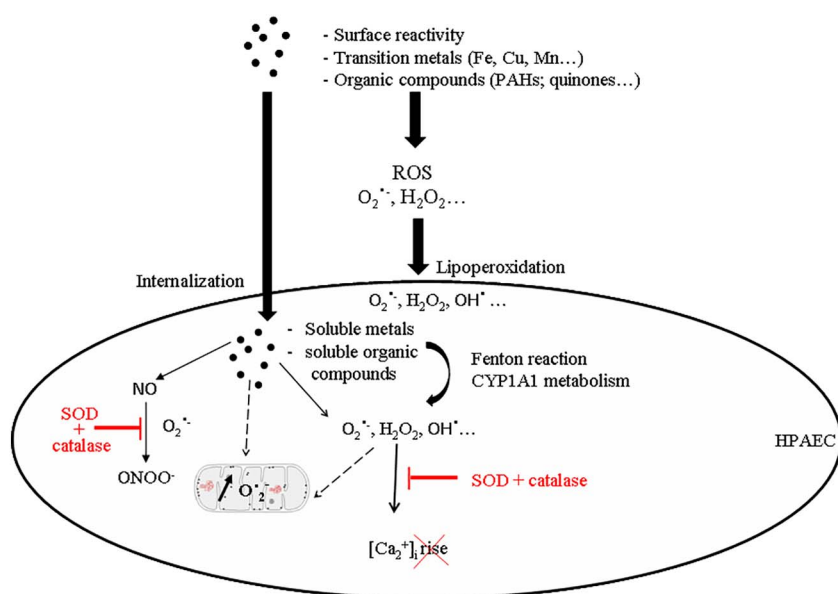


Fig. 9. Summary of hypothetical PM_{2.5} oxidative stress-mediated impairment of calcium homeostasis leading to vascular health disease.

phase I xenobiotic metabolizing enzymes producing superoxide anions and reactive intermediates (Squadrito et al., 2001; Baulig et al., 2009; Val et al., 2011; Boubilil et al., 2013). Previous study showed, in bronchial epithelial cells, that the expression of the CYP1A1 gene was highly induced by PAH-containing PM_{2.5} sampled at urban traffic sites (Val et al., 2011). Quinones were also involved in ROS generation due to redox cycling. The oxidative capacity of PM_{2.5} could also be attributed to their transition metal constituents mainly to iron and copper that could generate ROS (O₂^{•-}, H₂O₂, OH[•]) through the Fenton and Harber-Weiss reaction (Donaldson et al., 1997, 2004). In a previous study, we showed that metals and in particular iron contained in particulate matter such as SRM 1648 were involved in particles-induced vascular deleterious effects (Courtois et al., 2014). Furthermore, metals and PAHs could present additive or synergistic interactions with particle surface area. Finally, PM_{2.5} induced-intracellular ROS production could then occur as the result of free radicals production at the surface of the particles or by soluble harmful components such as metals or organics that are likely to be involved in vascular diseases (Donaldson et al., 2004; Ayres et al., 2008; Thomson et al., 2016). Additionally, once internalized in the cells, particles could also generate oxidative stress by direct effects on cells that are not driven by intrinsic free radicals, such as depletion of antioxidants (SOD, catalase), inflammatory response, alteration in mitochondrial respiration... which could indirectly induce oxidative stress (Ayres et al., 2008). Further experiments are necessary to address the mechanisms involved in PM_{2.5}-induced ROS production.

Several studies provided evidence that ROS/RNS-induced oxidative damages in vascular cells play a major role in endothelial dysfunction and in the physiopathology of vascular diseases. Endothelial NO is a major vasculoprotective agent and it plays a very important role as a major secondary messenger in vascular signaling pathway. NO exerts many effects on the organism, either beneficial or deleterious. Beneficial ones are mainly mediated by NO itself generated at low concentrations by endothelial NO-synthases in a regulated manner. By contrast, prolonged or high-output inducible NOS-derived NO may exert both oxidative and nitrosative stress through peroxynitrite. Therefore, we investigated, in the present study, the ability of PM_{2.5} to impair NO signaling pathway. We demonstrated that a 4 h-exposure to PM_{2.5} stimulated a concentration-dependent increase in NO content especially at the highest concentrations (10 and 15 µg/cm²). Similarly, Guo et al. (2015) demonstrated that silica nanoparticles stimulated NO release in endothelial cells. Interestingly, we also showed that the PM_{2.5}-generated O₂^{•-} rapidly reacted with NO to produce a highly

reactive and cytotoxic nitrosative specie such as ONOO⁻ and could change the balance of [NO]/[ONOO⁻] unfavorably leading to NO-bioavailability decrease. Indeed, PM_{2.5}-induced ONOO⁻ overproduction was strongly reduced by a pre-treatment with both superoxide dismutase and catalase, two antioxidant enzymes.

It is now well established that, in many vascular diseases, oxidative stress causes a [Ca²⁺]_i-increase due to calcium entry across plasma membrane as well as calcium release from intracellular stores (Cioffi, 2011; Dubes et al., 2017). Recent studies (Simon et al., 2011; Nemmar et al., 2015; Neri et al., 2016; Dubes et al., 2017) have also reported that ultrafine particles as well as particulate matter increase intracellular [Ca²⁺]_i although the underlying mechanisms have been poorly described in particular in pulmonary artery endothelial cells. Therefore, we investigated, in the present study, the ability of PM_{2.5} to increase [Ca²⁺]_i levels via ROS production. We demonstrated that a 4 h-exposure to PM_{2.5} induce a concentration-dependent increase of the basal [Ca²⁺]_i in HPAEC. It was interesting to note that this effect was raised after a 24 h-exposure of PM_{2.5} to HPAEC (data not shown) suggesting a time-dependent response. This impairment of calcium homeostasis was strongly reduced by a pre-treatment with both superoxide dismutase and catalase suggesting that PM_{2.5}-induced alteration of intracellular calcium homeostasis was closely correlated to an increase of O₂^{•-} and H₂O₂. Several studies performed in animal models that mimic PH, have reported that the intracellular [Ca²⁺]_i in vascular cells was increased in this disease (Rodat et al., 2007; Ducret et al., 2010; Gilbert et al., 2014). Consequently, an additive or synergistic effect in calcium homeostasis is likely to occur after exposure to PM_{2.5} particles in PH.

In summary, the oxidative stress mediated by PM_{2.5} originates from several sources involving (i) intrinsic generation of ROS from the surface of particles (ii) initiation of free radical chain reaction by extracellular ROS such as lipid peroxidation (iii) internalization of PM (vi) soluble transition metals and organic compounds (v) alteration of mitochondrial function and production of superoxide anion from the mitochondrial electron transport chain. These results are summarized in Fig. 9.

In conclusion, this study provides evidence that PM_{2.5}-induced both oxidative and nitrosative species in HPAEC causes redox imbalance and seems to be an important molecular mechanism for endothelial dysfunction leading to impairment of calcium signaling and NO bioavailability which are the main characteristics of hypertensive disease. Thus, exposure to PM_{2.5} may be a risk factor for the exacerbation of pre-existent cardiovascular diseases such as PH.

Transparency document

The <http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2017.07.001> associated with this article can be found, in online version.

Acknowledgments

This work was supported by the “Agence de l’environnement et de la Maîtrise de l’Energie” – ADEME under grant 12 62 c 0037, the “Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l’Alimentation, de l’Environnement et du Travail” – ANSES under grant no 2012-2-013. The PhD of Juliette DEWEIRD is supported by the “Fondation pour la Recherche Médicale” – FRM.

References

- Ayres, J.G., Borm, P., Cassee, F.R., Castranova, V., Donaldson, K., Ghio, A., Harrison, R.M., Hider, R., Kelly, F., Kooter, I.M., Marano, F., Maynard, R.L., Mudway, I., Nel, A., Sioutas, C., Smith, S., Baeza-Squiban, A., Cho, A., Duggan, S., Froines, J., 2008. Evaluating the toxicity of airborne particulate matter and nanoparticles by measuring oxidative stress potential—a workshop report and consensus statement. *Inhal. Toxicol.* 20, 75–99.
- Bai, Y., Suzuki, A.K., Sagai, M., 2001. The cytotoxic effects of diesel exhaust particles on human pulmonary artery endothelial cells in vitro: role of active oxygen species. *Free Radic. Biol. Med.* 30, 555–562.
- Barrier, M., Bégorre, M.A., Baudrimont, I., Dubois, M., Freund-Michel, V., Marthan, R., Savineau, J.P., Muller, B., Courtois, A., 2016. Involvement of Heme Oxygenase-1 in particulate matter-induced impairment of NO-dependent relaxation in rat intralobar pulmonary arteries. *Toxicol. in Vitro* 32, 205–211.
- Baulig, A., Poirault, J.J., Ausset, P., Schins, R., Shi, T., Baralle, D., Dorlhene, P., Meyer, M., Lefevre, R., Baeza-Squiban, A., Marano, F., 2004. Physicochemical characteristics and biological activities of seasonal atmospheric particulate matter sampling in two locations of Paris. *Environ. Sci. Technol.* 15(38) (22), 5985–5992.
- Baulig, A., Singh, S., Marchand, A., Schins, R., Barouki, R., Garlatti, M., Marano, F., Baeza-Squiban, A., 2009. Role of Paris PM (2.5) components in the pro-inflammatory response induced in airway epithelial cells. *Toxicology* 261, 126–135.
- Beelen, R., Stafoggia, M., Raaschou-Nielsen, O., Andersen, Z.J., Xun, W.W., Katsouyanni, K., Dimakopoulou, K., Brunekreef, B., Weinmayr, G., Hoffmann, B., Wolf, K., Samoli, E., Houthuijs, D., Nieuwenhuijsen, M., Oudin, A., Forsberg, B., Olsson, D., Salomaa, V., Lanki, T., Yli-Tuomi, T., Oftedal, B., Aamodt, G., Nafstad, P., De Faire, U., Pedersen, N.L., Östenson, C.G., Fratiglioni, L., Penell, J., Korek, M., Pyko, A., Eriksen, K.T., Tjønneland, A., Becker, T., Eeftens, M., Bots, M., Meliefste, K., Wang, M., Bueno-de-Mesquita, B., Sugiri, D., Krämer, U., Heinrich, J., de Hoogh, K., Key, T., Peters, A., Cyrys, J., Concin, H., Nagel, G., Ineichen, A., Schaffner, E., Probst-Hensch, N., Dratva, J., Ducret-Stich, R., Villier, A., Clavel-Chapelon, F., Stempfelet, M., Grioni, S., Krogh, V., Tsai, M.Y., Marcon, A., Ricceri, F., Sacerdote, C., Galassi, C., Migliore, E., Ranzi, A., Cesaroni, G., Badaloni, C., Forastiere, F., Tamayo, I., Amiano, P., Dorronsoro, M., Katsoulis, M., Trichopoulos, A., Vineis, P., Hoek, G., 2014. Long-term exposure to air pollution and cardiovascular mortality: an analysis of 22 European cohorts. *Epidemiology* 25, 368–378.
- Bellavia, A., Urch, B., Speck, M., Brook, R.D., Scott, J.A., Albeti, B., Behbod, B., North, M., Valeri, L., Bertazzi, P.A., Silverman, F., Gold, D., Baccarelli, A.A., 2013. DNA hypomethylation, ambient particulate matter, and increased blood pressure: findings from controlled human exposure experiments. *J. Am. Heart Assoc.* 2, e000212.
- Billaud, M., Marthan, R., Savineau, J.P., Guibert, C., 2009. Vascular smooth muscle modulates endothelial control of vasoreactivity via reactive oxygen species production through myoendothelial communications. *PLoS One* 4, e6432.
- Boublil, L., Assémat, E., Borot, M.C., Boland, S., Martinon, L., Sciare, J., Baeza-Squiban, A., 2013. Development of a repeated exposure protocol of human bronchial epithelium in vitro to study the long-term effects of atmospheric particles. *Toxicol. in Vitro* 27, 533–542.
- Calderón-Garcidueñas, L., Mora-Tiscareño, A., Fordham, L.A., Chung, C.J., García, R., Osnaya, N., Hernández, J., Acuña, H., Gambling, T.M., Villarreal-Calderón, A., Carson, J., Koren, H.S., Devlin, R.B., 2001. Canines as sentinel species for assessing chronic exposures to air pollutants: part 1. *Toxicol. Sci.* 61, 342–355.
- Calderón-Garcidueñas, L., Vincent, R., Mora-Tiscareño, A., Franco-Lira, M., Henríquez-Roldán, C., Barragán-Mejía, G., Garrido-García, L., Camacho-Reyes, L., Valencia-Salazar, G., Paredes, R., Romero, L., Osnaya, H., Villarreal-Calderón, R., Torres-Jardón, R., Hazucha, M.J., Reed, W., 2007. Elevated plasma endothelin-1 and pulmonary arterial pressure in children exposed to air pollution. *Environ. Health Perspect.* 115, 1248–1253.
- Chen, X., Zhong, Z., Xu, Z., Chen, L., Wang, Y., 2010. 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein as a fluorescent probe for reactive oxygen species measurement: forty years of application and controversy. *Free Radic. Res.* 44, 587–604.
- Chen, E.Y., Garnica, M., Wang, Y.C., Chen, C.S., Chin, W.C., 2011. Mucin secretion induced by titanium dioxide nanoparticles. *PLoS One* 6, e16198.
- Chen, H., Burnett, R.T., Kwong, J.C., Villeneuve, P.J., Goldberg, M.S., Brook, R.D., van Donkelaar, A., Jerrett, M., Martin, R.V., Kopp, A., Brook, J.R., Copes, R., 2014. Spatial association between ambient fine particulate matter and incident hypertension. *Circulation* 129, 562–569.
- Cioffi, L.D., 2011. Redox regulation of endothelial canonical transient receptor potential channels. *Antioxid. Redox Signal.* 15, 1567–1582.
- Cohn, C.A., Simon, S.R., Schoonen, M.M.A., 2008. Comparison of fluorescence-based techniques for the quantification of particle-induced hydroxyl radicals. *Part. Fibre Toxicol.* 5, 2.
- Courtois, A., Andujar, P., Ladeiro, Y., Baudrimont, I., Delannoy, E., Leblais, V., Begueret, H., Galland, M.A., Brochard, P., Marano, F., Marthan, R., Muller, B., 2008. Impairment of NO-dependent relaxation in intralobar pulmonary arteries: comparison of urban particulate matter and manufactured nanoparticles. *Environ. Health Perspect.* 116, 1294–1299.
- Courtois, A., Andujar, P., Ladeiro, Y., Ducret, T., Rogerieux, F., Lacroix, G., Baudrimont, I., Guibert, C., Roux, E., Canal-Raffin, M., Brochard, P., Marano, F., Marthan, R., Muller, B., 2010. Effect of engineered nanoparticles on vasomotor responses in rat intrapulmonary artery. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 245, 203–210.
- Courtois, A., Prouillac, A., Baudrimont, I., Ohayon-Courtes, C., Freund-Michel, V., Dubois, M., Lisbonne-Autissier, M., Marthan, R., Savineau, J.P., Muller, B., 2014. Characterization of the components of urban particulate matter mediating impairment of nitric oxide-dependent relaxation in intrapulmonary arteries. *J. Appl. Toxicol.* 34, 667–674.
- Dellinger, B., Pryor, W.A., Cueto, R., Squadrito, G.L., Hegde, V., Deutsch, W.A., 2001. Role of free radicals in the toxicity of airborne fine particulate matter. *Chem. Res. Toxicol.* 14, 1371–1377.
- Deschacht, M., Horemans, T., Martinet, W., Bult, H., Maes, L., Cos, P., 2010. Comparative EPR study of different macrophage types stimulated for superoxide and nitric oxide production. *Free Radic. Res.* 44, 763–772.
- Dikalov, S.I., Kirilyuk, I.A., Voinov, M., Grigoriev, I.A., 2011. EPR detection of cellular and mitochondrial superoxide using cyclic hydroxylamines. *Free Radic. Res.* 45, 417–430.
- Donaldson, K., Brown, D.M., Mitchell, C., Dineva, M., Beswick, P.H., Gilmour, P., MacNee, W., 1997. Free radical activity of PM10: iron-mediated generation of hydroxyl radicals. *Environ. Health Perspect.* 105, 1285–1289.
- Donaldson, K., Jimenez, L.A., Rahman, I., Faux, S.P., MacNee, W., Gilmour, P.S., Borm, P.J.A., Schins, R.P.F., Shi, T., Stone, V., 2004. Respiratory health effects of ambient air pollution particles: role of reactive species. In: *Oxygen/Nitrogen Radicals*, pp. 257–288.
- Dubes, V., Parpaite, T., Ducret, T., Quignard, J.F., Mornet, S., Reinhardt, N., Baudrimont, I., Dubois, M., Freund-Michel, V., Marthan, R., Muller, B., Savineau, J.P., Courtois, A., 2017. Calcium signalling induced by in vitro exposure to silicon dioxide nanoparticles in rat pulmonary artery smooth muscle cells. *Toxicology* 375, 37–47.
- Ducret, T., El Arrouchi, J., Courtois, A., Quignard, J.F., Marthan, R., Savineau, J.P., 2010. Stretch-activated channels in pulmonary arterial smooth muscle cells from normoxic and chronically hypoxic rats. *Cell Calcium* 48, 251–259.
- Foucaud, L., Wilson, M.R., Brown, D.M., Stone, V., 2007. Measurement of reactive species production by nanoparticles prepared in biologically relevant media. *Toxicol. Lett.* 174, 1–9.
- Freund-Michel, V., Guibert, C., Dubois, M., Courtois, A., Marthan, R., Savineau, J.P., Muller, B., 2013. Reactive oxygen species as therapeutic targets in pulmonary hypertension. *Ther. Adv. Respir. Dis.* 7, 175–200.
- Freund-Michel, V., Khoyratte, N., Savineau, J.P., Muller, B., Guibert, C., 2014. Mitochondria: roles in pulmonary hypertension. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 55, 93–97.
- Genet, N., Billaud, M., Rossignol, R., Dubois, M., Gilibert-Duplantier, J., Isakson, B.E., Marthan, R., Savineau, J.P., Guibert, C., 2017. Signaling pathways linked to serotonin-induced superoxide anion production: a physiological role for mitochondria in pulmonary arteries. *Front. Physiol.* 8, 1–11.
- Gilbert, G., Ducret, T., Marthan, R., Savineau, J.P., Quignard, J.F., 2014. Stretch-induced Ca²⁺ signalling in vascular smooth muscle cells depends on Ca²⁺ store segregation. *Cardiovasc. Res.* 103, 313–323.
- Guibert, C., Marthan, R., Savineau, J.P., 2007. Modulation of ion channels in pulmonary arterial hypertension. *Curr. Pharm. Des.* 13, 2443–2455.
- Guo, C., Xia, Y., Niu, P., Jiang, L., Duan, J., Yu, Y., Zhou, X., Li, Y., Sun, Z., 2015. Silica nanoparticles induce oxidative stress, inflammation, and endothelial dysfunction in vitro via activation of the MAPK/Nrf2 pathway and nuclear factor- κ B signaling. *Int. J. Nanomedicine* 10, 1463–1477.
- Hopke, P.K., Ito, K., Mar, T., Christensen, W.F., Eatough, D.J., Henry, R.C., Kim, E., Laden, F., Lall, R., Larson, T.V., Liu, H., Neas, L., Pinto, J., Stölzel, M., Suh, H., Paatero, P., Thurston, G.D., 2006. PM source apportionment and health effects: 1. Intercomparison of source apportionment results. *J. Expo. Sci. Environ. Epidemiol.* 16, 275–286.
- Janssen, N.A., Yang, A., Strak, M., Steenhof, M., Hellack, B., Gerlofs-Nijland, M.E., Kuhlbusch, T., Kelly, F., Harrison, R., Brunekreef, B., Hoek, G., Cassee, F., 2014. Oxidative potential of particulate matter collected at sites with different source characteristics. *Sci. Total Environ.* 472, 572–581.
- Könczöl, M., Goldenberg, E., Ebeling, S., Schäfer, B., Garcia-Käufer, M., Gminski, R., Grobety, B., Rothen-Rutishauser, B., Merfort, I., Gieré, R., Mersch-Sundermann, V., 2012. Cellular uptake and toxic effects of fine and ultrafine metal-sulfate particles in human A549 lung epithelial cells. *Chem. Res. Toxicol.* 25, 2687–2703.
- Kreyling, W.G., Semmler, M., Erbe, F., Mayer, P., Takenaka, S., Schulz, H., Oberdörster, G., Ziesenis, A., 2002. Translocation of ultrafine insoluble iridium particles from lung epithelium to extrapulmonary organs is size dependent but very low. *J. Toxicol. Environ. Health A* 65, 1513–1530.
- Lai, N., Lu, W., Wang, J., 2015. Ca(2+) and ion channels in hypoxia-mediated pulmonary hypertension. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 8, 1081–1092.
- Latvala, S., Hedberg, J., Di Bucchianico, S., Möller, L., Odnevall Wallinder, I., Elihn, K., Karlsson, H.L., 2016. Nickel release, ROS generation and toxicity of Ni and NiO micro- and nanoparticles. *PLoS One* 11, e0159684.
- Lee, B.J., Kim, B., Lee, K., 2014. Air pollution exposure and cardiovascular disease. *Toxicol. Res.* 30, 71–75.

- Li, Z., Hyseni, X., Carter, J.D., Soukup, J.M., Dailey, L.A., Huang, Y.C., 2006. Pollutant particles enhanced H₂O₂ production from NAD(P)H oxidase and mitochondria in human pulmonary artery endothelial cells. *Am. J. Phys.* 291, 357–365.
- Li, R., Ning, Z., Cui, J., Khalsa, B., Ai, L., Takabe, W., Beebe, T., Majumdar, R., Sioutas, C., Hsiai, T., 2009. Ultrafine particles from diesel engines induce vascular oxidative stress via JNK activation. *Free Radic. Biol. Med.* 46, 775–782.
- Mahne, S., Chuang, G.C., Pankey, E., Kiruri, L., Kadowitz, P.J., Dellinger, B., Varner, K.J., 2012. Environmentally persistent free radicals decrease cardiac function and increase pulmonary artery pressure. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 303, H1135–H1142.
- Martin, E., Dahan, D., Cardouat, G., Gillibert-Duplantier, J., Marthan, R., Savineau, J.P., Ducret, T., 2012. Involvement of TRPV1,4 channels in migration of rat pulmonary arterial smooth muscle cells. *Pflugers Arch.* 464, 261–272.
- Mills, N.L., Donaldson, K., Hadoke, P.W., Boon, N.A., MacNee, W., Cassee, F.R., Sandström, T., Blomberg, A., Newby, D.E., 2009. Adverse cardiovascular effects of air pollution. *Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med.* 6, 36–44.
- Mills, N.L., Miller, M.R., Lucking, A.J., Beveridge, J., Flint, L., Boere, A.J., Fokkens, P.H., Boon, N.A., Sandstrom, T., Blomberg, A., Duffin, R., Donaldson, K., Hadoke, P.W., Cassee, F.R., Newby, D.E., 2011. Combustion-derived nanoparticulate induces the adverse vascular effects of diesel exhaust inhalation. *Eur. Heart J.* 32, 2660–2671.
- Morishita, M., Bard, R.L., Wang, L., Das, R., Dvornch, J.T., Spino, C., Mukherjee, B., Sun, Q., Harkema, J.R., Rajagopalan, S., Brook, R.D., 2015. The characteristics of coarse particulate matter air pollution associated with alterations in blood pressure and heart rate during controlled exposures. *J. Expo. Sci. Environ. Epidemiol.* 25, 153–159.
- Nemmar, A., Hoet, P.H., Vanquickenborne, B., Dinsdale, D., Thomeer, M., Hoylaerts, M.F., Vanbilloen, H., Mortelmans, L., Nemery, B., 2002. Passage of inhaled particles into the blood circulation in humans. *Circulation* 105, 411–414.
- Nemmar, A., Holme, J.A., Rosas, I., Schwarze, P.E., Alfaro-Moreno, E., 2013. Recent advances in particulate matter and nanoparticle toxicology: a review of the in vivo and in vitro studies. *Biomed. Res. Int.* 2013, 279371.
- Nemmar, A., Yuvaraju, P., Beegam, S., Yasin, J., Dhaheri, R.A., Fahim, M.A., Ali, B.H., 2015. In vitro platelet aggregation and oxidative stress caused by amorphous silica nanoparticles. *Int. J. Physiol. Pathophysiol. Pharmacol.* 20, 27–33.
- Neri, T., Pergoli, L., Petrini, S., Gravendonk, L., Balia, C., Scalise, V., Amoroso, A., Pedrinelli, R., Paggiaro, P., Bollati, V., Celi, A., 2016. Particulate matter induces prothrombotic microparticle shedding by human mononuclear and endothelial cells. *Toxicol. in Vitro* 32, 333–338.
- Newby, D.E., Mannucci, P.M., Tell, G.S., Baccarelli, A.A., Brook, R.D., Donaldson, K., Forastiere, F., Franchini, M., Franco, O.H., Graham, I., Hoek, G., Hoffman, B., Hoylaerts, M.F., Künzli, N., Mills, N., Pekkanen, J., Peters, A., Piepoli, M.F., Rajagopalan, S., Storey, R.F., 2015. ESC Working Group on Thrombosis, European Association for Cardiovascular Prevention and Rehabilitation, ESC Heart Failure Association. Expert position paper on air pollution and cardiovascular disease. *Eur. Heart J.* 36, 83–93b.
- Nymark, P., Jensen, K.A., Suhonen, S., Kembouche, Y., Vippola, M., Kleinjans, J., Catalán, J., Norppa, H., van Delft, J., Briedé, J.J., 2014. Free radical scavenging and formation by multi-walled carbon nanotubes in cell free conditions and in human bronchial epithelial cells. *Part. Fibre Toxicol.* 11, 4.
- Parpaite, T., Cardouat, G., Mauroux, M., Gillibert-Duplantier, J., Robillard, P., Quignard, J.F., Marthan, R., Savineau, J.P., Ducret, T., 2016. Effect of hypoxia on TRPV1 and TRPV4 channels in rat pulmonary arterial smooth muscle cells. *Pflugers Arch.* 468, 111–130.
- Pope, C.A., Burnett, R.T., Thurston, G.D., Thun, M.J., Calle, E.E., Krewski, D., Godleski, J.J., 2004. Cardiovascular mortality and long-term exposure to particulate air pollution: epidemiological evidence of general pathophysiological pathways of disease. *Circulation* 109, 71–77.
- Pope, C.A., Turner, M.C., Burnett, R.T., Jerrett, M., Gapstur, S.M., Diver, W.R., Krewski, D., Brook, R.D., 2015. Relationships between fine particulate air pollution, cardio-metabolic disorders, and cardiovascular mortality. *Circ. Res.* 116, 108–115.
- Rodat, L., Savineau, J.P., Marthan, R., Guibert, C., 2007. Effect of chronic hypoxia on voltage-independent calcium influx activated by 5-HT in rat intrapulmonary arteries. *Pflugers Arch.* 454, 41–51.
- Sciare, J., d'Argoues, O., Sarda-Estève, R., Gaimoz, C., Dolgorouky, C., Bonnaire, N., Favez, O., Bonsang, B., Gros, V., 2011. Large contribution of water-insoluble secondary organic aerosols in the region of Paris (France) during wintertime. *J. Geophys. Res.* 116, D22203.
- Simon, M., Barberet, P., Delville, M.H., Moretto, P., Seznec, H., 2011. Titanium dioxide nanoparticles induced intracellular calcium homeostasis modification in primary human keratinocytes. Towards an in vitro explanation of titanium dioxide nanoparticles toxicity. *Nanotoxicology* 5, 125–139.
- Squadrito, G.L., Cueto, R., Dellinger, B., Pryor, W.A., 2001. Quinoid redox cycling as a mechanism for sustained free radical generation by inhaled airborne particulate matter. *Free Radic. Biol. Med.* 31, 1132–1138.
- Stone, V., Tuinman, M., Vamvakopoulos, J.E., Shaw, J., Brown, D., Pettersson, S., Faux, S.P., Borm, P., MacNee, W., Michaelangeli, F., Donaldson, K., 2000. Increased calcium influx in a monocyte cell line on exposure to ultrafine carbon black. *Eur. Respir. J.* 15, 297–303.
- Thomson, E.M., Breznan, D., Karthikeyan, S., MacKinnon-Roy, C., Vuong, N.Q., Dabek-Zlotorzynska, E., Celis, V., Charland, J.P., Kumarathasan, P., Brook, J.R., Vincent, R., 2016. Contrasting biological potency of particulate matter collected at sites impacted by distinct industrial sources. *Part. Fibre Toxicol.* 13, 65.
- Touyz, R.M., Schiffrin, E.L., 2004. Reactive oxygen species in vascular biology: implications in hypertension. *Histochem. Cell Biol.* 122, 339–352.
- Tseng, C.Y., Wang, J.S., Chang, Y.J., Chang, J.F., Chao, M.W., 2015a. Exposure to high-dose diesel exhaust particles induces intracellular oxidative stress and causes endothelial apoptosis in cultured in vitro capillary tube cells. *Cardiovasc. Toxicol.* 15, 345–354.
- Tseng, C.Y., Chang, J.F., Wang, J.S., Chang, Y.J., Gordon, M.K., Chao, M.W., 2015b. Protective effects of N-acetyl cysteine against diesel exhaust particles-induced intracellular ROS generates pro-inflammatory cytokines to mediate the vascular permeability of capillary-like endothelial tubes. *PLoS One* 6, 10.
- Urch, B., Silverman, F., Corey, P., Brook, J.R., Lukic, K.Z., Rajagopalan, S., Brook, R.D., 2005. Acute blood pressure responses in healthy adults during controlled air pollution exposures. *Environ. Health Perspect.* 113, 1052–1055.
- Val, S., Martinon, L., Cachier, H., Yahyaoui, A., Marfaing, H., Baeza-Squiban, A., 2011. Role of size and composition of traffic and agricultural aerosols in the molecular responses triggered in airway epithelial cells. *Inhal. Toxicol.* 23, 627–640.
- Wang, H., Joseph, J.A., 1999. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radic. Biol. Med.* 27, 612–616.
- Xu, L., Chen, Y., Yang, K., Wang, Y., Tian, L., Zhang, J., Wang, E.W., Sun, D., Lu, W., Wang, J., 2014. Chronic hypoxia increases TRPC6 expression and basal intracellular Ca²⁺ concentration in rat distal pulmonary venous smooth muscle. *PLoS One* 9, e112007.

Résumé de l'article :

Dans un premier temps, nous avons montré que dans les conditions acellulaires, les PM_{2.5} entraînent une production intrinsèque d'ERO notamment de l'H₂O₂ et de l'O₂^{·-}, de manière concentration-dépendante. Dans une seconde étape, nous avons démontré que les PM_{2.5} (7.5 µg/cm²) étaient rapidement internalisées dans les HPAEC (1 h) essentiellement dans des vésicules ou libres dans le cytoplasme, très proches du noyau et des mitochondries. D'autre part, le test d'évaluation de la cytotoxicité (WST-1) nous a permis de déterminer les concentrations infratoxiques (< 20% de mortalité cellulaire) à utiliser pour les études mécanistiques.

Nos résultats montrent ensuite, que dans les cellules HPAEC, après 4 h d'exposition, les PM_{2.5} (5 - 15 µg / cm²) induisent, une augmentation significative concentration-dépendante de la production globale des ERO, et notamment de l'anion superoxyde. Il est intéressant de souligner que la production globale d'ERO est significative dès 10 µg/cm² alors que la production d'O₂^{·-} est significative dès 7.5 µg/cm². D'autre part, après 4 h d'exposition, les PM_{2.5} induisent, également dans les HPAEC, une augmentation significative concentration-dépendante pour des concentrations plus faibles (5 µg/cm²). De plus, les PM_{2.5} ont induit dans les HPAEC, après 24 h d'exposition, une légère diminution de l'activité mitochondriale (mesurée par le test WST-1), ce qui pourrait être corrélé à la surproduction d'O₂^{·-} mitochondrial observée après 4 h d'exposition.

L'ensemble de ces résultats indique donc qu'aucun test unique ne permet de prédire complètement le stress oxydatif et confirment l'intérêt d'utiliser divers tests complémentaires (de sensibilité et spécificité différentes) pour étudier la génération des ERO induites par les particules. Ces résultats suggèrent également qu'aux concentrations les plus faibles (5 µg/cm²), la détermination de l'anion superoxyde par microscopie confocale semble être la méthode la plus pertinente pour évaluer le stress oxydant.

La composition chimique des PM_{2.5}, également analysée, est l'un des principaux déterminants des effets moléculaires et cellulaires induits par les PM_{2.5} via le stress oxydatif. En effet, les métaux de transition et les composés organiques présents sur les particules sont connus pour produire, respectivement, par la réaction de Fenton ou par le cycle redox, des radicaux très réactifs (tels que l'O₂^{·-} et le radical hydroxyle).

Nous avons également montré que les PM_{2.5} pouvaient altérer la voie de signalisation du NO. Après 4 h d'exposition avec les PM_{2.5}, nous avons observé une augmentation significative et concentration-dépendante de la production de NO notamment aux concentrations les plus élevées (10 et 15 µg/cm²). De plus, nous avons également démontré que l'O₂^{·-} produit par les PM_{2.5} générerait une réaction rapide avec le NO pour produire une espèce hautement réactive et cytotoxique telle que les peroxy-nitrites (ONOO⁻). La balance [NO]/[ONOO⁻] est donc dérégulée, ce qui entraîne une diminution de la biodisponibilité du NO et une diminution de l'effet protecteur du NO dans les vaisseaux, en faveur d'une vasoconstriction. Ces résultats ont été confirmés en utilisant des enzymes anti-oxydantes. En effet, un prétraitement (1 h) avec des

enzymes anti-oxydantes (SOD/CAT) entraîne une diminution significative de la production d'ONOO⁻ par les PM_{2.5}.

Dans une dernière étape, nous avons étudié, l'effet des PM_{2.5} sur la signalisation calcique. Après une exposition de 4 h, les PM_{2.5} (5 - 15 µg / cm²) induisent dans les cellules HPAEC une augmentation significative dose-dépendante du niveau basal de calcium cytoplasmique [Ca²⁺]_i. L'altération de l'homéostasie calcique est significativement réduite par un traitement préalable (1 h) avec les enzymes anti-oxydantes (SOD/CAT). Ces résultats suggèrent que le stress oxydant semble jouer un rôle majeur dans l'altération de la signalisation calcique induite par les PM_{2.5} dans les cellules HPAEC.

Conclusion:

- Les PM_{2.5} entraînent une augmentation des espèces réactives oxygénées et des espèces azotées radicalaires dans les cellules HPAEC.
- La signalisation calcique et la biodisponibilité du NO sont altérées dans les cellules HPAEC.
- L'altération de l'homéostasie calcique induite par les PM_{2.5} est corrélée au stress oxydant.
- L'exposition aux PM_{2.5} affecte potentiellement la réactivité vasculaire par atteinte endothéliale et pourrait constituer un facteur de risque dans l'exacerbation de pathologies vasculaires préexistantes.

2. Effets des nanoparticules de noires de carbone (NPs FW2) sur les cellules endothéliales de l'artère pulmonaire humaine: rôle du stress oxydatif sur la signalisation calcique et la fonction mitochondriale”.

Contexte: En raison du développement des nanotechnologies et des émissions croissantes de nanoparticules (NPs, diamètre inférieur à 100 nm) dans l’atmosphère, notamment les noires de carbone provenant des processus de combustion incomplètes, l’augmentation de l’exposition environnementale et professionnelle aux NPs constitue un réel enjeu de santé publique. La compréhension des mécanismes d’action toxique, après inhalation est donc primordiale dans la démarche d’évaluation du risque pour les travailleurs et la population générale (286). Les NPs, après l’inhalation, peuvent pénétrer profondément dans les voies respiratoires, s’accumuler dans les alvéoles pulmonaires, franchir la barrière capillo-alvéolaire et atteindre la circulation pulmonaire, où elles peuvent être en contact direct avec des cellules endothéliales (CE) qui tapissent la surface interne des artères à l’origine d’effets délétères au niveau cardiovasculaire. Les CE jouent un rôle clé dans la régulation de la fonction vasculaire et le maintien de l’homéostasie (3, 60). Il a été montré que le stress oxydatif et l’altération de la signalisation calcique sont des événements clés impliqués dans la physiopathologie des maladies cardiovasculaires, notamment l’hypertension pulmonaire (150, 499, 500). Par ailleurs, de nombreuses études ont rapporté, dans différents types cellulaires (macrophages, cellules rénales et épithéliales), que les NPs noires de carbone déclenchent un stress oxydant avec une surproduction d’ERO associée à des réponses pro-inflammatoires, mécanismes également impliqués dans les pathologies cardiovasculaires (494, 501). Certains auteurs (502) ont, également, rapporté une altération de l’homéostasie calcique dans les cellules épithéliales A549 et des macrophages après exposition avec des NPs noires de carbone. De plus, une des sources principales de la production des ERO est la mitochondrie qui joue également un rôle clé dans l’homéostasie du calcium, la prolifération cellulaire et l’apoptose (503). Il est d’autre part, démontré que la dysfonction endothéliale pourrait expliquer les maladies cardiovasculaires et qu’elle est souvent associée à une altération des mitochondries (85, 504). En conséquence, les mitochondries ainsi que d’autres organites tels que le réticulum endoplasmique (RE) pourraient constituer des cibles responsables des effets cytotoxiques induits par les NPs (395, 409, 505, 506). Cependant, malgré le rôle majeur de la signalisation calcique, du stress oxydatif et de la dysfonction mitochondriale dans la pathogenèse des maladies vasculaires, les mécanismes induits par les NPs noires de carbone (FW2) au niveau de ces cibles intracellulaires dans les cellules endothéliales d’artères pulmonaires humaines (HPAEC) sont peu connus.

Les objectifs de cette étude sont d'évaluer, après 4 heures d'exposition des cellules HPAEC, les effets induits par les NPs FW2 (1 - 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) sur le stress oxydatif, la signalisation calcique et le dysfonctionnement mitochondrial. Différents paramètres sont étudiés (i) la production d'ERO intracellulaires par la sonde CM-H₂DCF-DA et par RPE (ii) la signalisation calcique intracellulaire (variations de calcium cytosolique, du calcium dans le RE et du calcium mitochondrial) par microscopie confocale (iii) les altérations mitochondriales (production d'ERO dans les mitochondries, potentiel membranaire mitochondrial (PMM), dynamique mitochondriale) (iv) l'internalisation et la localisation intracellulaire des NPs FW2 (par microscopie électronique à transmission).

Particle and Fibre Toxicology

Effect of carbon black nanoparticles on human pulmonary artery endothelial cells: role of oxidative stress on calcium signaling and mitochondrial function

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	PFTX-D-18-00130
Full Title:	Effect of carbon black nanoparticles on human pulmonary artery endothelial cells: role of oxidative stress on calcium signaling and mitochondrial function
Article Type:	Research
Funding Information:	
Abstract:	<p>Background: Human exposure to nanoparticles (NPs) is a major public health concern. After inhalation, NPs penetrate deeply into the airways, can accumulate in pulmonary alveoli, cross the epithelial barrier to reach the pulmonary circulation and exert deleterious effects on target organs such as the cardiovascular system. Therefore, the pulmonary circulation could be one of the primary targets for inhaled particles and exposure to NPs could aggravate pre-existing pulmonary vascular diseases. The objective of this study was to assess the cellular effect of FW2 NPs exposure, in human pulmonary artery endothelial cells (HPAEC), on oxidative stress, calcium intracellular signaling and mitochondrial function.</p> <p>Methods: HPAEC were exposed during 4 hours to FW2 NPs (1-10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$). Different endpoints were studied (i) production of ROS by fluorimetry (CM-H2DCFDA probe) and by Electron Paramagnetic Resonance (EPR) (ii) variations in intracellular calcium concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) by confocal microscopy (Fluo-4, AM, Fluo-4FF, AM and Rhod-2, AM probes) (iii) mitochondrial functions by confocal microscopy (MitoSOX and TMRM probes) and transmission electronic microscopy (TEM). Several reagents (ATP, thapsigargin, BAPTA-AM, antioxidant enzymes) were used to characterize the source of the damages.</p> <p>Results: In HPAEC, FW2 NPs induced (i) a concentration-dependent increase in oxidative stress, characterized by the production of superoxide anion (ii) a change in calcium homeostasis characterized by an alteration of intracellular organelles calcium content such as endoplasmic reticulum and mitochondria. Moreover, transmission electronic microscopy revealed that FW2 NPs were mainly organized in aggregates into HPAEC cytosol close to mitochondria and nucleus.</p> <p>Conclusion: This study provides evidence that FW2 NPs exposure induce endothelial cells damages triggered by oxidative stress and thus could act as a cardiovascular disease risk because of the key role of calcium homeostasis in vascular tonus regulation.</p>
Corresponding Author:	Isabelle Baudrimont, Ph.D Universite de Bordeaux Bordeaux, FRANCE
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	Universite de Bordeaux
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Juliette Deweirdt
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	<p>Juliette Deweirdt</p> <p>Jean - François Quignard</p> <p>Sabrina Lacomme</p> <p>Etienne Gontier</p> <p>Jean - Pierre Savineau</p> <p>Roger Marthan</p> <p>Christelle Guibert</p>

	Isabelle Baudrimont, Ph.D
Order of Authors Secondary Information:	
Opposed Reviewers:	
Additional Information:	
Question	Response
<p>Is this study a clinical trial?</p> <hr/> <p>A clinical trial is defined by the World Health Organisation as 'any research study that prospectively assigns human participants or groups of humans to one or more health-related interventions to evaluate the effects on health outcomes'.</p>	No

28 **Abstract:**

29 **Background**

30 Human exposure to nanoparticles (NPs) is a major public health concern. After inhalation,
31 NPs penetrate deeply into the airways, can accumulate in pulmonary alveoli, cross the
32 epithelial barrier to reach the pulmonary circulation and exert deleterious effects on target
33 organs such as the cardiovascular system. Therefore, the pulmonary circulation could be one
34 of the primary targets for inhaled particles and exposure to NPs could aggravate pre-existing
35 pulmonary vascular diseases. The objective of this study was to assess the cellular effect of
36 FW2 NPs exposure, in human pulmonary artery endothelial cells (HPAEC), on oxidative
37 stress, calcium intracellular signaling and mitochondrial function.

38 **Methods**

39 HPAEC were exposed during 4 hours to FW2 NPs (1-10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$). Different endpoints were
40 studied (i) production of ROS by fluorimetry (CM-H₂DCFDA probe) and by Electron
41 Paramagnetic Resonance (EPR) (ii) variations in intracellular calcium concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$)
42 by confocal microscopy (Fluo-4, AM, Fluo-4FF, AM and Rhod-2, AM probes) (iii)
43 mitochondrial functions by confocal microscopy (MitoSOX and TMRM probes) and
44 transmission electronic microscopy (TEM). Several reagents (ATP, thapsigargin, BAPTA-
45 AM, antioxidant enzymes) were used to characterize the source of the damages.

46 **Results**

47 In HPAEC, FW2 NPs induced (i) a concentration-dependent increase in oxidative stress,
48 characterized by the production of superoxide anion (ii) a change in calcium homeostasis
49 characterized by an alteration of intracellular organelles calcium content such as endoplasmic
50 reticulum and mitochondria. Moreover, transmission electronic microscopy revealed that
51 FW2 NPs were mainly organized in aggregates into HPAEC cytosol close to mitochondria
52 and nucleus.

53 **Conclusions**

54 This study provides evidence that FW2 NPs exposure induce endothelial cells damages
55 triggered by oxidative stress and thus could act as a cardiovascular disease risk because of the
56 key role of calcium homeostasis in vascular tonus regulation.

57

58 Keywords: FW2 carbon black nanoparticles, pulmonary artery endothelial cells, reactive
59 oxygen species, intracellular calcium, calcium imaging, mitochondrial dysfunction

60

61 **Background**

62 Several epidemiological studies have revealed a link between particulate matter (PM)
63 exposure and an increase in cardiopulmonary morbidity and mortality [1]. The World Health
64 Organization estimates that over 700,000 premature deaths worldwide per year can be
65 attributed to airborne particulate matter pollution [2]. Carbon black nanoparticles (NPs)
66 (diameter less than 100 nm) originating from incomplete combustion processes have been
67 hypothesized as the major PM constituent and contributing to toxic effects such as
68 cardiovascular ones [3,4]. Moreover, with the current development of nanotechnologies, an
69 increased production of manufactured nanomaterials including carbon black NPs is likely to
70 occur. Main applications of these NPs are in rubber (90% of the production) and pigment
71 industry (9%) [5]. Consequently, due to the large variety of applications, anthropic emissions
72 and the potential increase in environmental human exposures to carbon black NPs, it is thus
73 crucial to evaluate their toxic effects for the risk assessment of workers and population.
74 Carbon black NPs, mainly composed of elementary carbon, are potentially more harmful than
75 coarse-sized particles because of their high surface reactivity, physical properties and large
76 surface area leading to greater interactions with biological systems [6,7]. As compared to
77 larger-sized particles, deposition of NPs, after inhalation, is greater into the lung and they may

78 accumulate into pulmonary alveoli and the lung parenchyma close to pulmonary arterial wall.
79 NPs display also higher efficiency to cross the pulmonary epithelial barriers and to reach the
80 pulmonary circulation where they can be in direct contact with endothelial cells lining the
81 inner surface of blood artery leading to exacerbate cardiovascular diseases [8,9]. Endothelial
82 cells play a key role in the regulation of vascular function and in the maintenance of
83 homeostasis. These cells are involved in different biological processes to maintain vascular
84 tone, control coagulation and vascular barrier integrity [10]. It has been reported that
85 endothelial injury is a critical mechanism by which inhaled NPs induce vascular diseases
86 [11,12]. Several epidemiological studies have previously shown that carbon black
87 nanoparticles (FW2 NPs) favour cardiac arrhythmias [13], alter vascular reactivity [14,15]
88 and increase cardiovascular mortality [16]. It is well known that oxidative stress and alteration
89 in calcium signaling are critical events involved in the physiopathology of cardiovascular
90 diseases including pulmonary hypertension [17,18,19]. On the other hand, after inhalation,
91 particles trigger an oxidative stress with overproduction of reactive oxygen species (ROS),
92 often associated with a pulmonary pro-inflammatory response characterizing cardiovascular
93 diseases [20,21]. Moreover, some studies have reported, in various cell types (macrophages,
94 renal and epithelial cells), that FW2 NPs trigger oxidative stress with overproduction of ROS
95 associated with pro-inflammatory responses [22,23]. The study by Brown et al. [24] has also
96 reported an alteration in calcium (Ca^{2+}) homeostasis in A549 epithelial cells and macrophages
97 after exposure to carbon black NPs. Another origin of ROS production is the mitochondrion
98 which plays also a key role in calcium homeostasis, cell proliferation and apoptosis [25].
99 Endothelial dysfunction is thus believed to contribute to cardiovascular diseases and is often
100 associated with mitochondrial impairment [26,27]. As a consequence, mitochondria are
101 potential target organelles for NPs-induced toxic effects [28,29] as well as other organelles
102 such as endoplasmic reticulum (ER) [30,31]. However, despite the major role of calcium

103 signaling, oxidative stress and mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of vascular
104 diseases, the underlying mechanisms by which FW2 NPs can interact with these intracellular
105 targets and impaired cellular functions in human pulmonary endothelial cells (HPAEC) are
106 still unclear.

107 In this context, the objectives of the present study were to assess the effects of FW2 NPs
108 exposure, in HPAEC, on oxidative stress, calcium signaling and mitochondrial dysfunction.

109 Different endpoints were studied (i) intracellular ROS production (ii) intracellular calcium
110 signaling (cytosolic calcium, reticulum endoplasmic calcium, mitochondrial calcium levels)
111 (iii) mitochondrial damages (mitochondrial dehydrogenase activity, mitochondrial ROS
112 production, mitochondrial membrane potential impairment, mitochondrial morphology) (iv)
113 FW2 NPs internalization and intracellular localization.

114

115

116

117

118

119

120

121

122

123

124

125

126

127

128 **Results**

129 *FW2 NPs decrease HPAEC viability*

130 In order to understand, in HPAEC, the mechanism of FW2 NPs effect on oxidative stress, on
131 calcium signaling and on mitochondrial function, we first investigated the non-toxic range of
132 FW2 NPs concentrations (mortality rate < 25%) that could be used based upon the WST-1
133 test. Cytotoxic assay was performed after a 24 h-treatment with NPs. The results show, that
134 exposure of HPAEC to FW2 NPs (1–10 $\mu\text{g}/\text{cm}$) for 24 h, decreased concentration-
135 dependently, cell viability (Fig. 1A). A statistically significant reduction of cell viability was
136 observed for a concentration of 5 $\mu\text{g}/\text{cm}$ and above. These results also showed that
137 mitochondrial activity of HPAEC was decreased in a concentration-dependent manner
138 following FW2 NPs exposure.

139

140 *FW2 NPs increase intracellular ROS production*

141 Fig. 1B shows, that a 4 h-exposure to FW2 NPs (5–10 $\mu\text{g}/\text{cm}$) induced, in HPAEC, in a
142 concentration-dependent pattern, a significant increase in intracellular global ROS production
143 from 5 $\mu\text{g}/\text{cm}$. We then investigated, by EPR, the ability of FW2 NPS to generate
144 specifically cytoplasmic superoxide anion ($\text{O}_2^{\cdot-}$) production in HPAEC (Fig. 1C). A 4 h-
145 exposure to FW2 NPs (5–10 $\mu\text{g}/\text{cm}$) induced, in a concentration-dependent manner, a
146 significant increase in cytoplasmic $\text{O}_2^{\cdot-}$ concentration from 5 $\mu\text{g}/\text{cm}$.

147

148 *FW2 NPs increase cytosolic calcium concentration*

149 In a first set of experiments we investigated whether a 4 h-exposure to FW2 NPs (5–10
150 $\mu\text{g}/\text{cm}$) could increase cytoplasmic calcium concentration by calcium imaging (Fluo-4, AM
151 probe). Fig. 2A shows, in HPAEC, a statistically significant and dose dependent increase in

152 the basal intracellular calcium ion level $[Ca^{2+}]_i$ from 5 $\mu\text{g}/\text{cm}$. However, no effects on basal
153 Ca^{2+} homeostasis were observed after acute FW2 NPs exposure (data not shown).

154 In a second set of experiments, in order to elucidate whether the FW2 NPs-induced
155 impairment of intracellular calcium homeostasis was correlated to an increase of ROS
156 production, the same experiments were performed using antioxidant enzymes. After a 1 h-pre-
157 treatment of HPAEC with both PEG-SOD and PEG-catalase, followed by a 4 h-FW2 NPs
158 exposure (5–10 $\mu\text{g}/\text{cm}$), no significant effect of FW2 NPs on basal intracellular calcium
159 level was observed as compared to control cells (Fig. 2A). Antioxidant enzymes fully
160 reversed the FW2 NPs-induced increase in intracellular calcium basal level in cells co-treated
161 with FW2 NPs thus indicating that ROS production was involved in Ca^{2+} signaling
162 mechanism.

163 Several experiments were then performed in order to elucidate the mechanism of FW2 NPs-
164 induced calcium signaling alteration in HPAEC. In order to assess the role of the extracellular
165 source of $[Ca^{2+}]_i$ rise, HPAEC were exposed to FW2 NPs in the presence and in the absence
166 of extracellular Ca^{2+} . Before experiments, EGTA (5 mM) was added in the ECGM culture
167 medium for chelating Ca^{2+} ion. As shown in Fig. 2B and Fig.2C the absence of extracellular
168 Ca^{2+} had no effect on FW2 NPs - induced Ca^{2+} response after a 4 h-exposure. This
169 observation suggested that FW2 NPs - induced $[Ca^{2+}]_i$ rise could be mediated by intracellular
170 Ca^{2+} stores. To confirm this hypothesis the intracellular Ca^{2+} source and more precisely the
171 involvement of Ca^{2+} from the ER was investigated.

172 The effect of FW2 NPs on intracellular calcium stores was firstly evaluated in the presence of
173 ATP (20 μM) which is known to induce, via P2Y receptor, the inositol 1,4,5 triphosphate
174 (IP_3) pathway activation leading to calcium release. Fig. 3A shows that exposure of HPAEC
175 to FW2 NPs (5–10 $\mu\text{g}/\text{cm}$) significantly decreased, in a concentration-dependent manner, the
176 ATP-induced calcium response from 5 $\mu\text{g}/\text{cm}$ as compared to control cells. After a 1 h-pre-

177 treatment of HPAEC with both PEG-SOD and PEG-catalase, followed by a 4 h-FW2 NPs
178 exposure (5–10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$), the antioxidant enzymes fully reversed the FW2 NPs- induced ATP
179 response impairment.

180 The involvement of Ca^{2+} from the ER was also investigated using thapsigargin (1 μM), an ER
181 Ca^{2+} - ATPase (SERCA) inhibitor in order to deplete the Ca^{2+} ER stores. After 4 h-FW2 NPs
182 exposure (5–10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$), thapsigargin - induced calcium release decreased concentration-
183 dependently (Fig. 3B), thus indicating that there was less calcium in the ER after FW2-NPs
184 exposure.

185 In the last experiments, in order to confirm whether the FW2 NPs-induced $[\text{Ca}^{2+}]_i$ rise was
186 indeed mediated by ER $[\text{Ca}^{2+}]$ stores, the $[\text{Ca}^{2+}]$ in the ER was measured by the Fluo-4FF, AM
187 probe with confocal microscopy (Fig. 3C). The results show that, after a 4 h-FW2 NPs
188 exposure (5–10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$), the ER $[\text{Ca}^{2+}]$ significantly decreased in a concentration-dependant
189 manner as compared to control cells.

190

191 *FW2 NPs induce mitochondrial damages*

192 *FW2 NPs increase Mitochondrial $\text{O}_2^{\cdot-}$ production*

193 We assessed the effect of FW2-NPs on mitochondrial $\text{O}_2^{\cdot-}$ production by MitoSOX probe
194 (confocal imaging). Fig. 4 shows, after a 4 h-exposure of HPAEC to FW2 NPs (5–10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$),
195 a statistically significant rise in mitochondrial $\text{O}_2^{\cdot-}$ production in a concentration-dependent
196 manner as compared to control cells. In order to elucidate whether FW2 NPs-induced
197 mitochondrial oxidative stress was primarily related to cytosolic oxidative stress or to
198 cytosolic calcium homeostasis alteration, the same experiments were performed using PEG-
199 SOD (300 U/ml) and PEG-CAT (600 U/ml) and BAPTA-AM (5 μM), respectively. After a 1
200 h-pre-treatment of HPAEC with both PEG-SOD and PEG-catalase, followed by a 4 h-FW2
201 NPs exposure (5–10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$), FW2 NPs-induced mitochondrial $\text{O}_2^{\cdot-}$ production was

202 significantly decreased as compared to FW2 NPs-treated cells from 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (Fig. 4A, 4B).
203 In cells co-treated with FW2 NPs (5–10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) and antioxidant enzymes the FW2 NPs-
204 induced mitochondrial $\text{O}_2^{\cdot-}$ production was fully reversed. In contrast, a 30 min-pre-treatment
205 of HPAEC with BAPTA-AM, followed by a 4 h-FW2 NPs exposure (5–10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$), had no
206 effect on FW2 NPs-induced mitochondrial $\text{O}_2^{\cdot-}$ production (Fig. 4C). These results indicated
207 that cytosolic calcium is not involved in the mitochondrial $\text{O}_2^{\cdot-}$ production. The global
208 oxidative stress plays a key role on the mitochondrial $\text{O}_2^{\cdot-}$ production.

209 210 *FW2 NPs increase mitochondrial calcium level*

211 To determine the effect of FW2 NPs on mitochondrial calcium signaling in HPAEC, the
212 mitochondrial calcium level $[\text{Ca}^{2+}]_m$ was investigated after a 4 h-exposure to FW2 NPs (5–10
213 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) by calcium imaging (Rhod-2, AM probe). Fig. 5A shows, in HPAEC, a statistically
214 significant and dose-dependent increase in $[\text{Ca}^{2+}]_m$ level from 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ as compared to
215 control cells. In order to elucidate if FW2 NPs-induced impairment of mitochondrial calcium
216 homeostasis was primarily related to oxidative stress or to cytosolic calcium homeostasis
217 alteration, the same experiments were performed using respectively PEG-SOD (300 U/ml)
218 and PEG-CAT (600 U/ml) and BAPTA-AM (5 μM).

219 After a 1 h-pre-treatment of HPAEC with both PEG-SOD and PEG-catalase, followed by a 4
220 h-FW2 NPs exposure (5–10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$), no significant effect of FW2 NPs on $[\text{Ca}^{2+}]_m$ level was
221 observed as compared to control cells (Fig. 5A). In cells co-treated with FW2 NPs and
222 antioxidant enzymes, the FW2 NPs-induced increase in $[\text{Ca}^{2+}]_m$ level was fully reversed.

223 In contrast, a 30 min-pre-treatment of HPAEC with BAPTA-AM, followed by a 4 h-FW2
224 NPs exposure (5–10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$), had no effect on FW2 NPs-induced $[\text{Ca}^{2+}]_m$ rise (Fig. 5B, 5C).
225 These results indicate that the increase of mitochondrial calcium seems to be modified by
226 cytosolic oxidative stress.

227 *FW2 NPs decrease mitochondrial membrane potential (Ψ MP)*

228 We assessed the effect of FW2-NPs on Ψ MP by TMRM probe (confocal imaging). The
229 results show, in HPAEC, after a 4 h-exposure to FW2 NPs (5-10 μ g/cm²), a statistically
230 significant decrease in Ψ MP in a concentration-dependent manner (Fig. 6).

231 In order to elucidate whether FW2 NPs-induced Ψ MP decline was primarily related to
232 cytosolic oxidative stress or to cytosolic calcium homeostasis alteration, the same experiments
233 were performed using respectively PEG-SOD (300 U/ml) and PEG-CAT (600 U/ml) and
234 BAPTA-AM (5 μ M). After a 1 h-pre-treatment of HPAEC with both PEG-SOD and PEG-
235 catalase, followed by a 4 h-FW2 NPs exposure (5-10 μ g/cm²), no significant effect of FW2
236 NPs on Ψ MP was observed as compared to control cells (Fig. 6A, 6B). In cells co-treated with
237 FW2 NPs and antioxidant enzymes the FW2 NPs-induced decrease in Ψ MP was fully
238 reversed. In contrast, a 30 min-pre-treatment of HPAEC with BAPTA-AM, followed by a 4 h-
239 FW2 NPs exposure (5-10 μ g/cm²), had no effect on FW2 NPs-induced Ψ MP decline (Fig.
240 6C). These results indicate that the modification of Ψ MP seems to be modified by cytosolic
241 oxidative stress.

242

243 *FW2 NPs internalization in HPAEC and mitochondria ultra-structure observation*

244 Transmission electronic microscopy (TEM) was performed to obtain information on the
245 uptake and localization of FW2 NPs in HPAEC exposed for 1 h to FW2 NPs (7.5 μ g/cm²).
246 Representative micrographs are shown in Fig. 7. After a rapid internalization into cells, FW2
247 NPs were mainly clustered into vesicles (Fig. 7A2, 7B2, 7B3). Internalized NPs were mainly
248 organized in aggregates of various sizes and single or isolated NPs were rarely observed.
249 TEM images evidence that FW2 NPs were also localized very close to mitochondria (Fig.
250 7B2, 7B3) or to the nucleus (Fig. 7B2). However no particles were observed inside these 2
251 elements. In addition, Fig. 7B revealed changes in mitochondria morphology such as

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

252 mitochondria swelling, decrease or even disappearance of mitochondrial cristae and
253 vacuolization, in FW2 NPs-treated cells, as compared to control cells with normal intact
254 mitochondria. Indeed, in control cells, mitochondria were elongated or round with regular
255 cristae structure.

256

257 *FW2 NPs impair mitochondrial dynamics*

258 We then assessed the effect of FW2-NPs (7.5 $\mu\text{g}/\text{cm}$) on mitochondrial network, using a
259 specific mitochondrial Mitotracker probe (confocal imaging) after a 4 h-exposure to HPAEC.
260 In HPAEC negative control, a dynamic mitochondrial network was observed, showing the
261 typical fiber-like structure (Fig. 8.A). In control treated with CCCP (5 μM), mitochondria
262 presented fragmentation and appeared as disconnected fragments (Fig. 8.C) since CCCP is
263 known to impair the mitochondria network by inducing fission event. FW2 NPs-treated cells
264 (7.5 $\mu\text{g}/\text{cm}$) showed mitochondria fragmentation (Fig. 8.B) similar to cells treated with
265 CCCP, suggesting a mitochondria network alteration such as fission.

266

267

268

269

270

271

272

273

274

275

276

277 Discussion

278 An increased level of carbon black NPs in the atmosphere is suspected to aggravate
279 cardiovascular diseases [32]. In the present study, the toxic effect of FW2 NPs was
280 investigated in HPAEC target cells. Once internalized, FW2 NPs primarily induce
281 intracellular ROS generation leading to $[Ca^{2+}]_i$ rise. ROS overproduction along with high
282 surface reactivity of FW2 NPs target both mitochondria and ER, two calcium buffer sites
283 which cooperate to regulate intracellular calcium homeostasis. Global ROS production
284 induces (i) over production of mitochondrial $O_2^{\cdot-}$, leading to a $[Ca^{2+}]_m$ rise (ii) Ψ MP
285 depolarisation resulting in mitochondrial dynamics alterations responsible for mitochondrial
286 morphology alteration (iii) and ER disturbance. These results are summarized in Fig. 9. First
287 we demonstrate, that FW2 NPs induce, in HPAEC, a global overproduction of ROS such as
288 H_2O_2 and an increase in some free radicals, in particular $O_2^{\cdot-}$. These data are in line with those
289 from the literature [33]. We have shown that FW2 NPs induce, in HPAEC, a concentration-
290 dependent increase in the basal $[Ca^{2+}]_i$. This impairment in calcium homeostasis was strongly
291 reduced by a pre-treatment with antioxidant enzymes thus suggesting that FW2 NPs-induced
292 alteration in intracellular calcium homeostasis was closely correlated to an increase in $O_2^{\cdot-}$
293 and H_2O_2 . Previous results have shown that the calcium response in HPAEC differs according
294 to the particles types. FW2 NPs response was higher than that to PM [34]. This difference
295 may likely be related to physicochemical characteristics of particles (composition, size,
296 solubility...) which determine their biological effects. In previous studies, we showed [35], in
297 PASM cells, that SiO_2 NPs-induced $[Ca^{2+}]_i$ rise involved the two main sources of calcium:
298 first the extracellular source through the activation of both L-type Ca^{2+} and transient receptor
299 potential vanilloid (TRPV) channels, and second the intracellular source via the activation of
300 ER receptors. In contrast, our present findings suggest that impairment of calcium signaling
301 doesn't involve the extracellular source of calcium since the absence of the extracellular

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

302 calcium did not impair the FW2 NPs-induced $[Ca^{2+}]_i$ rise. One of the explanations for these
303 observations could be the lack of L-type Ca^{2+} channels in HPAEC [36] although TRPV
304 channels are present [37,38]. Another signaling pathway is therefore probably affected
305 implicating the intracellular Ca^{2+} stores (such as ER). ER is an important organelle involved
306 in different functions including proteins synthesis and it is also known to be the main
307 intracellular calcium store in endothelial cells [39]. However, exposure of HPAEC to FW2
308 NPs significantly decreased in a concentration-dependent manner (i) the ATP calcium
309 response via the IP_3 /ER pathway (ii) the ER leakage revealed by stimulation with acute
310 thapsigargin and (iii) the ER $[Ca^{2+}]$ content (fluo4-FF experiment). The data show a decrease
311 in ER $[Ca^{2+}]$ and an increase in basal $[Ca^{2+}]_c$ after FW2 NPs exposure, which could
312 correspond to a leakage of calcium from the ER into the cytosol. Finally, we demonstrated
313 that the impairment of ATP-induced calcium response was strongly reduced by a pre-
314 treatment with antioxidant enzymes suggesting that FW2 NPs-induced alteration of
315 intracellular signaling cascade was closely correlated to oxidative stress. All these data
316 suggest that FW2 NPs-induced $[Ca^{2+}]_i$ increase appears to operate via release of the
317 intracellular calcium source by disruption of ER calcium stores. Some studies have shown the
318 role of H_2O_2 in ER stress with oxidation of proteins in cysteine, tyrosine and tryptophan
319 residues [40]. Oxidative stress can break the S-S bonds or/and create new ones within proteins
320 or peptides, which lead to ER disruption [41]. The following two mechanisms can be involved
321 in: (i) a constant leakage of Ca^{2+} from the ER to the cytosol due to the protein oxidation via
322 the ROS overproduction [42], or (ii) a SERCA pump disruption [43]. ER stress is tightly
323 related to oxidative stress and to mitochondrial damages [44]. Mitochondria acts as a primary
324 target for NPs exposure [45] and few studies have reported that NPs (such as SiO_2) could,
325 after cell internalization, accumulate into mitochondria [46]. However, the mechanisms by
326 which FW2 NPs interact with this intracellular target and induces HPAEC mitochondria

327 dysfunction have not yet been investigated. We showed here that, after rapid (1 h)
328 internalization into cells, FW2 NPs were mainly clustered into vesicles, organized in
329 aggregates and rarely free in the cytoplasm. While no particles were found into mitochondria,
330 the presence of FW2 NPs very close to mitochondria and the overproduction of intracellular
331 ROS suggest that function of this organelle could be impaired. We consequently investigated
332 the adverse effects of FW2 NPs on endothelial mitochondrial function. Our data showed an
333 increase in mitochondria endogenous superoxide anion production (from 5 $\mu\text{g}/\text{cm}$). These
334 results are in accordance with those reported in the literature in aortic and umbilical
335 endothelial cells [47]. Interestingly, at the same concentrations, FW2 NPs induce in HPAEC a
336 slight (< 25%) but significant decrease of mitochondrial activity (measured by the WST-1
337 assay) which could be correlated to overproduction of mitochondrial $\text{O}_2^{\cdot-}$. This decrease in
338 mitochondrial activity appears to be correlated to a reduction of HPAEC cell viability.
339 Increase of mitochondrial oxidative stress after FW2 NPs exposure will lead to mitochondrial
340 target alteration and could exacerbate intracellular ROS production thus generating a vicious
341 cycle that contributes to the physiopathology of vascular diseases [48]. Mitochondria also act
342 as a calcium buffer site that cooperates with ER to regulate the intracellular calcium
343 homeostasis [49]. By increasing mitochondrial ROS, FW2 NPs-induced mitochondrial
344 alteration could, in turns, account for the calcium homeostasis alteration induced by these
345 particles. Indeed, this $[\text{Ca}^{2+}]_m$ increase was strongly reduced by a pre-treatment with
346 antioxidant enzymes confirming that FW2 NPs-induced alteration in mitochondrial calcium
347 homeostasis was closely correlated to an increase in $\text{O}_2^{\cdot-}$. Our results with the intracellular
348 calcium chelator (BAPTA-AM) suggest that the increase in $[\text{Ca}^{2+}]_m$ is not coming from the
349 cytosol. However, we can hypothesize a direct passage of calcium from the reticulum to
350 mitochondria via the Mitochondria-Associated ER-Membrane (MAM) [50,51]. Alternatively,
351 we can also hypothesize that the up-regulated $[\text{Ca}^{2+}]_m$ could be explained by the inhibition of

352 the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ mitochondrial activity exchanger [52] which limits the release of calcium from
1
2 353 the mitochondria leading, in turn, to an increase of $[\text{Ca}^{2+}]_m$. Our results also indicate that FW2
3
4 354 NPs-induced mitochondrial membrane depolarization could be explained by mitochondrial
5
6
7 355 ROS over-production and $[\text{Ca}^{2+}]_m$ overload. FW2 NPs-induced Ψ_{MP} decrease was
8
9 356 significantly attenuated by inhibition of oxidative pathways. We assume that increase in
10
11 357 $[\text{Ca}^{2+}]_m$ along with mitochondrial $\text{O}_2^{\cdot-}$ overproduction in mitochondrial matrix could lead to
12
13 358 opening the mPT and release cytochrome c (often associated with lowering of transmembrane
14
15 359 potential $\Delta\Psi_m$) which induced apoptotic cell death [53]. In this connection, it has been shown
16
17 360 that mitochondrial morphology alteration induces mitochondrial membrane depolarization
18
19 361 [54]. Moreover, cellular uptake and trafficking of NPs play a key role in NPs-induced
20
21 362 toxicity. The present results show that no FW2 NPs were observed in mitochondria and
22
23 363 nucleus after internalization. However, large aggregates of FW2 NPs were present very close
24
25 364 to mitochondria and could critically interfere with mitochondrial functions. Some studies have
26
27 365 reported that NPs (SiO_2 , Fe_2O_3) cause mitochondrial swelling, cristae disruption or
28
29 366 disappearance and mitochondria vacuolization in several cell types [55]. Regarding
30
31 367 mitochondria biogenesis and dynamic, our study provides evidence that FW2 NPs induce
32
33 368 similar morphology and structure alterations in HPAEC cells as shown in Fig. 7. The fact that
34
35 369 mitochondrial dynamics alterations (fusion/fission equilibrium perturbation) alter
36
37 370 mitochondrial morphology [56] supports our findings (Fig. 8).

371

372

373

374

375

376

377 **Conclusions**

1
2 378 This study provides evidence that FW2 NPs-induced oxidative species production in HPAEC
3
4 379 causes redox imbalance and appears to be the main molecular mechanism leading to
5
6
7 380 mitochondrial impairment and endothelial dysfunction via calcium signaling and intracellular
8
9 381 homeostasis alterations. Endothelial dysfunction is a critical event involved in the
10
11 382 physiopathology of cardiovascular diseases. Exposure to FW2 NPs may thus be a risk factor
12
13
14 383 for the exacerbation of pre-existent cardiovascular diseases such as pulmonary hypertension.
15

16 384

17 385

18 386

19 387

20 388

21 389

22 390

23 391

24 392

25 393

26 394

27 395

28 396

29 397

30 398

31 399

32 400

33 401

402 **Methods**

403 *Reagents and chemicals*

404 The standard physiological salt solution (PSS) was composed of: 130 mM NaCl, 5.6 mM
405 KCl, 8 mM HEPES, 11 mM Glucose, 1 mM Mg²⁺ and 2 mM Ca²⁺, adjusted at pH=7.4 with
406 NaOH. All the fluorescent probes were obtained from ThermoFischer Scientific, Invitrogen™
407 (Illkirch, France), except Rhod-2, AM red dye which was obtained from Euromedex
408 (Souffelweyersheim, France). All the probes were diluted in DMSO. All of the following
409 chemical reagents were purchased from Sigma-Aldrich (St-Quentin-Fallavier, France): 1,2-
410 bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid (BAPTA-AM) was used as a specific
411 calcium intracellular chelator, diluted in culture medium (5 μM); Adenosine triphosphate
412 (ATP) was used as an inductor of the phospholipase C beta/Inositol triphosphate pathway
413 which induces Ca²⁺ release from the endoplasmic reticulum to the cytosol, diluted in PSS (20
414 μM); Carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone (CCCP) used as mitochondrial fission
415 inductor, diluted in culture medium (5 μM); Ethylene glycol-bis(β-aminoethyl ether)-
416 N,N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA) was used as a chelator of extracellular calcium, diluted in
417 culture medium (5 mM); Thapsigargin was used as a non-competitive inhibitor of the
418 sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase, diluted in PSS (1 μM); Superoxyde dismutase–
419 polyethylene glycol (PEG-SOD) and Catalase–polyethylene glycol (PEG-CAT) were used as
420 antioxidants enzymes, diluted in culture medium (300 U/ ml and 600 U/ ml respectively).

421

422 *NPs characterization*

423 The black carbon nanoparticles (FW2 NPs) were acquired from Degussa (Evonik Industries,
424 Essen, Germany). FW2 NPs physical and chemical properties have been extensively
425 described by [7, 57]. They consist in elemental carbon and have the following characteristics:
426 mean aerodynamic diameter of 13 nm, surface area of 350 m²/g and pH = 2.5. FW2 NPs were

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

427 suspended in Endothelial Cell Growth Medium (ECGM) at a final concentration of 2 mg/ml
428 and stored at 4°C until use. Immediately prior use, stock suspensions were vortexed, sonicated
429 at 3 x 30s (Vibracell 75186, 130 W, 56 - 60 Hz) and freshly diluted at appropriate
430 concentrations (1-10 µg/cm) in ECGM culture-medium.

431

432 *Cell culture*

433 All experiments were done on cultured HPAEC isolated from pulmonary artery main branch
434 of a 23-year old male Caucasian donor. HPAEC were acquired from PromoCell®
435 (Heidelberg, Germany) and were grown in ECGM culture-medium (with phenol red)
436 supplemented with a Supplement Mix [2% fetal bovine serum (FBS), 0.4% endothelial cell
437 growth factor (ECGF), 0.1 ng/ml epidermal growth factor (EGF), 1 ng/ml basic fibroblast
438 growth factor (BFGF), 90 µg/ml heparin, and 1 µg/ml hydrocortisone, PromoCell®]. Cells
439 were seeded at 10,000 cells/cm² on 25 cm² culture flasks and were maintained at 37°C, in a
440 95% humidified air and 5% CO₂. Cell passages were performed when about 80% confluence
441 was achieved. All experiments were done on HPAEC from passages 2 to 8.

442

443 *Cytotoxicity assay*

444 Cell viability was assessed using the WST-1 (Water Soluble Tetrazolium) cell proliferation
445 reagent (Roche, France) according to the manufacturer's recommendations. This assay
446 assumes that the relative number of viable cells is proportional with the mitochondrial
447 enzymatic activity. Cells were seeded, in a 96-well culture plate, at 20,000 cells/cm for 24 h,
448 at 37°C and 5% CO₂. Then, cells were rinsed two times with ECGM culture-medium (without
449 phenol red) and cells were exposed with FW2 NPs (concentration range from 1 to 10 µg/cm)
450 for 24 h at 37°C and 5% CO₂. After a 24 h-treatment with FW2 NPs, cells were rinsed with
451 ECGM and incubated for 3 h with WST-1 reagent. The absorbance was measured at 450 nm

1
2 452 by spectrophotometry using a microplate spectrophotometer reader (SPECTROstarNano2.10,
3 453 BMG Labtech®, Germany). The working concentrations for all further experiments were
4
5 454 determined by this test (mortality rate less than 25%).
6

7 455

8
9
10 456 *Global reactive oxygen species production*

11
12 457 Intracellular ROS production was measured using the CM-H₂DCFDA probe (Fisher
13
14 458 Scientific®) according to the manufacturer's recommendations and using the method adapted
15
16 459 from [58,59]. HPAEC cells were seeded at 50,000 cells/cm² in a 24-well plate and cultured for
17
18 460 24 h, at 37°C and 5% CO₂. Cells were rinsed with Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) and
19
20
21 461 were pre-incubated for 20 min with CM-H₂DCFDA probe (final concentration 20 μM) in
22
23 462 HBSS. Cells were then rinsed with HBSS before a 4 h-exposure with FW2 NPs, at different
24
25 463 concentrations (5–10 μg/cm²), at 37°C. Fluorescence intensity was measured at λ_{ex}=485 nm
26
27 464 and λ_{em}=520 nm with spectrofluorimetry by using FLUOstar Omega 2.10 plate reader and the
28
29
30
31 465 analyses were performed with the MARS Data Analysis Software 2.30 R3 (BMG Labtech®).
32
33

34 466

35
36 467 *Superoxide anion detection by electron paramagnetic resonance (EPR)-spin trapping*

37
38
39 468 EPR assay was performed as previously described [34,60]. HPAEC cells were seeded at
40
41 469 50,000 cells/cm² in a 12-well plate and cultured for 24 h, at 37°C and 5% CO₂. After a 4 h-
42
43 470 exposition with FW2 NPs, at different concentrations (5–10 μg/cm²), at 37°C and 5% CO₂,
44
45 471 cells were incubated for 20 min with the spin-probe mix containing CMH (1 mM),
46
47 472 diethyldithiocarbamate (5 μM) and deferoxamine (25 μM) in Krebs-HEPES Buffer solution.
48
49
50
51 473 Then, cells were scraped, homogenized and frozen in a syringe in liquid nitrogen before EPR
52
53 474 analysis. All the EPR spectra were recorded using a Spectrometer X Miniscope MS200
54
55 475 (Magnettech®, Berlin, Germany). The following EPR conditions were used: benchtop
56
57
58 476 spectrometer working at X-band (9.4 GHz) with a B0 fields 3339.4 G, B0 sweep 293.84 G,
59
60
61
62

477 sweep time 60 sec, modulation amplitude 0.5, modulation frequency 100 kHz, modulation
478 5000 G, microwave attenuation 10 dB, gain 100. Spectra were quantified by peak amplitude
479 measurement using the Miniscope software (control 6.51 and Analysis 2.02). After the
480 reading of EPR spectra, protein quantities were measured by a Lowry-test (Lowry reagent,
481 Sigma Aldrich) according to the manufacturer's recommendations. The results were
482 normalized to protein quantities and expressed in EPR signal amplitude in arbitrary units
483 (AU)/ mg/ml of protein.

485 *Cytosolic calcium measurement by confocal microscopy*

486 Variation in intracellular cytosolic calcium $[Ca^{2+}]_i$ was detected using the Fluo-4, AM green
487 dye (1-[2-amino-5-(2,7-difluoro-6-hydroxy-3-oxo-9-xanthenyl)phenoxy]-2-(2-amino-5-
488 methylphenoxy) ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid, pentaacetoxymethyl ester)
489 (ThermoFischer®) according to the manufacturer's recommendations. HPAEC cells were
490 seeded at 20,000 cells/cm² in a 96-well plate and cultured for 24 h, at 37°C and 5% CO₂.
491 Then, HPAEC were exposed to the FW2 NPs suspension (5-10 µg/cm²) for 4 h. After the
492 exposure, cells were incubated for 30 min (in the dark) at 37°C with 1 µM Fluo-4, AM probe
493 in the PSS. At last, in order to measure the acute responses with ATP and thapsigargin, cells
494 were rinsed with the PSS and 100 µl of this solution was added in each well. In some
495 experiments, Fluo-4, AM probe was co-incubated with a nucleus probe (Hoeschst 33342 –
496 final concentration 2 µM). The plates were observed at X200 magnification with an oil
497 immersion objective on a laser scanning confocal microscope (TE 2000, Nikon). Fluorescence
498 intensity was measured for Fluo-4, AM at 488/515 nm and for Hoeschst at 408/450 nm. The
499 analyses were performed using NIS-Elements AR software 3.0 and Microsoft Office Excel
500 2007.

501

502 *Endoplasmic reticulum calcium measurement by confocal microscopy*

1
2 503 Endoplasmic reticulum (ER) calcium [Ca²⁺] was detected using the Fluo-4FF, AM green dye
3
4 504 at 10 μM (ThermoFischer®). HPAEC cells were seeded at 20,000 cells/cm² in a 96-well plate
5
6
7 505 and cultured for 24 h, at 37°C and 5% CO₂. Then, HPAEC were exposed to the FW2 NPs
8
9 506 suspension (5-10 μg/cm²) for 4 h. After the exposure, cells were incubated for 30 min (in the
10
11
12 507 dark) at 37°C with 10 μM Fluo-4FF, AM probe in the PSS. In some experiments, Fluo-4FF,
13
14 508 AM probe was co-incubated with an endoplasmic reticulum specific probe (ER-tracker – final
15
16
17 509 concentration 2 μM) for colocalization experiments. The plates were observed at X200
18
19 510 magnification with an oil immersion objective on a laser scanning confocal microscope (TE
20
21
22 511 2000, Nikon). Fluorescence intensity was measured at 488/515 nm, and for ER-tracker at
23
24 512 408/450 nm (excitation/emission). The analyses were performed using NIS-Elements AR
25
26
27 513 software 3.0 and Microsoft Office Excel 2007.

28
29 514

30
31 515 *Mitochondrial calcium measurement by confocal microscopy*

32
33
34 516 Mitochondrial calcium [Ca²⁺]_m was assessed using Rhod-2, AM red dye (Euromedex)
35
36 517 according to the manufacturer's recommendations. HPAEC cells were seeded at 20,000
37
38
39 518 cells/cm² in a 96-well plate and cultured for 24 h, at 37°C and 5% CO₂. Then, HPAEC were
40
41 519 exposed to the FW2 NPs suspension (5-10 μg/cm²) for 4 h. After the exposure, cells were
42
43
44 520 incubated for 30 min (in the dark) at 37°C with 1 μM Rhod-2, AM probe in the PSS. The
45
46 521 plates were observed at X200 magnification with an oil immersion objective on a laser
47
48
49 522 scanning confocal microscope (TE 2000, Nikon). Fluorescence intensity was measured at
50
51 523 543/605 nm. The analyses were performed using NIS-Elements AR software 3.0 and
52
53 524 Microsoft Office Excel 2007.

54
55
56 525

57
58 526

527 *Mitochondrial superoxide anion production by confocal microscopy*

1
2 528 Mitochondrial superoxide anion $O_2^{\cdot-}$ formation was assessed using MitoSOX™ red dye
3
4 529 (ThermoFischer®) according to the manufacturer's recommendations. HPAEC cells were
5
6
7 530 seeded at 20,000 cells/cm² in a 96-well plate and cultured for 24 h, at 37°C and 5% CO₂.
8
9 531 Then, HPAEC were exposed to the FW2 NPs suspension (5-10 μg/cm²) for 4 h. After the
10
11 532 exposure, cells were incubated for 10 min (in the dark) at 37°C with 5 μM MitoSOX™ probe
12
13 533 in the PSS. In some experiments, MitoSOX™ probe was co-incubated with a mitochondrial
14
15 534 probe (Mitotracker green – final concentration 1 μM) for colocalization experiments. The
16
17 535 plates were observed at X200 magnification with an oil immersion objective on a laser
18
19 536 scanning confocal microscope (TE 2000, Nikon). Fluorescence intensity was measured for
20
21 537 MitoSOX at 543/605 nm and for Mitotracker at 488/515 nm. The analyses were performed
22
23 538 using NIS-Elements AR software 3.0 and Microsoft Office Excel 2007.

24
25
26
27
28
29 539
30
31 540 *Mitochondrial membrane potential measurement by confocal microscopy*

32
33
34 541 The mitochondrial membrane potential (Ψ_{MP}) was measured by TMRM red dye
35
36 542 (Tetramethylrhodamine, Methyl Ester, Perchlorate) (ThermoFischer®) according to the
37
38 543 manufacturer's recommendations. HPAEC cells were seeded at 20,000 cells/cm² in a 96-well
39
40 544 plate and cultured for 24 h, at 37°C and 5% CO₂. Then, HPAEC were exposed to the FW2
41
42 545 NPs suspension (5-10 μg/cm²) for 4 h. After the exposure, cells were incubated for 20 min (in
43
44 546 the dark) at 37°C with 100 nM TMRM probe in the PSS. The plates were observed at X200
45
46 547 magnification with an oil immersion objective on a laser scanning confocal microscope (TE
47
48 548 2000, Nikon). Fluorescence intensity was measured at 543/605 nm. The analyses were
49
50 549 performed using NIS-Elements AR software 3.0 and Microsoft Office Excel 2007.

51
52
53
54
55
56 550

57
58 551

552 *NPs Internalisation studies*

1
2 553 Cells were seeded at 20,000 cells/cm² on plastic Lab-Tek chambers (Dutscher, France) and
3
4 554 cultured in supplemented ECGM, for 24 h, at 37°C and 5% CO₂. Cells were then exposed or
5
6
7 555 not (control cells) to FW2 NPs at 7.5 µg/cm², for 1 h at 37°C and 5% CO₂. Finally, cells were
8
9 556 fixed with 1.6% paraformaldehyde and 2% glutaraldehyde in 0.08 M cacodylate buffer (pH
10
11 557 7.4) during 2 h at room temperature (RT). After washing in 0.1 M cacodylate buffer, cells
12
13
14 558 were post-fixed in a mix 1% osmium tetroxide (v/v)/ 1% potassium ferricyanide K₃Fe(CN)₆
15
16 559 (p/v) in 0.1 M cacodylate buffer during 2 h on ice in the dark. Then, samples were washed in
17
18
19 560 water, and stained in block in 0.5% aqueous uranyl acetate solution during 30 min at RT in
20
21
22 561 the dark. Subsequently, cells were washed and dehydrated through a series of graded ethanol
23
24 562 and embedded in a mixture of pure ethanol and epoxy resin 50/50 (v/v) (Epon 812; Delta
25
26 563 Microscopie, Toulouse, France) during 2 h and then in 100% resin overnight at RT. The
27
28
29 564 polymerization of the resin was carried out during 48 h at 60°C. Samples were then sectioned
30
31
32 565 using a diamond knife (Diatome, Biel-Bienne, Switzerland) on an ultramicrotome (EM UCT,
33
34 566 Leica Microsystems, Vienna, Austria). Ultrathin sections (65 nm) were picked up on copper
35
36 567 grids and then stained with Uranylless (Delta Microscopies, Toulouse, France) and lead citrate.
37
38
39 568 Grids were examined with a Transmission Electron Microscope (H7650, Hitachi, Tokyo,
40
41 569 Japan) at 80 kV.

42
43
44 570

45
46 571 *Mitochondrial dynamic imaging*

47
48
49 572 Mitochondrial dynamic was assessed using Mitotracker green dye (ThermoFischer®)
50
51 573 according to the manufacturer's recommendations. HPAEC cells were seeded at 20,000
52
53 574 cells/cm² in a 96-well plate and cultured for 24 h, at 37°C and 5% CO₂. Then, HPAEC were
54
55
56 575 exposed to the FW2 NPs suspension (5-10 µg/cm²) for 4 h. After the exposure, cells were
57
58 576 incubated for 30 min (in the dark) at 37°C with 1 µM Mitotracker probe in the PSS, co-

1 577 incubated with a nucleus probe (Hoeschst 33342 – final concentration 2 μ M). The plates were
2 578 observed at X600 magnification with an oil immersion objective on a laser scanning confocal
3
4 579 microscope (TE 2000, Nikon). Fluorescence intensity was measured for Mitotracker at
5
6 580 488/515 nm and for Hoeschst at 408/450 nm (excitation/emission). The analyses were
7
8
9 581 performed using NIS-Elements AR software 3.0 and Microsoft Office Excel 2007.

10
11
12 582

13
14 583 *Statistical analysis*

15
16
17 584 Each experimental condition was independently repeated three times and for each
18
19 585 independent experiment, 3 to 8 wells per condition were done. Data were expressed as mean \pm
20
21 586 Standard Error of the Mean (SEM) for 3 independent experiments ($n = 3$). Statistical analyses
22
23 587 were performed using one-way ANOVA with Tukey's post-test for multiple comparisons ($n >$
24
25 588 30), and by Kruskal Wallis test with Dunn's post- test ($n < 30$) (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p <$
26
27 589 0.001) with GraphPad statistics software. P values < 0.05 were considered significant.

28
29
30 590

31
32
33 591

34
35
36 592

37
38
39 593

40
41 594

42
43 595

44
45 596

46
47 597

48
49 598

50
51 599

52
53 600

54
55 601

602 **List of abbreviations:**

603 NPs, nanoparticles; HPAEC, human pulmonary artery endothelial cells; ROS, reactive oxygen
604 species; Ca²⁺, calcium; ATP, adenosine triphosphate; ER, endoplasmic reticulum; ECGM,
605 endothelial cell growth medium; PSS, physiological salt solution; ΨMP: mitochondrial
606 membrane potential

608 **Declarations:**

609 **Ethics approval and consent to participate**

610 Not applicable

611 **Consent for publication**

612 Not applicable

613 **Availability of data and material**

614 Not applicable

615 **Competing interests**

616 The authors declare that they have no competing interests

617 **Funding**

618 Not applicable

619 **Authors' contributions**

620 JD performed the experiments and was a major contributor in writing the manuscript. All
621 authors read and approved the final manuscript.

622 SL and EG were involved in acquisition of data for MET results

623 **Acknowledgements**

624 The PhD of Juliette DEWEIRD is supported by the “Fondation pour la Recherche Médicale”
625 – FRM PMJ20151034585.

626

627 **References**

- 1
2 628 1. Pope CA, 3rd, Turner MC, Burnett RT, Jerrett M, Gapstur SM, Diver WR, et al.
3
4 629 Relationships between fine particulate air pollution, cardiometabolic disorders, and
5
6 cardiovascular mortality. *Circulation research*. 2015;116(1):108-15.
7 630
8
9 631 2. WHO. Ambient (outdoor) air quality and health 2018. Available from:
10
11 [http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/ambient-\(outdoor\)-air-quality-and-health](http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/ambient-(outdoor)-air-quality-and-health).
12 632
13
14 633 3. Oberdorster G, Utell MJ. Ultrafine particles in the urban air: to the respiratory tract--
15
16 and beyond? *Environmental health perspectives*. 2002;110(8):A440-1.
17 634
18
19 635 4. Janssen NA, Hoek G, Simic-Lawson M, Fischer P, van Bree L, ten Brink H, et al.
20
21 Black carbon as an additional indicator of the adverse health effects of airborne particles
22 636 compared with PM10 and PM2.5. *Environmental health perspectives*. 2011;119(12):1691-9.
23
24 637
25
26 638 5. Boland S, Hussain S, Baeza-Squiban A. Carbon black and titanium dioxide
27
28 nanoparticles induce distinct molecular mechanisms of toxicity. *Wiley interdisciplinary*
29 639 *reviews Nanomedicine and nanobiotechnology*. 2014;6(6):641-52.
30
31 640
32
33 641 6. Donaldson K, Tran L, Jimenez LA, Duffin R, Newby DE, Mills N, et al. Combustion-
34
35 derived nanoparticles: a review of their toxicology following inhalation exposure. *Particle and*
36 642 *fibre toxicology*. 2005;2:10.
37
38 643
39
40 644 7. Hussain S, Boland S, Baeza-Squiban A, Hamel R, Thomassen LC, Martens JA, et al.
41
42 Oxidative stress and proinflammatory effects of carbon black and titanium dioxide
43 645 nanoparticles: role of particle surface area and internalized amount. *Toxicology*. 2009;260(1-
44
45 646 3):142-9.
46
47
48 647
49
50 648 8. Nemmar A, Hoet PH, Vanquickenborne B, Dinsdale D, Thomeer M, Hoylaerts MF, et
51
52 al. Passage of inhaled particles into the blood circulation in humans. *Circulation*.
53 649
54
55 650 2002;105(4):411-4.
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

- 651 9. Miller MR, Raftis JB, Langrish JP, McLean SG, Samutrtai P, Connell SP, et al.
1
2 652 Inhaled Nanoparticles Accumulate at Sites of Vascular Disease. *ACS nano*. 2017;11(5):4542-
3
4 653 52.
5
6
7 654 10. Vanhoutte PM, Shimokawa H, Feletou M, Tang EH. Endothelial dysfunction and
8
9 655 vascular disease - a 30th anniversary update. *Acta physiologica (Oxford, England)*.
10
11 656 2017;219(1):22-96.
12
13
14 657 11. Mills NL, Donaldson K, Hadoke PW, Boon NA, MacNee W, Cassee FR, et al.
15
16 658 Adverse cardiovascular effects of air pollution. *Nature clinical practice Cardiovascular*
17
18 659 *medicine*. 2009;6(1):36-44.
19
20
21 660 12. Favero G, Paganelli C, Buffoli B, Rodella LF, Rezzani R. Endothelium and its
22
23 661 alterations in cardiovascular diseases: life style intervention. *BioMed research international*.
24
25 662 2014;2014:801896.
26
27
28 663 13. Rich DQ, Schwartz J, Mittleman MA, Link M, Luttmann-Gibson H, Catalano PJ, et al.
29
30 664 Association of short-term ambient air pollution concentrations and ventricular arrhythmias.
31
32 665 *American journal of epidemiology*. 2005;161(12):1123-32.
33
34
35 666 14. Park SK, O'Neill MS, Vokonas PS, Sparrow D, Schwartz J. Effects of air pollution on
36
37 667 heart rate variability: the VA normative aging study. *Environmental health perspectives*.
38
39 668 2005;113(3):304-9.
40
41
42 669 15. Courtois A, Andujar P, Ladeiro Y, Ducret T, Rogerieux F, Lacroix G, et al. Effect of
43
44 670 engineered nanoparticles on vasomotor responses in rat intrapulmonary artery. *Toxicology*
45
46 671 *and applied pharmacology*. 2010;245(2):203-10.
47
48
49 672 16. Maynard D, Coull BA, Gryparis A, Schwartz J. Mortality risk associated with short-
50
51 673 term exposure to traffic particles and sulfates. *Environmental health perspectives*.
52
53 674 2007;115(5):751-5.
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
- 675 17. Rodat L, Savineau JP, Marthan R, Guibert C. Effect of chronic hypoxia on voltage-
676 independent calcium influx activated by 5-HT in rat intrapulmonary arteries. *Pflugers Archiv :
677 European journal of physiology.* 2007;454(1):41-51.
- 678 18. Guibert C, Marthan R, Savineau JP. Modulation of ion channels in pulmonary arterial
679 hypertension. *Current pharmaceutical design.* 2007;13(24):2443-55.
- 680 19. Lai N, Lu W, Wang J. Ca(2+) and ion channels in hypoxia-mediated pulmonary
681 hypertension. *International journal of clinical and experimental pathology.* 2015;8(2):1081-
682 92.
- 683 20. Stone V, Tuinman M, Vamvakopoulos JE, Shaw J, Brown D, Petterson S, et al.
684 Increased calcium influx in a monocytic cell line on exposure to ultrafine carbon black. *The
685 European respiratory journal.* 2000;15(2):297-303.
- 686 21. Donaldson K, Tran CL. Inflammation caused by particles and fibers. *Inhalation
687 toxicology.* 2002;14(1):5-27.
- 688 22. Calderon-Garciduenas L, Mora-Tiscareno A, Fordham LA, Chung CJ, Garcia R,
689 Osnaya N, et al. Canines as sentinel species for assessing chronic exposures to air pollutants:
690 part 1. Respiratory pathology. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of
691 Toxicology.* 2001;61(2):342-55.
- 692 23. Cao Y, Roursgaard M, Danielsen PH, Moller P, Loft S. Carbon black nanoparticles
693 promote endothelial activation and lipid accumulation in macrophages independently of
694 intracellular ROS production. *PloS one.* 2014;9(9):e106711.
- 695 24. Brown DM, Dickson C, Duncan P, Al-Attili F, Stone V. Interaction between
696 nanoparticles and cytokine proteins: impact on protein and particle functionality.
697 *Nanotechnology.* 2010;21(21):215104.

- 698 25. Quintero M, Colombo SL, Godfrey A, Moncada S. Mitochondria as signaling
699 organelles in the vascular endothelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of*
700 *the United States of America.* 2006;103(14):5379-84.
- 701 26. Davidson SM, Duchon MR. Endothelial mitochondria: contributing to vascular
702 function and disease. *Circulation research.* 2007;100(8):1128-41.
- 703 27. Yu Q, Chan SY. Mitochondrial and Metabolic Drivers of Pulmonary Vascular
704 Endothelial Dysfunction in Pulmonary Hypertension. *Advances in experimental medicine and*
705 *biology.* 2017;967:373-83.
- 706 28. Ke S, Zhou T, Yang P, Wang Y, Zhang P, Chen K, et al. Gold nanoparticles enhance
707 TRAIL sensitivity through Drp1-mediated apoptotic and autophagic mitochondrial fission in
708 NSCLC cells. *International journal of nanomedicine.* 2017;12:2531-51.
- 709 29. Shen Y, Wu L, Qin D, Xia Y, Zhou Z, Zhang X, et al. Carbon black suppresses the
710 osteogenesis of mesenchymal stem cells: the role of mitochondria. *Particle and fibre*
711 *toxicology.* 2018;15(1):16.
- 712 30. Zhang R, Piao MJ, Kim KC, Kim AD, Choi JY, Choi J, et al. Endoplasmic reticulum
713 stress signaling is involved in silver nanoparticles-induced apoptosis. *The international*
714 *journal of biochemistry & cell biology.* 2012;44(1):224-32.
- 715 31. Simon M, Saez G, Muggiolu G, Lavenas M, Le Trequesser Q, Michelet C, et al. In
716 situ quantification of diverse titanium dioxide nanoparticles unveils selective endoplasmic
717 reticulum stress-dependent toxicity. *Nanotoxicology.* 2017;11(1):134-45.
- 718 32. Landrigan PJ. Air pollution and health. *The Lancet Public health.* 2017;2(1):e4-e5.
- 719 33. Guo C, Xia Y, Niu P, Jiang L, Duan J, Yu Y, et al. Silica nanoparticles induce
720 oxidative stress, inflammation, and endothelial dysfunction in vitro via activation of the
721 MAPK/Nrf2 pathway and nuclear factor-kappaB signaling. *International journal of*
722 *nanomedicine.* 2015;10:1463-77.

- 723 34. Deweirdt J, Quignard JF, Crobeddu B, Baeza-Squiban A, Sciare J, Courtois A, et al.
1
2 724 Involvement of oxidative stress and calcium signaling in airborne particulate matter - induced
3
4 725 damages in human pulmonary artery endothelial cells. *Toxicology in vitro : an international*
5
6 726 *journal published in association with BIBRA*. 2017;45(Pt 3):340-50.
7
8
9 727 35. Dubes V, Parpaite T, Ducret T, Quignard JF, Mornet S, Reinhardt N, et al. Calcium
10
11 728 signalling induced by in vitro exposure to silicium dioxide nanoparticles in rat pulmonary
12
13 729 artery smooth muscle cells. *Toxicology*. 2017;375:37-47.
14
15
16 730 36. Oshima T, Ozono R, Yano Y, Higashi Y, Teragawa H, Miho N, et al. Beneficial effect
17
18 731 of T-type calcium channel blockers on endothelial function in patients with essential
19
20 732 hypertension. *Hypertension research : official journal of the Japanese Society of*
21
22 733 *Hypertension*. 2005;28(11):889-94.
23
24
25 734 37. Cioffi DL. Redox regulation of endothelial canonical transient receptor potential
26
27 735 channels. *Antioxidants & redox signaling*. 2011;15(6):1567-82.
28
29
30 736 38. Goedicke-Fritz S, Kaistha A, Kacik M, Markert S, Hofmeister A, Busch C, et al.
31
32 737 Evidence for functional and dynamic microcompartmentation of Cav-1/TRPV4/K(Ca) in
33
34 738 caveolae of endothelial cells. *European journal of cell biology*. 2015;94(7-9):391-400.
35
36
37 739 39. Bagur R, Hajnoczky G. Intracellular Ca(2+) Sensing: Its Role in Calcium Homeostasis
38
39 740 and Signaling. *Molecular cell*. 2017;66(6):780-8.
40
41
42 741 40. Sharov VS, Schoneich C. Diastereoselective protein methionine oxidation by reactive
43
44 742 oxygen species and diastereoselective repair by methionine sulfoxide reductase. *Free radical*
45
46 743 *biology & medicine*. 2000;29(10):986-94.
47
48
49 744 41. van der Wijk T, Overvoorde J, den Hertog J. H2O2-induced intermolecular disulfide
50
51 745 bond formation between receptor protein-tyrosine phosphatases. *The Journal of biological*
52
53 746 *chemistry*. 2004;279(43):44355-61.
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

- 747 42. Bhandary B, Marahatta A, Kim HR, Chae HJ. An involvement of oxidative stress in
1
2 748 endoplasmic reticulum stress and its associated diseases. *International journal of molecular*
3
4 749 *sciences*. 2012;14(1):434-56.
5
6
7 750 43. Evangelista AM, Thompson MD, Bolotina VM, Tong X, Cohen RA. Nox4- and
8
9 751 Nox2-dependent oxidant production is required for VEGF-induced SERCA cysteine-674 S-
10
11 752 glutathiolation and endothelial cell migration. *Free radical biology & medicine*.
12
13 753 2012;53(12):2327-34.
14
15
16
17 754 44. Deniaud A, Sharaf el dein O, Maillier E, Poncet D, Kroemer G, Lemaire C, et al.
18
19 755 Endoplasmic reticulum stress induces calcium-dependent permeability transition,
20
21 756 mitochondrial outer membrane permeabilization and apoptosis. *Oncogene*. 2008;27(3):285-
22
23 757 99.
24
25
26 758 45. Xue Y, Chen Q, Ding T, Sun J. SiO₂ nanoparticle-induced impairment of
27
28 759 mitochondrial energy metabolism in hepatocytes directly and through a Kupffer cell-mediated
29
30 760 pathway in vitro. *International journal of nanomedicine*. 2014;9:2891-903.
31
32
33
34 761 46. Sun L, Li Y, Liu X, Jin M, Zhang L, Du Z, et al. Cytotoxicity and mitochondrial
35
36 762 damage caused by silica nanoparticles. *Toxicology in vitro : an international journal published*
37
38 763 *in association with BIBRA*. 2011;25(8):1619-29.
39
40
41 764 47. Li R, Ning Z, Cui J, Khalsa B, Ai L, Takabe W, et al. Ultrafine particles from diesel
42
43 765 engines induce vascular oxidative stress via JNK activation. *Free radical biology & medicine*.
44
45 766 2009;46(6):775-82.
46
47
48 767 48. Zhang DX, Gutterman DD. Mitochondrial reactive oxygen species-mediated signaling
49
50 768 in endothelial cells. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*.
51
52 769 2007;292(5):H2023-31.
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

- 770 49. Marchi S, Patergnani S, Missiroli S, Morciano G, Rimessi A, Wieckowski MR, et al.
1
2 771 Mitochondrial and endoplasmic reticulum calcium homeostasis and cell death. *Cell calcium*.
3
4 772 2018;69:62-72.
5
6
7 773 50. Yu KN, Chang SH, Park SJ, Lim J, Lee J, Yoon TJ, et al. Titanium Dioxide
8
9 774 Nanoparticles Induce Endoplasmic Reticulum Stress-Mediated Autophagic Cell Death via
10
11 775 Mitochondria-Associated Endoplasmic Reticulum Membrane Disruption in Normal Lung
12
13 776 Cells. *PloS one*. 2015;10(6):e0131208.
14
15
16
17 777 51. Ma JH, Shen S, Wang JJ, He Z, Poon A, Li J, et al. Comparative Proteomic Analysis
18
19 778 of the Mitochondria-associated ER Membrane (MAM) in a Long-term Type 2 Diabetic
20
21 779 Rodent Model. *Scientific reports*. 2017;7(1):2062.
22
23
24 780 52. Guo D, Bi H, Wang D, Wu Q. Zinc oxide nanoparticles decrease the expression and
25
26 781 activity of plasma membrane calcium ATPase, disrupt the intracellular calcium homeostasis
27
28 782 in rat retinal ganglion cells. *The international journal of biochemistry & cell biology*.
29
30 783 2013;45(8):1849-59.
31
32
33
34 784 53. Choi S, Quan X, Bang S, Yoo H, Kim J, Park J, et al. Mitochondrial calcium uniporter
35
36 785 in *Drosophila* transfers calcium between the endoplasmic reticulum and mitochondria in
37
38 786 oxidative stress-induced cell death. *The Journal of biological chemistry*. 2017;292(35):14473-
39
40 787 85.
41
42
43 788 54. Westermann B. Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. *Nature reviews*
44
45 789 *Molecular cell biology*. 2010;11(12):872-84.
46
47
48
49 790 55. Faisal M, Saquib Q, Alatar AA, Al-Khedhairy AA, Ahmed M, Ansari SM, et al.
50
51 791 Cobalt oxide nanoparticles aggravate DNA damage and cell death in eggplant via
52
53 792 mitochondrial swelling and NO signaling pathway. *Biological research*. 2016;49:20.
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

- 793 56. Zamponi N, Zamponi E, Cannas SA, Billoni OV, Helguera PR, Chialvo DR.
1
2 794 Mitochondrial network complexity emerges from fission/fusion dynamics. Scientific reports.
3
4 795 2018;8(1):363.
5
6
7 796 57. L'Azou B, Jorly J, On D, Sellier E, Moisan F, Fleury-Feith J, et al. In vitro effects of
8
9 797 nanoparticles on renal cells. Particle and fibre toxicology. 2008;5:22.
10
11
12 798 58. Wang H, Joseph JA. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay
13
14 799 using microplate reader. Free radical biology & medicine. 1999;27(5-6):612-6.
15
16
17 800 59. Chen X, Zhong Z, Xu Z, Chen L, Wang Y. 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein as a
18
19 801 fluorescent probe for reactive oxygen species measurement: Forty years of application and
20
21 802 controversy. Free radical research. 2010;44(6):587-604.
22
23
24 803 60. Billaud M, Marthan R, Savineau JP, Guibert C. Vascular smooth muscle modulates
25
26 804 endothelial control of vasoreactivity via reactive oxygen species production through
27
28 805 myoendothelial communications. PloS one. 2009;4(7):e6432.
29
30
31
32 806
33
34 807
35
36
37 808
38
39 809
40
41
42 810
43
44 811
45
46 812
47
48 813
49
50 814
51
52 815
53
54 816
55
56 817
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31

Figure 1 Cell viability and intracellular ROS production in HPAEC, after exposure with FW2 NPs (1 - 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$). (A) Cell viability after a 24 h exposure with FW2 NPs (1 - 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) measured by the WST-1 colorimetric assay. Results were expressed as the percentage of cell viability in treated cells as compared to control cells (100%). Data were mean \pm SEM of three independent experiments (8 wells/ concentration). (B) ROS production after a 4 h exposure with FW2 NPs measured by spectrofluorimetry with the CM-H₂DCFDA probe assay. The values were normalized to the untreated cells and results were expressed as the fold change of the CM-H₂DCF fluorescence intensity relative to the control cells. (C) Intracellular O₂^{•-} production after a 4 h exposure with FW2 NPs measured by EPR spectrometer with the CMH probe. Results were expressed in EPR signal amplitude in arbitrary unit (AU)/mg/ml of proteins. Data were mean \pm SEM of three independent experiments (n=3) performed in triplicate. Statistically significant at $P<0.05$ (*), $P<0.01$ (**) and $P<0.001$ (***), as compared to controls, according to Kruskal-Wallis test followed by a Dunn's Multiple Comparison test.

818

32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Figure 2 Cytoplasmic basal calcium level ($[\text{Ca}^{2+}]_c$) in HPAEC, after a 4 h exposure with FW2 NPs (5 - 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$). Calcium level was measured with Fluo-4, AM probe (1 μM), by confocal microscopy. (A) Effects of antioxidant enzymes: cells were exposed with FW2 NPs after or not 1 h pre-treatment with PEG-SOD (600 U/ml) and PEG-catalase (300 U/ml). (B) Effects of extracellular calcium on $[\text{Ca}^{2+}]_c$ level rise. HPAEC were exposed with FW2 NPs in the presence (1.6 mM $[\text{Ca}^{2+}]_e$) or in absence of extracellular calcium (0 mM $[\text{Ca}^{2+}]_e$). The values were normalized to the untreated cells and results were expressed as the fold change of the Fluo-4 probe fluorescence intensity relative to the control cells. (C) HPAEC imaging of Fluo-4, AM probe by confocal microscopy. Cells were exposed with FW2 NPs (10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) in both conditions: 1.6 mM $[\text{Ca}^{2+}]_e$ and 0 mM $[\text{Ca}^{2+}]_e$. Data were mean \pm SEM of three independent experiments (n=3), (six wells/concentration). Statistically significant at $P<0.05$ (*), $P<0.01$ (**) and $P<0.001$ (***), as compared to control 1.6 mM $[\text{Ca}^{2+}]_e$, statistically significant at $P<0.001$ (###) as compared to cells pre-treated with antioxidants enzymes, statistically significant at $P<0.001$ (\$\$\$) as compared to control 0 mM $[\text{Ca}^{2+}]_e$, according to ANOVA

test followed by Tukey's Multiple Comparison Test.

Figure 3 Effects of endoplasmic reticulum on $[Ca^{2+}]_c$ level rise after a 4 h exposure with FW2 NPs (5 - 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$). $[Ca^{2+}]_c$ was measured with Fluo-4, AM probe (1 μM) and $[Ca^{2+}]_{ER}$ with Fluo-4FF, AM probe (10 μM), by confocal microscopy. (A) ATP response (20 μM) in HPAEC exposed with FW2 NPs after or not 1 h pre-treatment with PEG-SOD (600 U/ml) and PEG-catalase (300 U/ml). (B) Thapsigargin response (1 μM) in HPAEC exposed with FW2 NPs. The values corresponded to the fluorescence intensity of the response peak. (C) $[Ca^{2+}]$ variation in endoplasmic reticulum. The values were normalized to the untreated cells and results were expressed as the fold change of the Fluo-4FF probe fluorescence intensity relative to the control cells. Data were mean \pm SEM of three independent experiments (n=3), (six wells/concentration). Statistically significant at $P<0.05(*)$, $P<0.01(**)$ and $P<0.001(***)$, as compared to controls, statistically significant at $P<0.05(\#)$ as compared to cells pre-treated with antioxidants enzymes, according to ANOVA Test followed by Tukey's Multiple Comparison Test.

Figure 4 Mitochondrial $O_2^{\cdot-}$ (mt $O_2^{\cdot-}$) production in HPAEC after a 4 h exposure with FW2 NPs (5 - 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$). mt $O_2^{\cdot-}$ was measured with MitoSOX probe (5 μM), by confocal microscopy. (A) Effects of antioxidants enzymes: cells were exposed with FW2 NPs after or not 1 h pre-treatment with PEG-SOD (600 U/ml) and PEG-catalase (300 U/ml). (B) HPAEC imaging of MitoSOX probe by confocal microscopy. Cells were exposed with FW2 NPs (10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) in both condition (with and without antioxidant enzymes). (C) Effects of extracellular calcium on mt $O_2^{\cdot-}$ level rise: cells were exposed with FW2 NPs after 30 min pre-treatment with an intracellular calcium chelator (bapta-am, 5 μM). The values were normalized to the untreated cells and results were expressed as the fold change of the MitoSOX probe fluorescence intensity relative to the control cells. Data were mean \pm SEM of three independent experiments (n=3), (six wells/concentration). Statistically significant at $P<0.01(**)$ and $P<0.001(***)$, as compared to controls, statistically significant at $P<0.05(\#)$ and $P<0.001(###)$ as compared to cells pre-treated with antioxidants enzymes, statistically significant at $P<0.01(\$)$ and

1
2
3
4 821
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38 822
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

$P < 0.001$ (\$\$\$) as compared to control with bapta-am, according to ANOVA Test followed by Tukey's Multiple Comparison Test.

Figure 5 Mitochondrial calcium level ($[Ca^{2+}]_m$) in HPAEC, after a 4 h exposure with FW2 NPs (5 - 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$). $[Ca^{2+}]_m$ was measured with Rhod-2-AM probe (1 μM), by confocal microscopy. (A) Effects of antioxidants enzymes: cells were exposed with FW2 NPs after or not 1 h pre-treatment with PEG-SOD (600 U/ml) and PEG-catalase (300 U/ml). (B) Effects of cytoplasmic calcium on $[Ca^{2+}]_m$: cells were exposed with FW2 NPs after 30 min pre-treatment with an intracellular calcium chelator (bapta-am 5 μM). The values were normalized to the untreated cells and results were expressed as the fold change of the Rhod-2 probe fluorescence intensity relative to the control cells. (C) HPAEC imaging of Rhod-2, AM probe by confocal microscopy. Cells were exposed with FW2 NPs (7.5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) in both conditions (with and without bapta-am). Data were mean \pm SEM of three independent experiments (n=3), (six wells/concentration). Statistically significant at $P < 0.01$ (**) and $P < 0.001$ (***), as compared to controls, statistically significant at $P < 0.001$ (###) as compared to cells pre-treated with antioxidants enzymes, statistically significant at $P < 0.05$ (\$) and $P < 0.001$ (\$\$\$) as compared to control with bapta-am, according to ANOVA Test followed by Tukey's Multiple Comparison Test.

Figure 6 Mitochondrial Membrane Potential (ΨMP) in HPAEC, after a 4 h exposure with FW2 NPs (5 - 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$). ΨMP was measured with TMRM probe (100 nM), by confocal microscopy. (A) Effects of antioxidants enzymes: cells were exposed with FW2 NPs after or not 1 h pre-treatment with PEG-SOD (600 U/ml) and PEG-catalase (300 U/ml). (B) HPAEC imaging of TMRM probe by confocal microscopy. Cells were exposed with FW2 NPs (10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) in both condition (with and without PEG-SOD and PEG-Catalase). (C) Effects of $[Ca^{2+}]_c$ on the ΨMP : cells were exposed with FW2 NPs after 30 min pre-treatment with an intracellular calcium chelator (bapta-am, 5 μM). The ΨMP level was expressed as the fluorescence intensity of the TMRM probe and was compared to untreated cells. Data were mean \pm SEM of three independent experiments (n=3), (six

wells/concentration). Statistically significant at $P<0.01(**)$ and $P<0.001(***)$, as compared to controls, statistically significant at $P<0.001(###)$ as compared to cells pre-treated with antioxidant enzymes, statistically significant at $P<0.001(\\$\\$\\$)$ as compared to control with bapta-am, according to ANOVA Test followed by Tukey's Multiple Comparison Test.

823

Figure 7 HPAEC observed by transmission electronic microscope (TEM). (A) FW2 NPs (7.5 $\mu\text{g}/\text{cm}$) internalization and intracellular localization in HPAEC, after 1 h exposure, observed by TEM. (B) HPAEC morphological changes in mitochondria. B1: Untreated cells, control (X11000). B2 and B3: HPAEC after 1 h exposure with FW2 NPs (X12000 and X30000). Orange arrow shows intracellular FW2 NPs aggregate. White arrows show intact mitochondria. Red arrows show mitochondria alterations. n correspond to the nucleus, m correspond to the mitochondria, v correspond to vesicles, va correspond to vacuole.

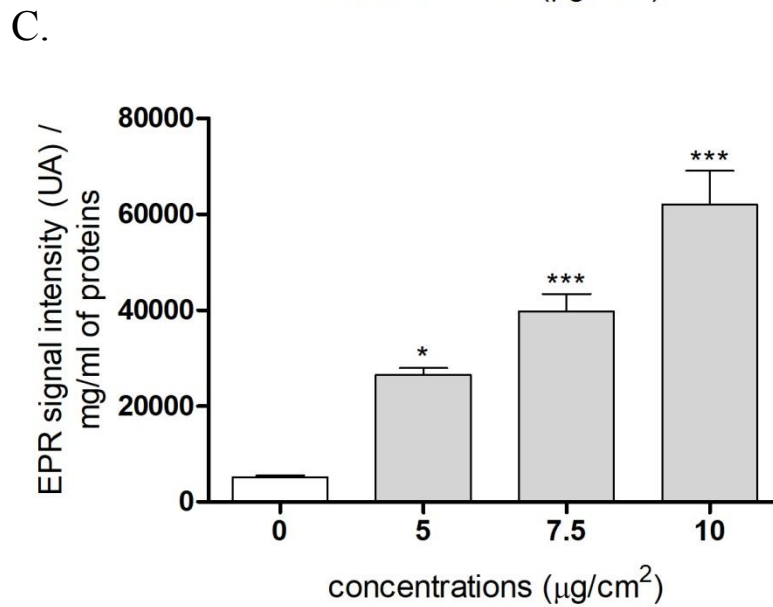
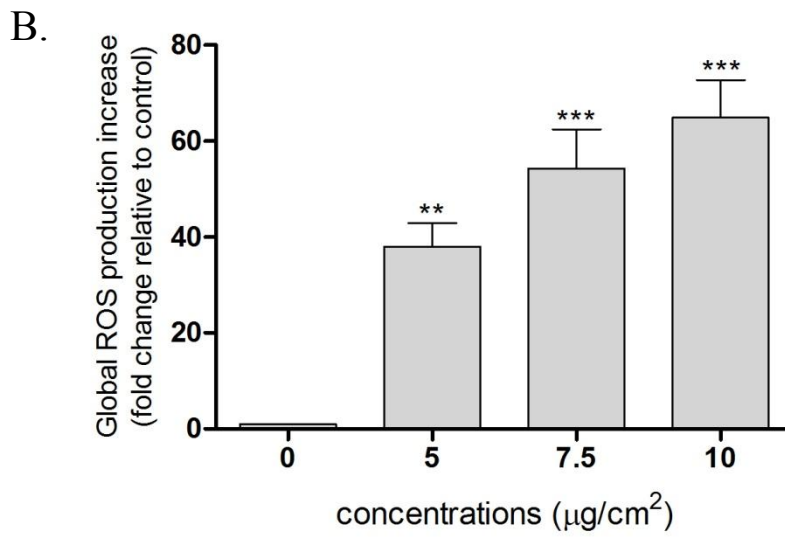
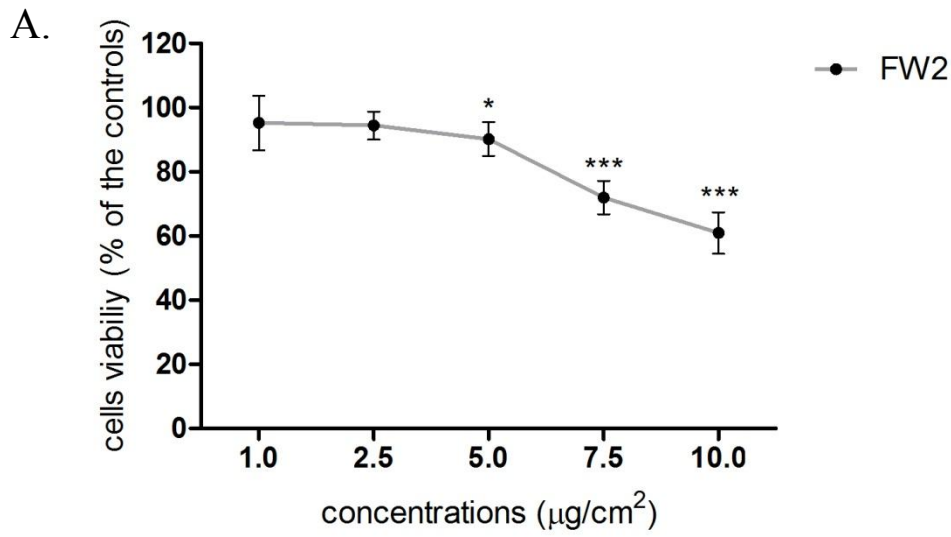
824

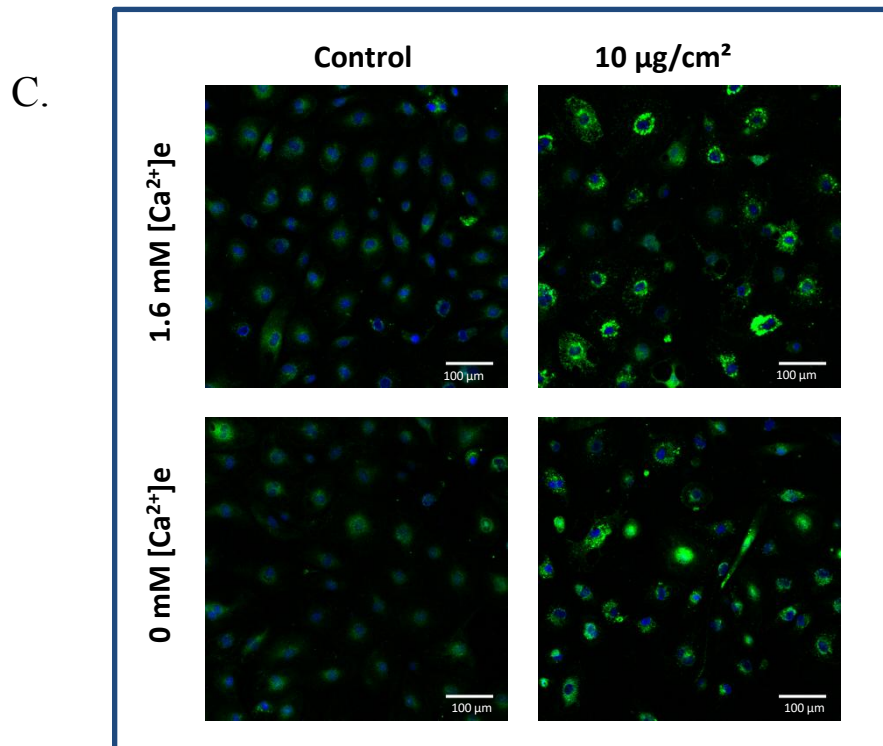
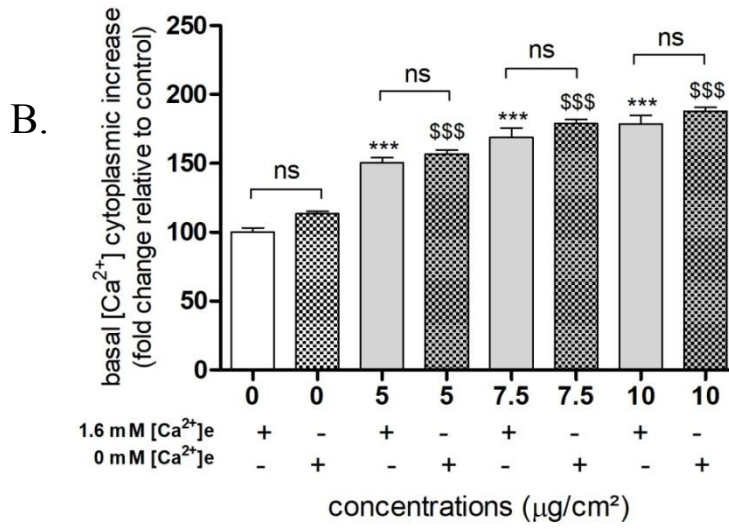
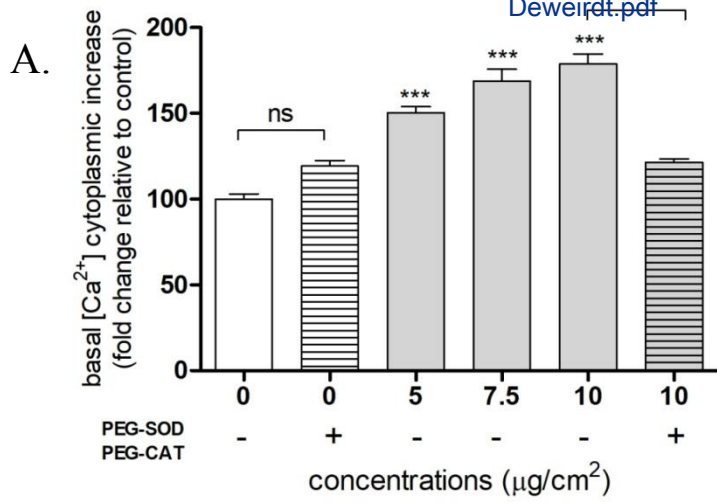
Figure 8 FW2 NPs- induced mitochondrial dynamic alterations. The mitochondrial dynamic was measured with Mitotracker probe (1 μM), by confocal microscopy. A: HPAEC untreated, negative control (X600). B: FW2 NPs (7.5 $\mu\text{g}/\text{cm}$) treated cells for 4 h (X600). C: HPAEC exposed with CCCP (5 μM), positive control (X600). White arrows show typical fiber-like morphology. Red arrows show mitochondria fragmentation.

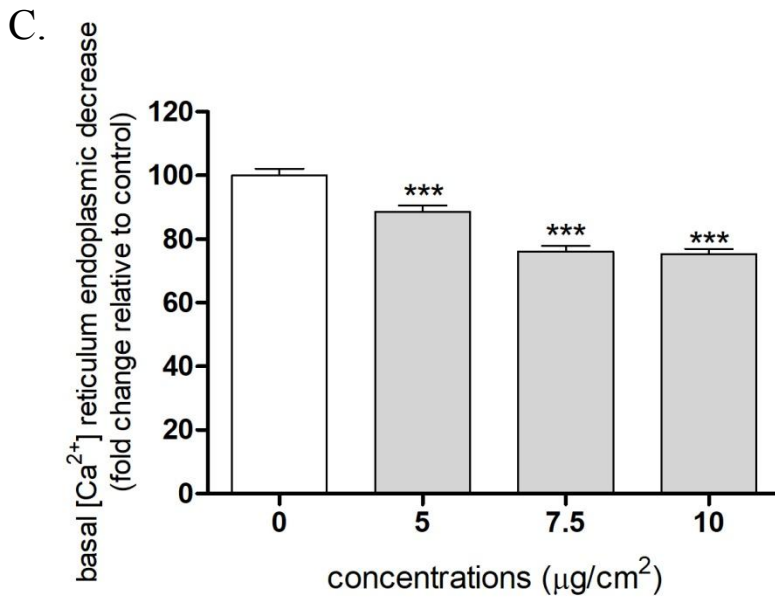
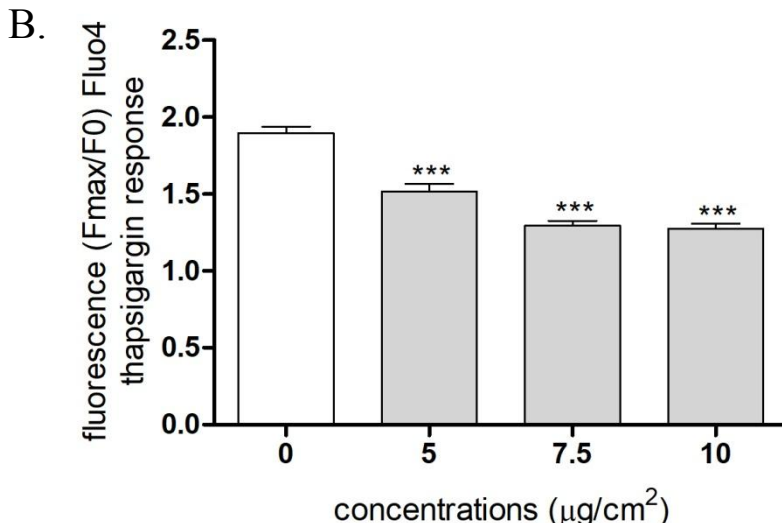
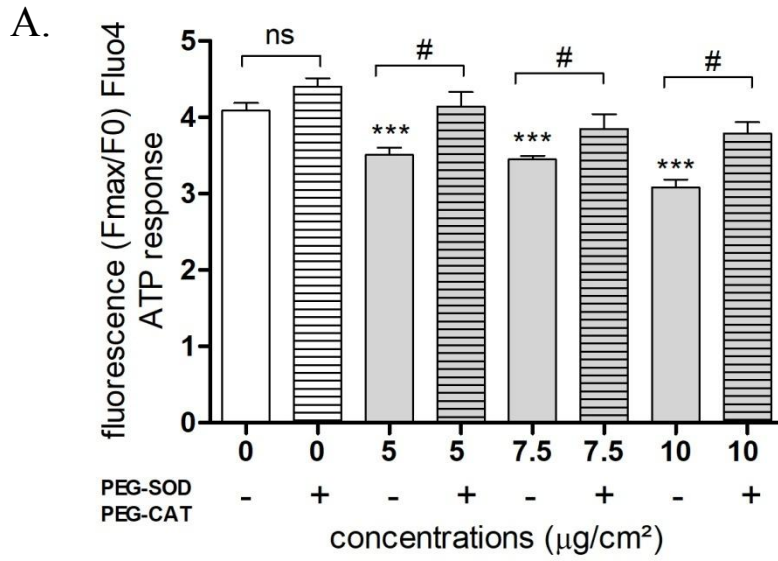
825

Figure 9 Summary of hypothetical FW2-NPs oxidative stress-mediated impairment of calcium homeostasis and mitochondrial dysfunctions. NPs: nanoparticles; ROS: reactive oxygen species; $\text{O}_2^{\cdot-}$: superoxide anion; SOD: superoxyde dismutase; Ca_2^+ : calcium; ER: endoplasmic reticulum; ATP: adenosine triphosphate; IP_3R : Inositol trisphosphate receptor; ΨMP : mitochondrial membrane potential.

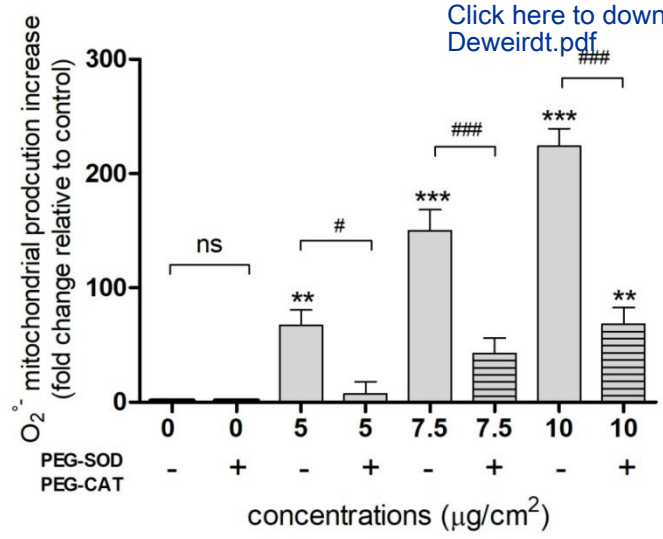
826



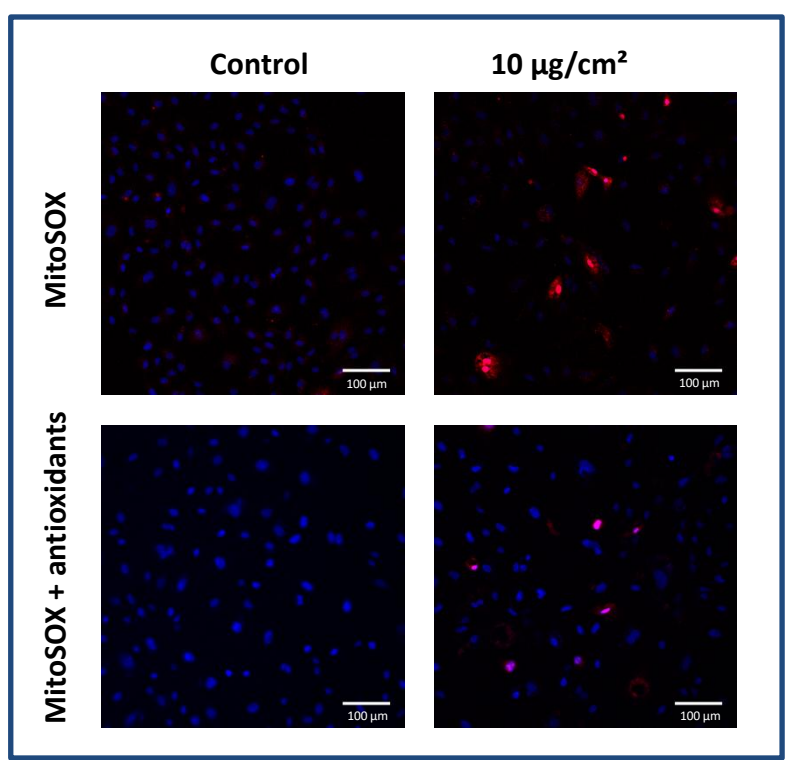




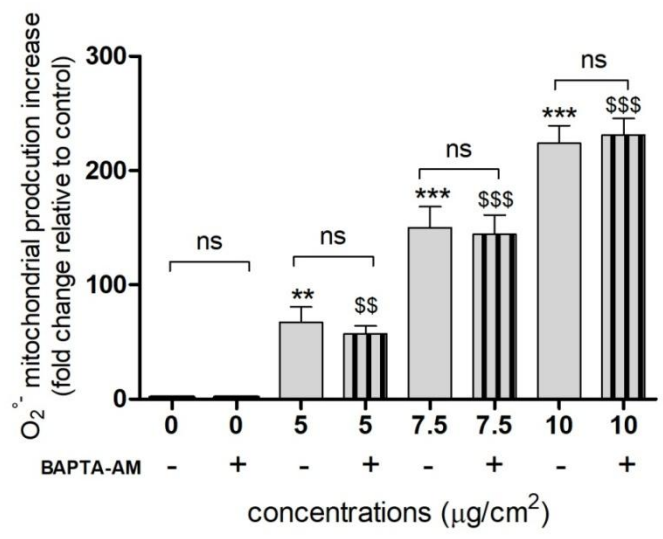
A.



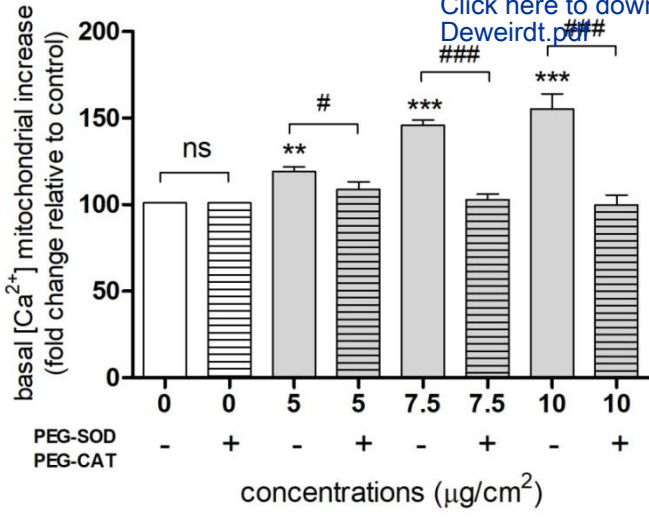
B.



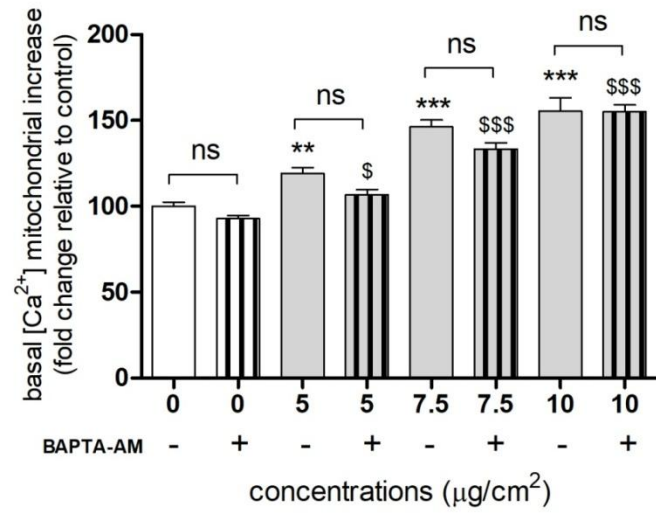
C.



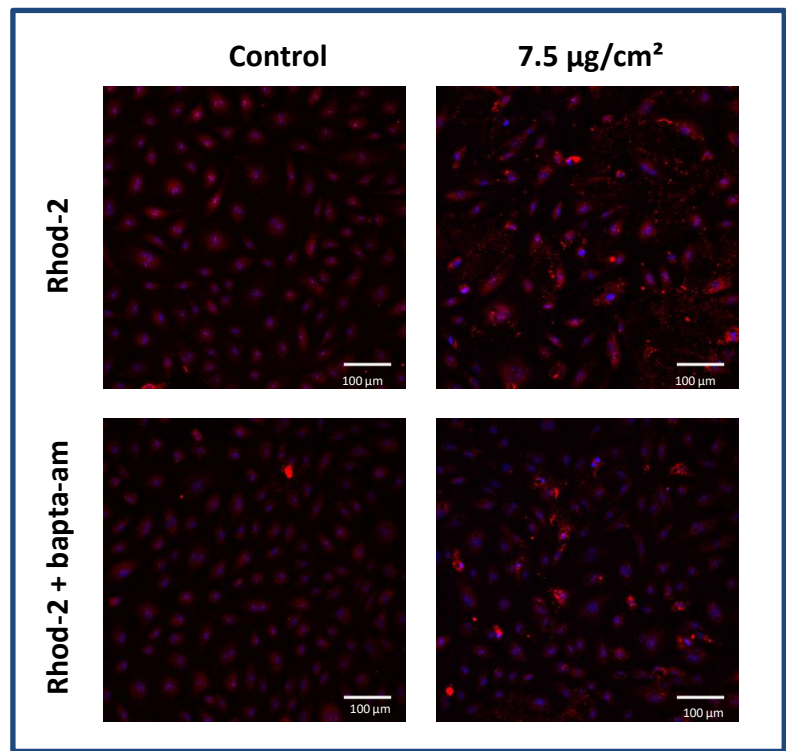
A.



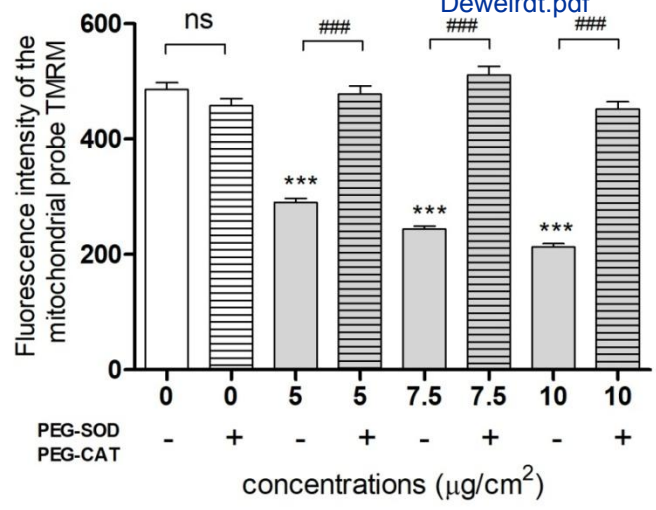
B.



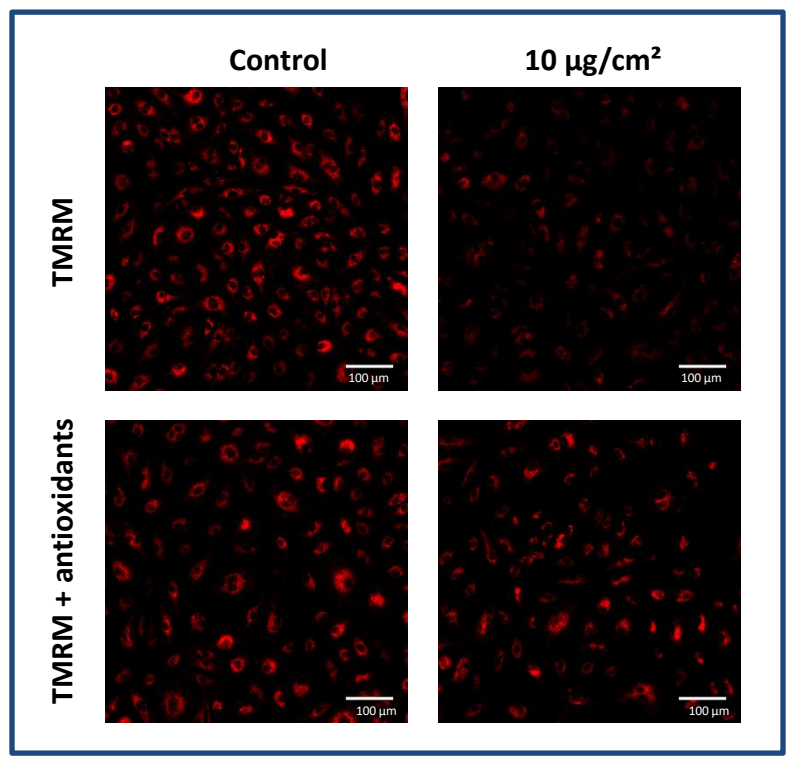
C.



A.



B.



C.

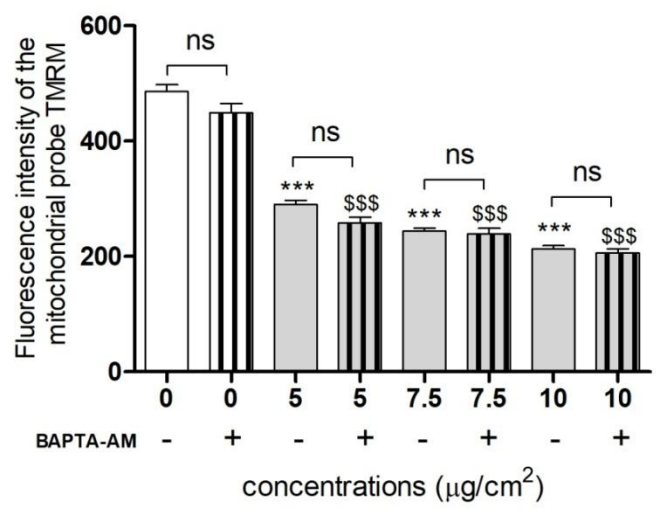
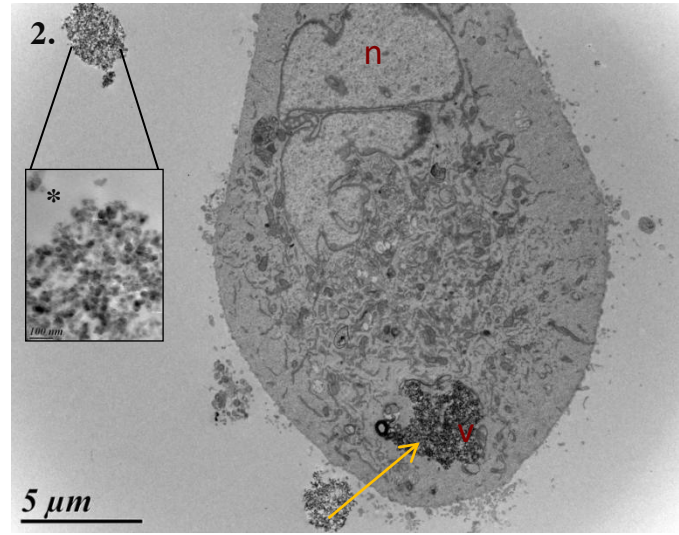


Figure 7

A.



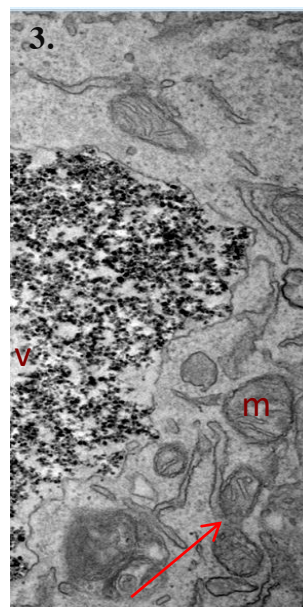
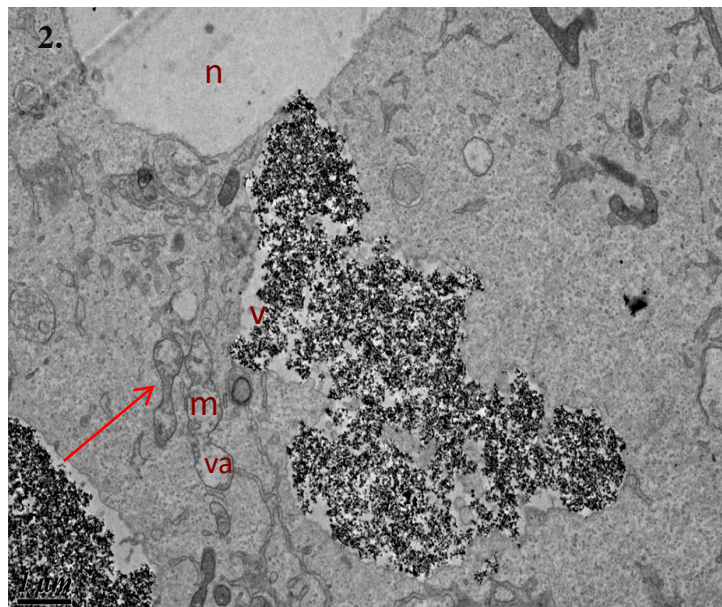
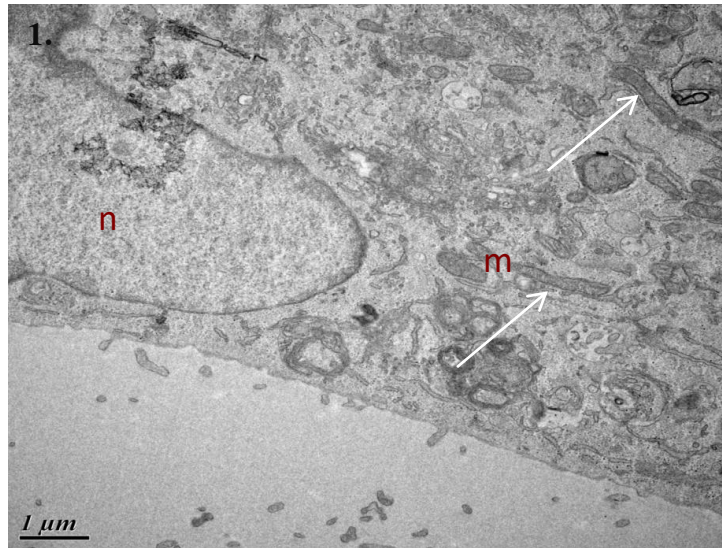
Control (X4000)

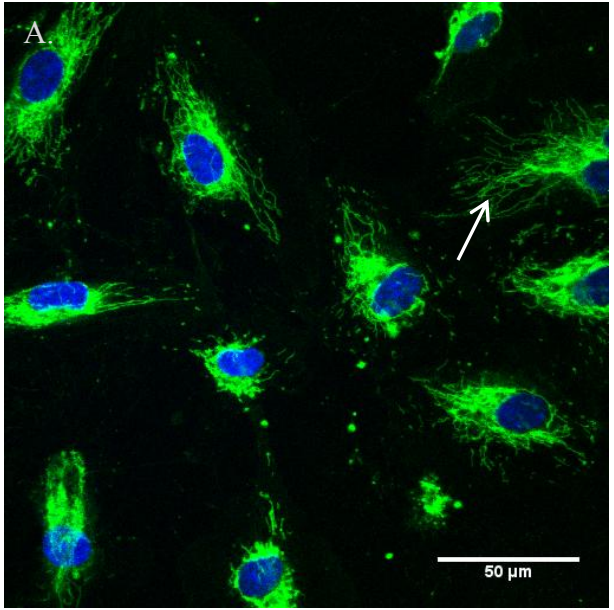


FW2 NPs - 7.5 μ g/cm (x6000)

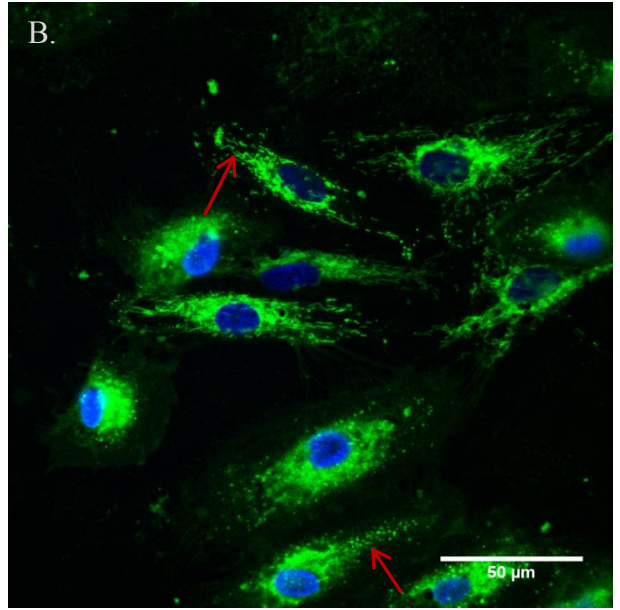
* Representative TEM image of FW2 NPs in ECGM medium (X200000).

B.

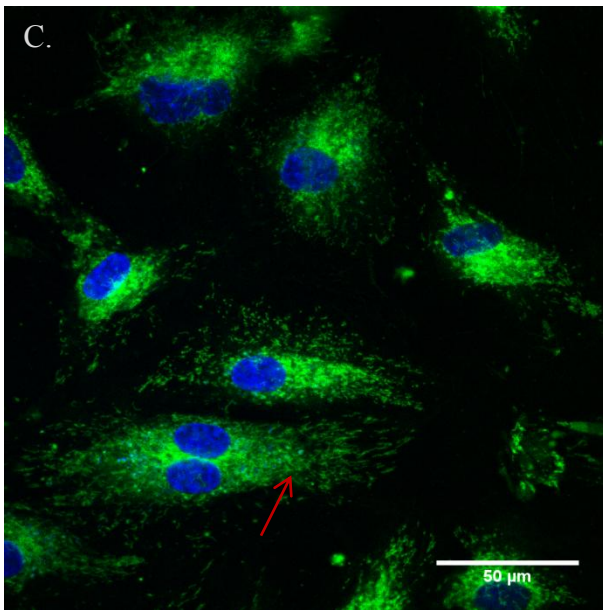




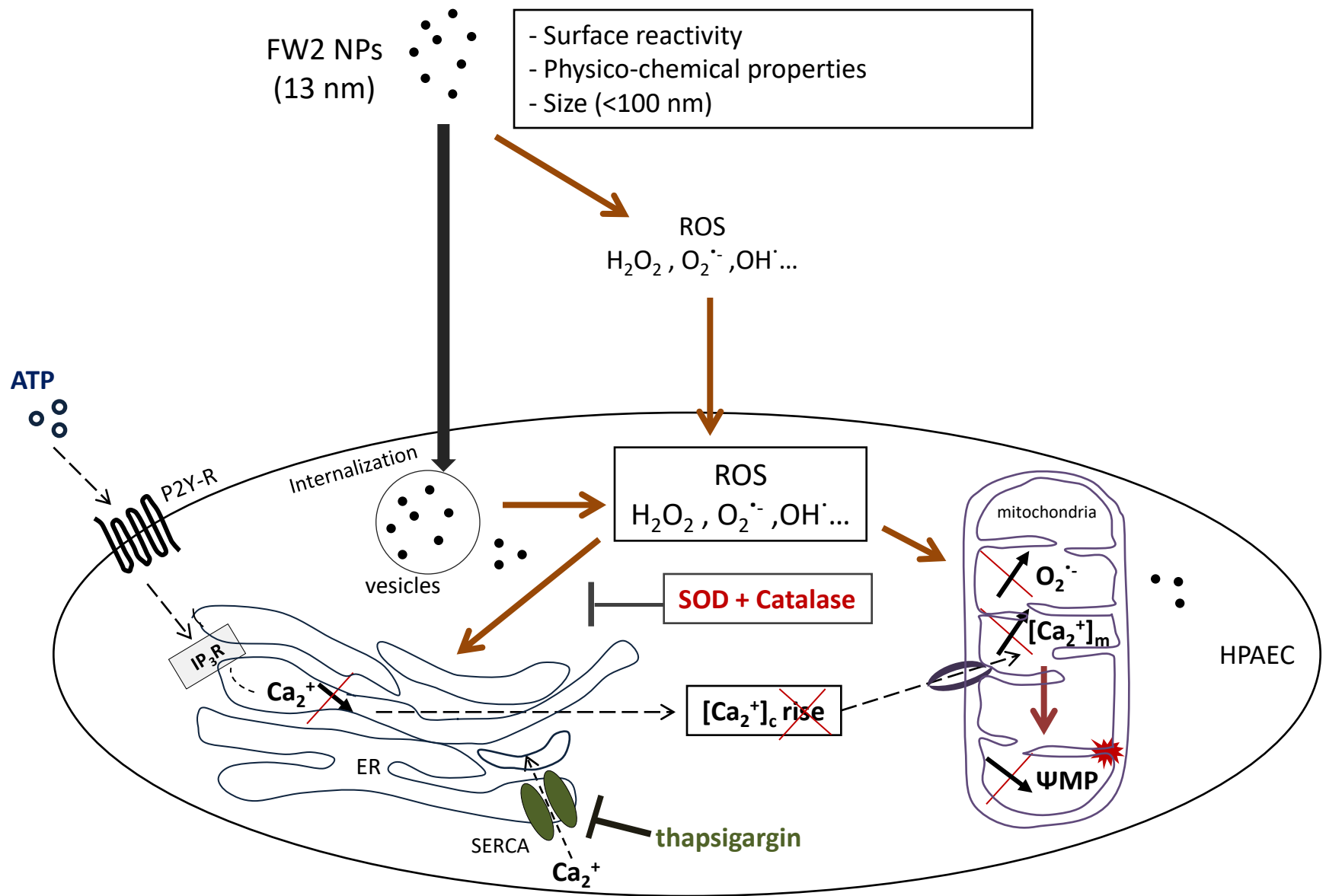
Control



FW2 NPs - 7.5 $\mu\text{g}/\text{cm}$



CCCP (5 μM)



Résumé de l'article :

Nous avons montré qu'une fois internalisées, les NPs FW2 induisent une augmentation dose-dépendante de la production du stress oxydant, caractérisée par la production d'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$). En utilisant les enzymes anti-oxydantes, nous avons montré que le stress oxydant serait impliqué dans la modification de l'homéostasie calcique. Cette dernière est caractérisée par une modification de la teneur en Ca^{2+} des organites intracellulaires, comme le RE et les mitochondries, deux sites tampons du Ca^{2+} qui coopèrent pour réguler l'homéostasie intracellulaire. Nos résultats actuels suggèrent que l'altération de la signalisation calcique ne provient pas de la source de calcium extracellulaire puisque qu'en utilisant l'EGTA il n'y a pas de modification du niveau de $[Ca^{2+}]_i$ induite par les NPs FW2. L'exposition des HPAEC aux NPs FW2 a diminué significativement de manière dose-dépendante (i) la réponse à l'ATP via la voie IP_3 (ii) la réponse à la thapsigargine (iii) le $[Ca^{2+}]$ du RE. Les données montrent une diminution du $[Ca^{2+}]_{RE}$ et une augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ de base après l'exposition aux NPs FW2 ce qui pourrait correspondre à une fuite de calcium du RE vers le cytosol. Enfin, nous avons démontré que l'altération de la réponse calcique induite par l'ATP était fortement réduite par un traitement préalable avec des enzymes anti-oxydantes, ce qui suggère que l'altération de l'homéostasie calcique induite par les FW2 NPs est étroitement corrélée au stress oxydatif. Toutes ces données suggèrent que l'augmentation du $[Ca^{2+}]_i$ induite par les NPs FW2 proviendrait de la libération du calcium intracellulaire et en raison de la perturbation des réserves en calcium du RE.

De plus, nos données ont montré une augmentation de la production d' $O_2^{\cdot-}$ mitochondrial (à partir de $5 \mu g/cm^2$) entraînant une augmentation du $[Ca^{2+}]_m$ et une dépolarisation du PMM. En effet, l'augmentation de $[Ca^{2+}]_m$ a été fortement diminuée par un traitement préalable avec des enzymes anti-oxydantes. Nous avons montré, également, que la dépolarisation de la membrane mitochondriale induite par les NPs FW2 pourrait être expliquée par la surproduction d'ERO mitochondriales. Nous avons montré ici que, après une internalisation rapide (1 h) dans les cellules, les NP de FW2 étaient principalement regroupées dans des vésicules, organisées en agrégats et rarement libres dans le cytoplasme. Cependant, de grands agrégats de NPs sont présents très proches des mitochondries et pourraient interférer de manière critique avec les fonctions mitochondriales. En ce qui concerne la biogenèse et la dynamique des mitochondries, notre étude montre que les NPs FW2 induisent des modifications de la dynamique mitochondriale (perturbation de l'équilibre de fusion / fission) responsables de l'altération de la morphologie mitochondriale dans les HPAEC.

Conclusion: Dans cette étude, nous avons donc démontré que, la production d'ERO induite par les NPs FW2, dans les cellules HPAEC, provoque un déséquilibre rédox qui semble être le principal mécanisme moléculaire conduisant à une altération mitochondriale et à un dysfonctionnement endothélial via une altération de la signalisation calcique et l'homéostasie intracellulaire. La dysfonction endothéliale est un événement critique impliqué dans la physiopathologie des maladies cardiovasculaires.

L'exposition aux NPs FW2 pourrait donc constituer un facteur de risque dans l'exacerbation de maladies cardiovasculaires préexistantes telles que l'hypertension pulmonaire.

3. Effets des nanoparticules noires de carbone sur des cellules endothéliales d'artères pulmonaires humaines en condition physiologique et pathologique mimant l'HTP *in vitro*.

Contexte: De nombreuses études épidémiologiques ont révélé l'impact de la pollution particulaire dans le déclenchement et/ou l'exacerbation de maladies cardiovasculaires. Les cellules endothéliales d'artères pulmonaires constituent une cible privilégiée des particules inhalées et les personnes souffrant d'HTP pourraient constituer une population à risque. Le dysfonctionnement endothélial joue un rôle clé dans le développement de l'HTP. Plusieurs altérations moléculaires sont à l'origine des perturbations fonctionnelles observées dans cette pathologie, notamment une production et une libération anormales des espèces réactives de l'oxygène (ERO), d'interleukines et de médiateurs prolifératifs tels que le facteur de croissance des fibroblastes 2 (FGF-2) (11, 12, 499, 507).

Les objectifs : L'objectif de cette étude a été, dans un premier temps, de développer dans les cellules endothéliales d'artères pulmonaires humaines, un nouveau modèle *in vitro* qui mime l'HTP et, dans un second temps, d'évaluer si l'exposition aux nanoparticules noires de carbone (NPs FW2) pourrait constituer un facteur de risque dans l'aggravation des effets cardiovasculaires observés dans cette pathologie. Pour cela nous avons évalué, dans les deux conditions expérimentales (physiologique et pathologique mimant l'HTP) l'effet de NPs FW2 sur (i) le stress oxydant, (ii) l'inflammation et (iii) la signalisation calcique, paramètres également altérés dans l'HTP.

Résultats et discussion:

1. Validation du modèle *in vitro*

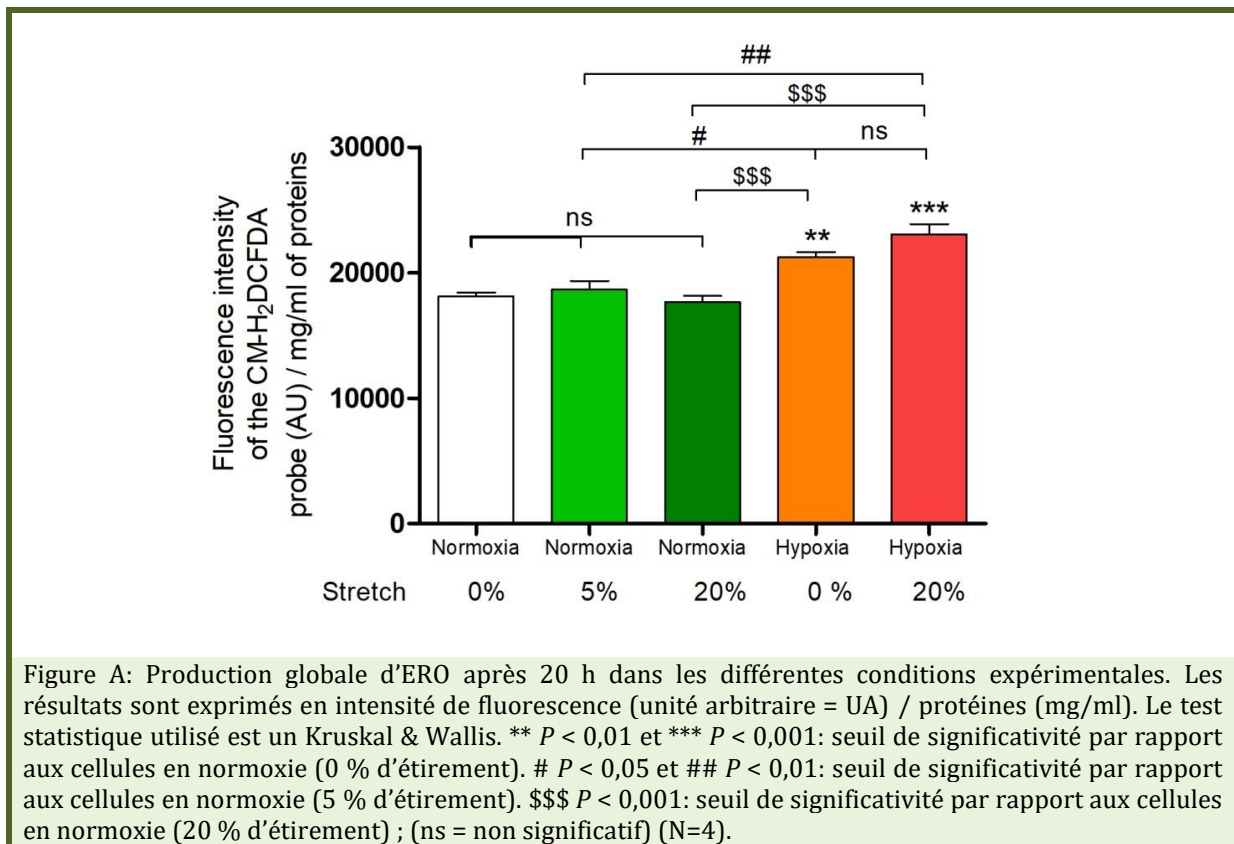
Les cellules endothéliales peuvent subir des mouvements continus exercés par le flux sanguin. Des études ont montré qu'un étirement excessif, qui se produit dans les vaisseaux pulmonaires lors de l'HTP, peut perturber l'homéostasie cellulaire et provoquer des réponses cellulaires inappropriées pouvant entraîner des anomalies cardiovasculaires (508). Par ailleurs, l'hypoxie est un paramètre important dans le microenvironnement cellulaire lors de l'HTP, en effet le remodelage des vaisseaux entraîne une diminution de la disponibilité d'O₂ (509). Des études antérieures ont montré que l'hypoxie est associée à un dysfonctionnement endothélial (510) et à une vasoconstriction accrue (511). Dans un premier temps, nous avons développé un modèle *in vitro* qui mime l'HTP à partir du système stretch (STREX®) qui permet d'appliquer un pourcentage d'étirement (0, 5 ou 20 %). La condition physiologique a été mimée *in vitro* par application ou non d'un étirement de 5 % pendant 20 h (étirement 0 ou 5 %). La condition pathologique a été mimée *in vitro* par l'application d'un étirement de 20 % pendant 20 h. Pour la condition hypoxique, les cellules ont été placées dans un incubateur à hypoxie (1 % d'O₂).

1.1 Effet du stress oxydant

Afin de valider le modèle étudié, il nous a semblé pertinent d'observer tout d'abord, les effets de chaque paramètre, après 20 h, sur la production du stress oxydant dans les HPAEC (fig. A):

- Les effets de l'étirement (0%, 5% et 20 %) en normoxie,
- Les effets de l'hypoxie seule
- Les effets de l'hypoxie avec 20 % de stretch

Les résultats montrent, qu'il n'y a pas de différence significative entre les différents étirements en condition normoxique. L'étirement n'influence donc pas la production d'ERO. En revanche, dans les HPAEC, l'hypoxie semble jouer un rôle dans la production d'ERO. L'hypoxie seule induit une augmentation significative de la production d'ERO (20.41%) par rapport aux cellules en normoxie sans étirement. L'hypoxie et l'étirement à 20 % induit une augmentation significative de la production d'ERO, plus importante (27.45 %), par rapport aux cellules en normoxie sans étirement. De nombreuses études ont montré que l'augmentation de la production d'ERO est observée dans l'HTP humaine (498). Cela nous permet de déterminer les paramètres de culture dans les conditions physiologique et pathologique les plus pertinentes *in vitro* pour évaluer, ensuite, les effets des NPs FW2 dans les deux conditions.



1.2 Effet de l'inflammation

Dans la mesure où l'inflammation est un mécanisme clé dans la physiopathologie de l'HTP, il nous a semblé pertinent d'observer l'effet de chaque paramètre sur la production d'interleukines IL-6 (fig. B):

- Les effets de l'étirement (0%, 5% et 20 %) en normoxie,
- Les effets de l'hypoxie seule
- Les effets de l'hypoxie avec 20 % de stretch

Les résultats montrent, qu'il n'y a pas de différence significative entre les deux conditions d'étirement (0 % et 5 %) en normoxie. En revanche, quand les HPAEC subissent un étirement de 20 %, il est observé, par rapport aux cellules témoins, une augmentation significative de la production d'IL-6 (71.82 %). Il n'y a pas de différence significative dans la production d'IL-6 dans la condition « hypoxie seule » par rapport aux cellules témoins. L'association de l'hypoxie et de l'étirement à 20 % induit une augmentation significative de la production d'IL-6 (92.19 %) par rapport aux cellules témoins. L'augmentation de la sécrétion d'IL-6 est le reflet de la réponse pro-inflammatoire que l'on peut observer dans l'HTP (12).

Au vu de ces résultats, on constate qu'il n'y a pas de différence significative entre les conditions 0 % et 5 % d'étirement en normoxie. Pour mimer la condition physiologique dans les études ultérieures, il ne sera donc pas appliqué d'étirement aux cellules HPAEC. Ces résultats sont en accord avec l'étude de (Freese C et coll., 2014) qui a montré que des HUVECS dans des conditions d'étirement physiologique cyclique (1 Hz, 5 % d'étirement) et dans des conditions statiques standard, ne montraient pas de différence significative dans l'induction du stress oxydant et de l'inflammation (512). Concernant la condition pathologique, il semblerait donc, au vu de ces résultats, que les deux paramètres : hypoxie (1 % d'O₂) et l'étirement à 20 % sont pertinents pour mimer *in vitro* l'HTP.

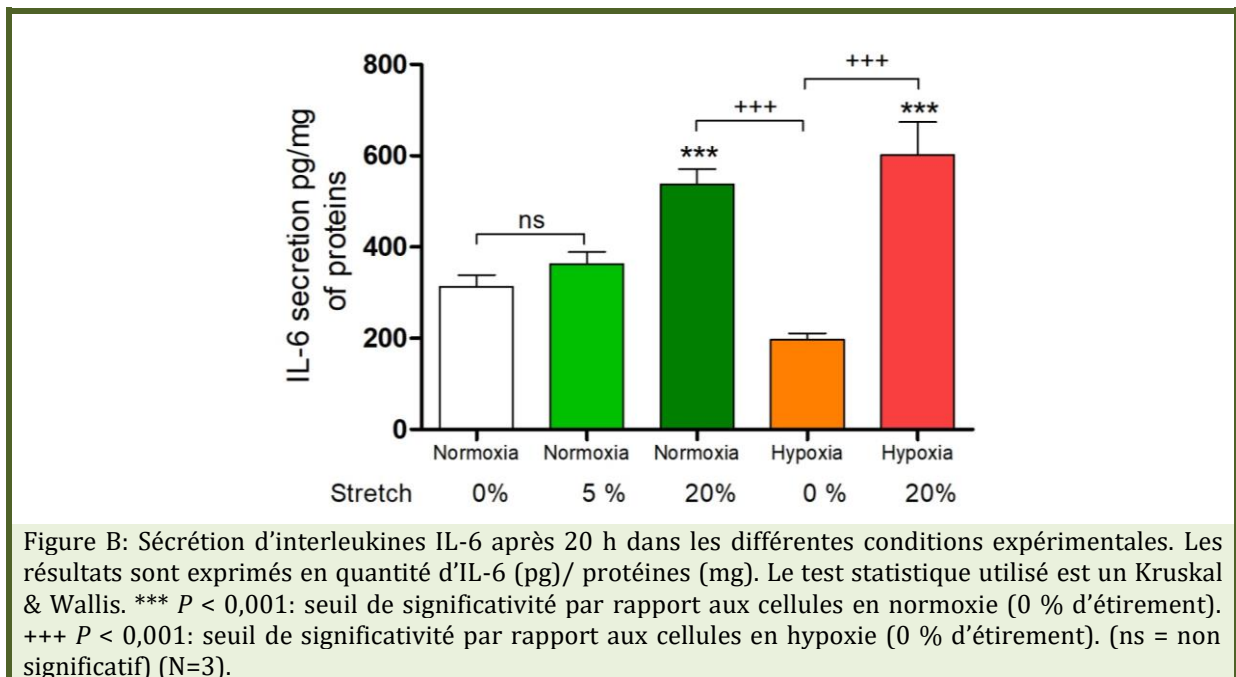
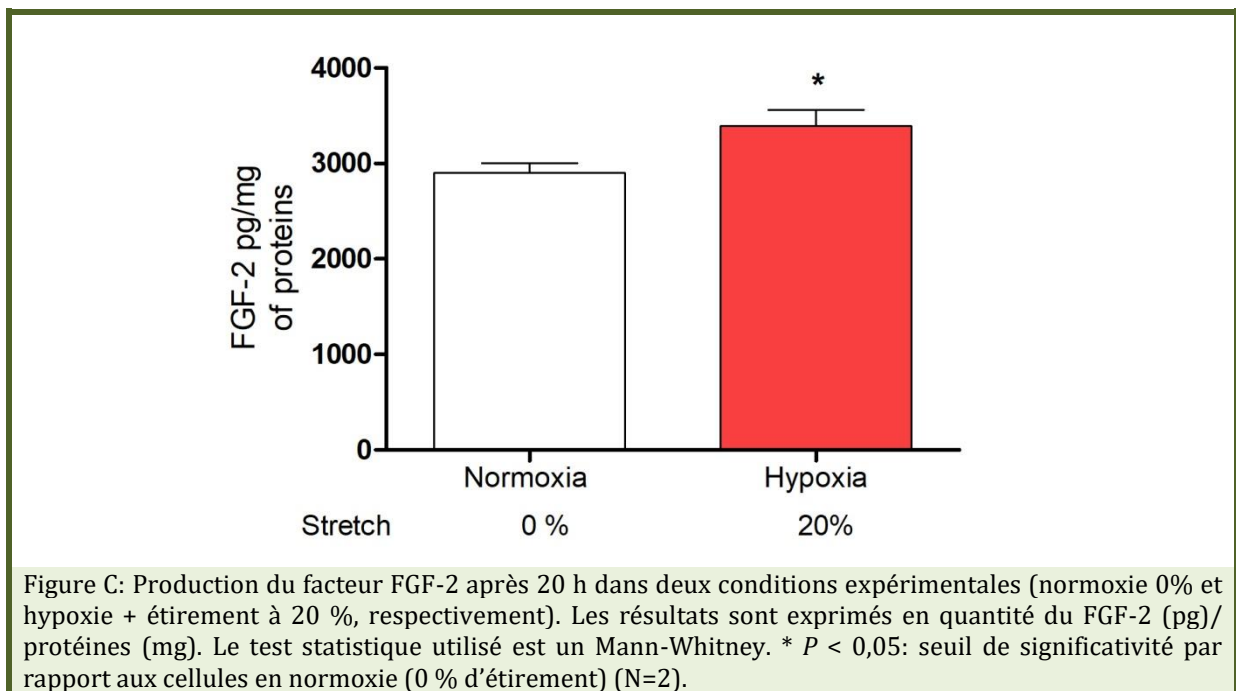


Figure B: Sécrétion d'interleukines IL-6 après 20 h dans les différentes conditions expérimentales. Les résultats sont exprimés en quantité d'IL-6 (pg)/ protéines (mg). Le test statistique utilisé est un Kruskal & Wallis. *** $P < 0,001$: seuil de significativité par rapport aux cellules en normoxie (0 % d'étirement). +++ $P < 0,001$: seuil de significativité par rapport aux cellules en hypoxie (0 % d'étirement). (ns = non significatif) (N=3).

1.3 Effet de FGF-2

Le facteur FGF-2 est considéré comme un biomarqueur du dysfonctionnement vasculaire et du remodelage observé dans l'HTP (507). Afin de valider notre modèle pathologique *in vitro*, nous avons évalué, dans les deux conditions expérimentales (modèle physiologique et modèle pathologique) la production de ce facteur de croissance dans les cellules HPAEC après 20 h (fig. C). Les résultats montrent une augmentation significative de la production de FGF-2 (16.91 %) dans le surnageant de culture des cellules HPAEC dans le modèle pathologique qui mime l'HTP par rapport aux cellules témoins.

Ce modèle *in vitro* semble donc être pertinent pour étudier l'impact des particules atmosphériques sur les HPAEC et devrait nous permettre d'évaluer si l'exposition aux particules atmosphériques pourrait constituer un facteur de risque dans l'exacerbation de pathologies cardiovasculaires telles que l'HTP.



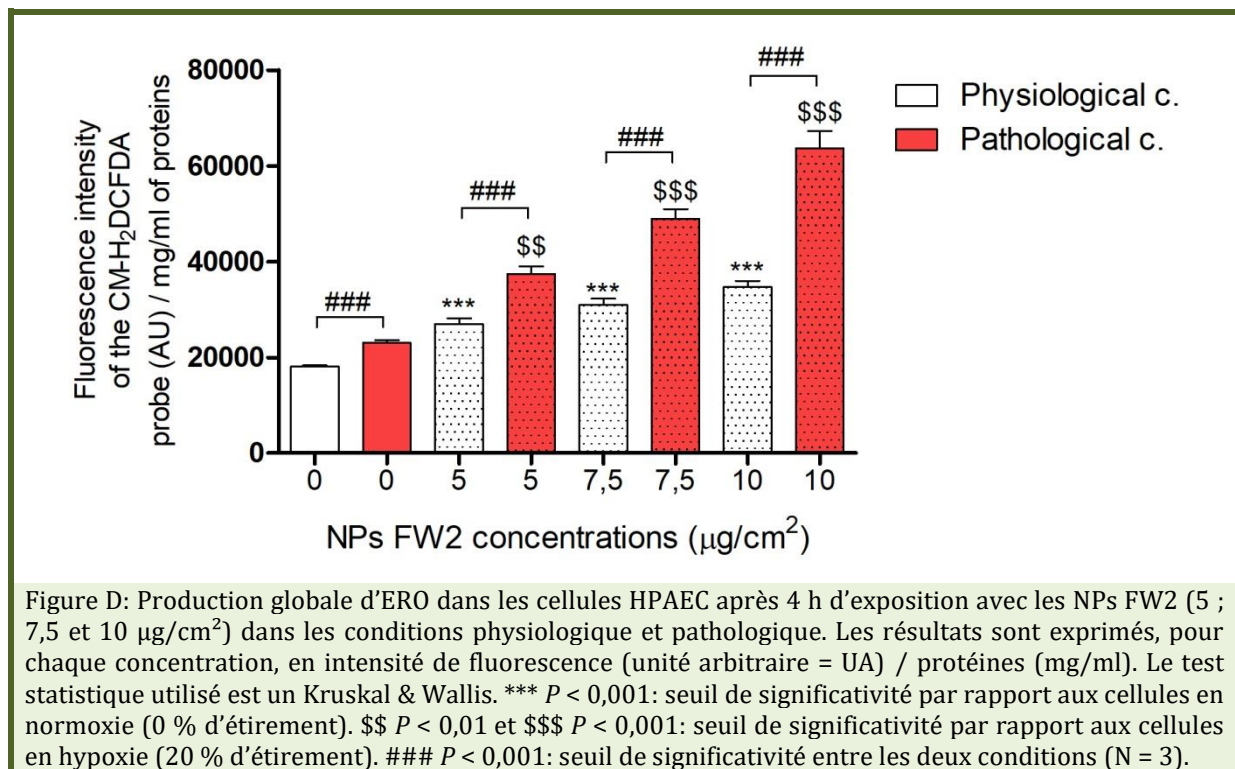
2. Effets des NPs FW2 dans les deux conditions expérimentales

Dans une deuxième étape, nous avons observé l'effet des NPs FW2 sur le stress oxydant, l'inflammation et la signalisation calcique dans les deux conditions expérimentales.

2.1 Evaluation du stress oxydant

Le stress oxydant est un évènement critique impliqué, d'une part, dans la physiopathologie de l'HTP, et, d'autre part, dans les effets cardiovasculaires induits par les NPs (494, 501). Nous avons donc, évalué l'effet des NPs FW2 sur la production d'ERO globale dans les deux conditions expérimentales (fig. D). Les résultats montrent, qu'il y a

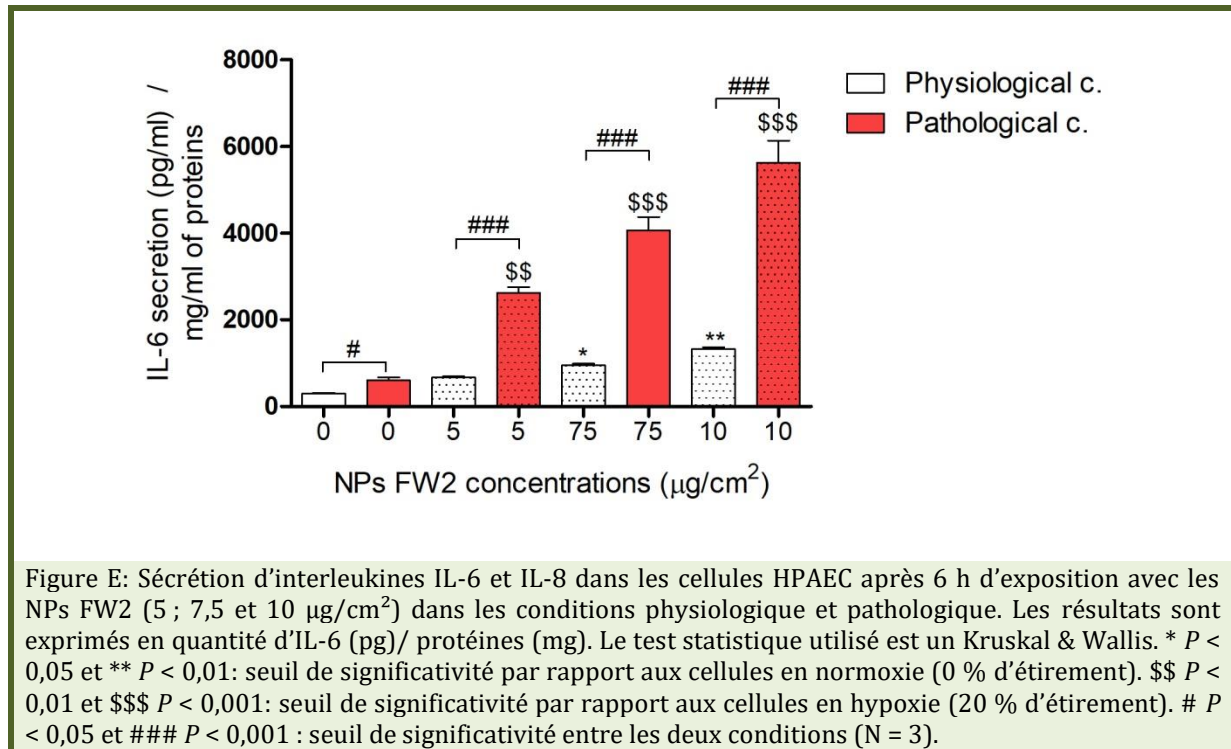
une augmentation significative dose-dépendante de la production d'ERO après 4 h d'exposition avec les NPs FW2 (5, 7.5 et 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) dans les deux conditions expérimentales. Dans les conditions physiologiques, les augmentations d'ERO par rapport aux cellules non exposées sont respectivement de 48.94 % ; 70.92 % et 91.96 % à 5, 7.5 et 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Dans les conditions pathologiques, les augmentations d'ERO par rapport aux cellules non exposées sont respectivement de 62.31 % ; 112.15 % et 176.15 % pour 5, 7.5 et 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Après 4 h d'exposition aux NPs FW2, les pourcentages d'augmentation d'ERO dans les conditions pathologiques sont donc significativement plus importants que dans les conditions physiologiques.



2.2 Evaluation de la réponse pro-inflammatoire

La réponse pro-inflammatoire étant également un évènement critique impliqué dans la physiopathologie de l'HTP, nous avons, évalué, dans les deux conditions expérimentales, l'effet des NPs FW2 sur la sécrétion d'IL-6 dans les cellules HPAEC. Les résultats montrent, qu'il y a une augmentation significative dose-dépendante de la production d'IL-6 après 6 h d'exposition avec les NPs FW2 (5, 7.5 et 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) dans les deux conditions expérimentales (fig. E). Dans les conditions physiologiques, les augmentations d'IL-6 par rapport aux cellules non exposées sont respectivement de 113.40 %, 204.28 % et 324.96 % à 5, 7.5 et 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Dans les conditions pathologiques, les augmentations significatives d'IL-6 par rapport aux cellules non exposées sont respectivement de 190.47 % ; 576.71 % et 835.04 % pour 5, 7.5 et 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Après 6 h d'exposition aux NPs FW2, les pourcentages d'augmentation d'IL-6

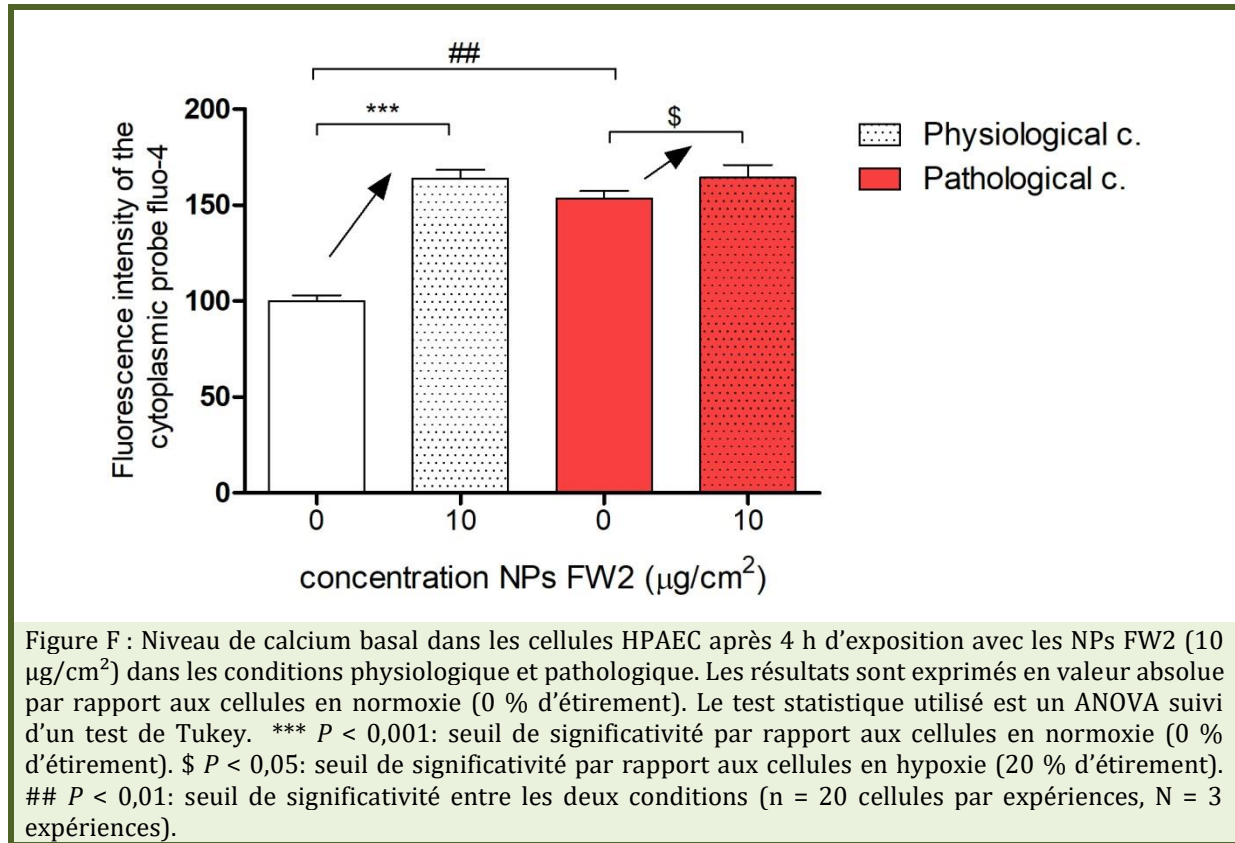
dans les conditions pathologiques sont donc significativement plus importants que dans les conditions physiologiques.



2.3 Evaluation de la signalisation calcique

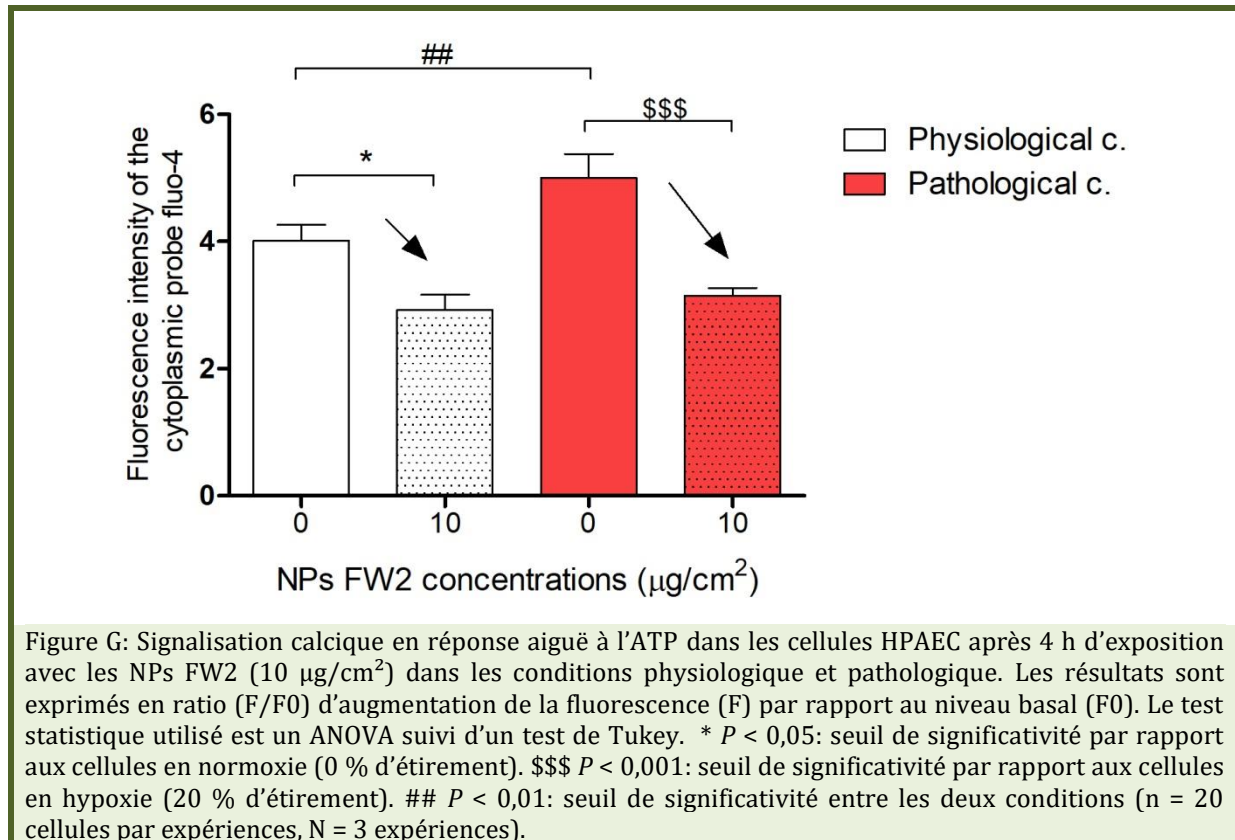
Les cellules endothéliales ont un rôle important dans le contrôle du tonus vasculaire (débit sanguin) par la libération de différents facteurs vasoconstricteurs (endothéline-1 et prostaglandines) et vasodilatateurs (monoxyde d'azote, prostacycline) vers les CML (513). Le calcium (Ca^{2+}) est un second messenger cellulaire important dans le dialogue entre ces deux types de cellules, qui peut provenir du milieu extracellulaire ainsi que des réserves intracellulaires comme le réticulum. Les effets des NPs FW2, dans les HPAEC, ont donc été observés sur la signalisation calcique (fig. F et G). Dans un premier temps, nous avons observé le niveau basal de calcium intracellulaire (fig. F). Dans les cellules HPAEC non exposées aux NPs FW2, les résultats montrent une augmentation significative (53.58 %) du taux basal de calcium intracellulaire dans les cellules en condition pathologique par rapport aux cellules dans les conditions physiologiques. Ces résultats sont cohérents avec ceux observés dans la littérature. En effet, la concentration calcique intracellulaire ($[Ca^{2+}]_i$), joue également un rôle important dans la physiopathologie de l'HTP et des modifications des niveaux de calcium intracellulaire, ainsi que dans les dérégulations de la signalisation calcique sont observées dans cette pathologie (163, 500, 514). Après 4 h d'exposition avec les NPs FW2 (10 µg/cm²), on observe une augmentation significative (63.85 %) du niveau basal de calcium intracellulaire par rapport aux cellules non traitées par les NPs dans les conditions physiologiques. Ces résultats sont en accord avec ceux trouvés précédemment (article 2). Dans les conditions pathologiques, après 4 h d'exposition avec les NPs FW2 (10

$\mu\text{g}/\text{cm}^2$), on observe une augmentation significative (8.09 %) du niveau basal de calcium intracellulaire. En revanche, cette augmentation est moins importante que celle observée dans les conditions physiologiques. Il serait intéressant de regarder les taux de calcium dans le RE et dans les mitochondries dans les deux conditions expérimentales.



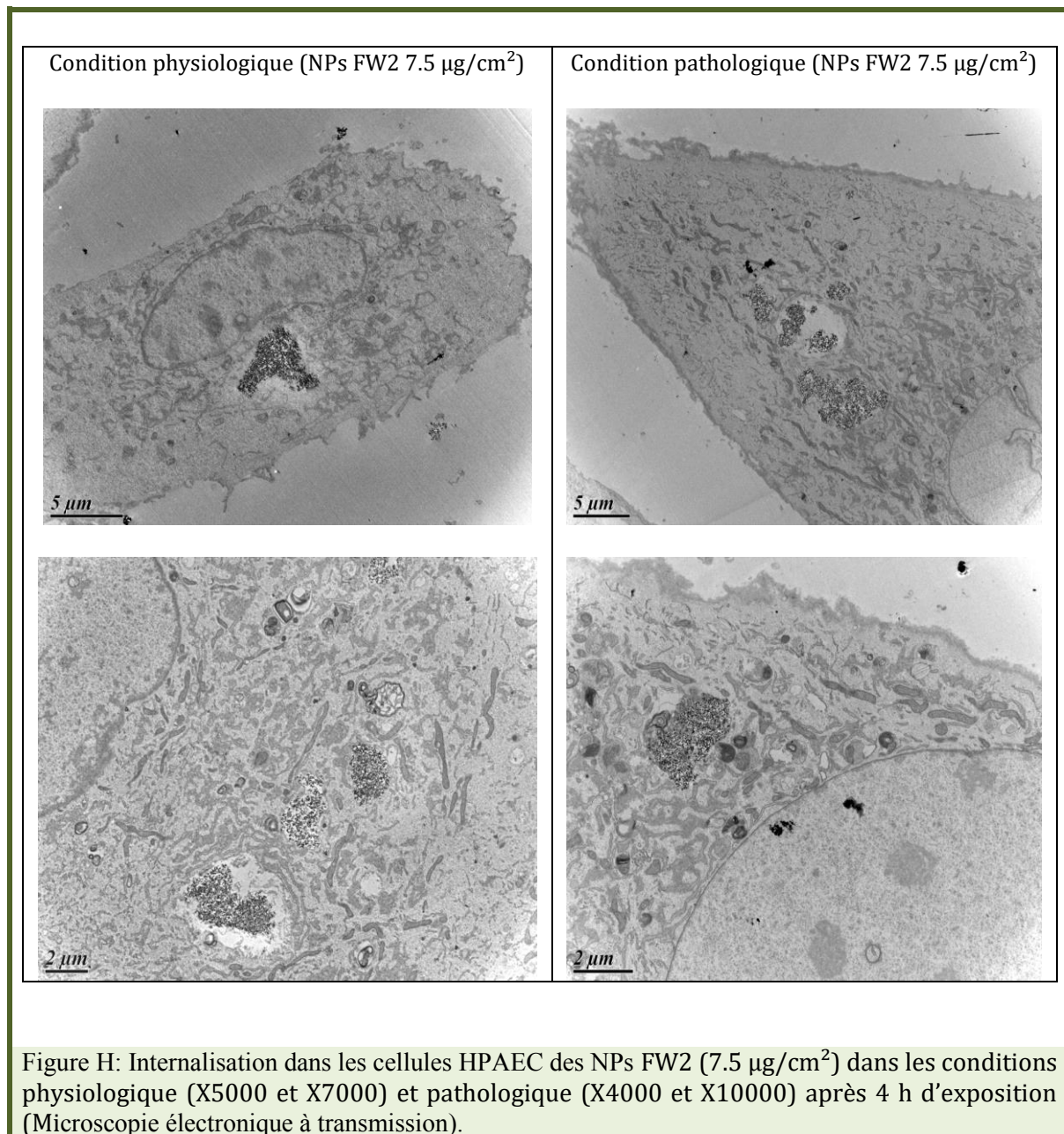
Dans un deuxième temps, nous avons observé, dans les HPAEC, la réponse aiguë à l'ATP (fig.G). En effet, dans l'étude précédente (Deweirdt et al. 2018, Particle Fibre and Toxicology, en soumission), nous avons montré l'importance du RE (stock intracellulaire du calcium) dans la perturbation de l'homéostasie calcique induite par les NPs FW2. L'effet des NPs FW2 ($5 - 10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) sur les réserves de calcium intracellulaire des HPAEC a été évalué en présence d'ATP ($20 \mu\text{M}$) qui est connu pour induire, via le récepteur P2Y, l'activation de la voie de l'inositol 1,4,5 triphosphate (IP_3) conduisant à la libération de calcium (515). Dans les conditions physiologiques, les résultats sont en accord avec ceux observés précédemment. Après exposition des cellules HPAEC avec les NPs FW2, une diminution significative (28.02 %) de la réponse calcique à l'ATP est observée par rapport aux cellules non traitées. Dans la condition pathologique, la réponse calcique à l'ATP dans les HPAEC non exposées avec les NPs FW2 est augmentée significativement par rapport à la condition physiologique. Ces résultats suggèrent que soit le calcium est stocké en grande quantité dans le RE, soit il y a beaucoup plus de récepteurs IP_3 à la membrane du RE en condition pathologique. Nous avons, ensuite, observé dans les conditions pathologiques les effets des NPs FW2 sur la réponse à l'ATP dans les HPAEC. Les résultats montrent que l'exposition des HPAEC aux NPs FW2 (10

$\mu\text{g}/\text{cm}^2$) a significativement diminué (37.20 %) la réponse calcique induite par l'ATP par rapport aux cellules non exposées. De plus, la diminution de la réponse à l'ATP est plus importante dans les conditions pathologiques par rapport à la condition physiologique. Ces résultats montrent donc qu'il y a une modification de la signalisation calcique en présence de NPs FW2 aussi bien dans les conditions physiologiques que dans les conditions pathologiques. Cette altération se traduit par une fuite du calcium du RE vers le cytosol. Des études supplémentaires sont nécessaires afin de comprendre les mécanismes induits par les NPs FW2 dans les conditions pathologiques.



2.4 Internalisation des NPs FW2 dans les deux conditions expérimentales

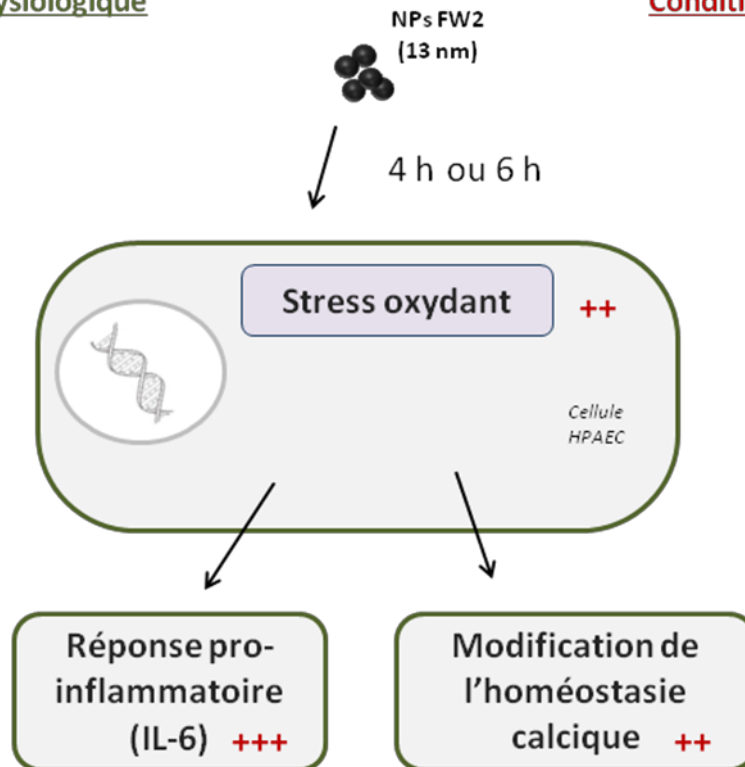
Dans une dernière étape, nous avons étudié l'internalisation des NPs FW2 dans les deux conditions expérimentales. Il est connu qu'une fois dans la circulation sanguine, les NPs peuvent y subir des mouvements continus exercés par le flux sanguin (516). Nous avons donc observé si les HPAEC étirées (20 %) avaient la capacité d'internaliser ou non les NPs FW2 (fig. H). Après 4 h d'exposition, nos résultats montrent que les cellules HPAEC placées en condition pathologique internalisent également les NPs FW2.



Conclusion: L'ensemble de ces résultats montre que ce modèle *in vitro* permet, d'une part, de mimer une partie de la dynamique vasculaire observée *in vivo* dans l'HTP et, d'autre part, d'étudier les mécanismes cellulaires et moléculaires induits par les particules atmosphériques sur les cellules cibles vasculaires pulmonaires. Il semblerait également que dans le modèle pathologique mimant l'HTP, la production d'ERO induite par les NPs FW2 dans les cellules HPAEC, soit plus importante que dans le modèle physiologique ayant pour conséquence une augmentation également plus importante de la réponse pro-inflammatoire, ainsi qu'une diminution accrue de la réponse calcique à l'ATP. Les effets biologiques induits par les NPs FW2 semblent donc être exacerbés dans le modèle pathologique mimant l'HTP. L'exposition aux NPs FW2 chez des personnes sensibles souffrant notamment d'HTP pourrait donc constituer un facteur de risque dans l'aggravation des effets cardio-vasculaires observés dans cette pathologie.

Condition Physiologique

Condition Pathologique



Conclusion générale

Les études épidémiologiques ont permis d'établir une corrélation entre la pollution particulaire et l'augmentation de la morbidité et de la mortalité des pathologies d'origine cardiovasculaire. Peu d'études mécanistiques visent à expliquer les effets des PM_{2.5} et des NPs sur les cellules cibles vasculaires. Dans ce contexte, il nous est apparu nécessaire de mieux caractériser les effets cellulaires et moléculaires induits par les particules atmosphériques sur les cellules endothéliales d'artères pulmonaires humaines (HPAEC). Les différentes études menées au cours de ce travail de thèse a permis d'apporter de nouvelles connaissances mécanistiques sur les impacts des particules PM_{2.5} et NPs FW2 sur les cellules HPAEC. De plus, ce travail a mis en œuvre un protocole innovant, réalisé *in vitro* dans des conditions expérimentales se rapprochant des conditions observées *in vivo*, la culture des HPAEC en hypoxie sur système d'étirement mimant l'hypertension pulmonaire (HTP).

Afin d'évaluer si une exposition aux PM peut-être un facteur de risque dans l'aggravation de l'HTP. Deux axes de recherche ont été envisagés :

- Caractériser, dans les HPAEC, les mécanismes à l'origine des effets induits par les PM_{2.5} et les NPs FW2 au niveau du stress oxydant et de la signalisation calcique.
- Comparer les effets de l'exposition aux particules atmosphériques dans des conditions expérimentales physiologiques et pathologiques mimant l'HTP *in vitro*.

Les travaux réalisés lors de cette thèse ont montré que :

- 1) Les PM_{2.5}, provenant du trafic routier, induisent des altérations cellulaires dans les cellules endothéliales d'artères pulmonaires humaines. Nous avons montré le rôle primordial du stress oxydant dans la toxicité induite par les particules, ainsi que la pertinence d'utiliser plusieurs méthodes pour évaluer la production d'ERO.
- 2) Les NPs noires de carbone (FW2), qui ont un diamètre aérodynamique moyen de 13 nm, entraînent des altérations de l'homéostasie calcique médiées par le stress oxydant.
- 3) L'exposition aux NPs noires de carbone (FW2), pourrait constituer un facteur de risque dans l'exacerbation de pathologies cardiovasculaires telles que l'HTP.

- Nous avons montré, dans la première partie, que le stress oxydant est l'élément déclencheur des perturbations observées dans les HPAEC. En effet, les PM_{2.5}, en raison de leur propriété physico-chimique, produisent de manière intrinsèque des ERO, avant même d'être en contact avec les cellules. Après internalisation dans les cellules HPAEC, observées par MET dès 1 h d'exposition, les PM_{2.5} entraînent également la production des ERO intracellulaires au niveau du cytoplasme et des mitochondries, de façon concentration-dépendante. Nos résultats montrent également après 4 h d'exposition, une augmentation du niveau de base de calcium dans le cytoplasme. Cette augmentation n'est pas observée présence d'enzymes anti-oxydantes (SOD/CAT).

Il existe différentes méthodes pour évaluer le stress oxydant, les méthodes directes (mesure des ERO par des sondes fluorescentes, par RPE...) et des méthodes indirectes (mesure des antioxydants, des molécules oxydées, etc.). Parmi les méthodes directes,

toutes n'ont pas la même sensibilité et spécificité. Nous avons démontré avec 3 méthodes différentes, la spectrofluorimétrie (sonde CM-H₂DCFDA), la RPE (sonde CMH) et la microscopie confocale (sonde MitoSOX) que les PM_{2.5} induisent des ERO cytosoliques et mitochondriales. La sonde CM-H₂DCFDA mesure les ERO globales cytosoliques alors que la sonde CMH mesure spécifiquement l'anion superoxyde (O₂⁻) cytosolique. La sonde MitoSOX mesure l'O₂⁻ mitochondrial. Nous avons montré que les PM_{2.5} induisent une augmentation significative d'ERO et notamment d'O₂⁻ cytoplasmique à 7.5 µg/cm². En revanche, les PM_{2.5} induisent une augmentation significative d'O₂⁻ mitochondrial dès 5 µg/cm². Ces résultats suggèrent que la méthode au microscope confocal, utilisant la sonde MitoSOX, semble plus sensible pour évaluer le stress oxydatif, que les autres méthodes. Nous avons également montré que le stress oxydant est l'élément déclencheur, impliqué dans l'altération de la [Ca²⁺]_c, ainsi que la diminution de la biodisponibilité du NO et la formation de peroxy-nitrites. Ces observations montrent que les PM_{2.5} induisent une altération de l'homéostasie cellulaire dans les HPAEC, ce qui pourrait être à l'origine de la dysfonction endothéliale, retrouvée dans les pathologies cardiovasculaires.

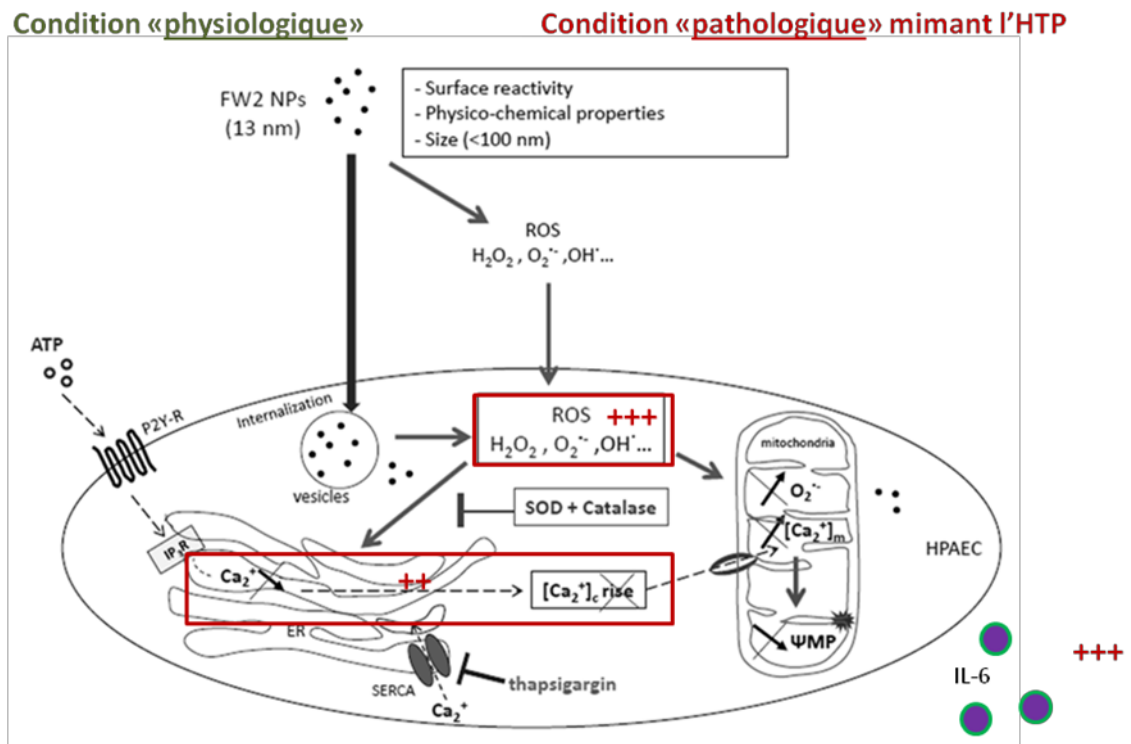
- La deuxième partie a consisté à étudier les effets des NPs FW2 (13 nm), sur les HPAEC, ainsi que le rôle du stress oxydant dans les altérations cellulaires observées. Nous avons montré, via un test d'évaluation de la cytotoxicité, que les NPs FW2 sont plus toxiques aux mêmes concentrations que les PM_{2.5}. Cela s'explique, en partie, par la différence de taille et la plus grande réactivité de surface des NPs. Comme pour les PM_{2.5}, nous avons montré que les NPs FW2 altèrent l'homéostasie calcique en augmentant les [Ca²⁺]_c. Un des objectifs de notre travail a alors été d'évaluer par quels mécanismes les NPs modifiaient les variations de [Ca²⁺]_i. Une des hypothèses de départ était que l'altération de l'homéostasie calcique était due aux canaux à la membrane (SAC) comme les canaux TRP. Nous avons observé d'où venait l'augmentation de calcium cytoplasmique. La source principale de l'augmentation du [Ca²⁺]_c proviendrait des stocks intracellulaires et non de la source extracellulaire. Nous avons donc étudié les effets des NPs sur les organites intracellulaires qui régulent l'homéostasie calcique comme le réticulum endoplasmique (RE) et les mitochondries. Nos résultats ont montré que le stress oxydant serait à l'origine d'une perturbation du RE entraînant une fuite du Ca²⁺ du RE vers le cytoplasme. Nous avons ensuite axé le projet sur les perturbations que cela pouvait conduire sur les mitochondries. Le stress oxydant étant l'élément clé de la toxicité des NPS FW2, nous avons regardé les effets sur la production de l'anion superoxyde dans les mitochondries, ainsi que ses effets sur le calcium mitochondrial, et sur le potentiel de membrane mitochondrial (PMM). Nos résultats montrent que le stress oxydant est à l'origine, d'une part, de l'augmentation du [Ca²⁺]_m et d'autre part, de la diminution du PMM, phénomènes conduisant à l'apoptose cellulaire. Enfin, nous avons montré que la dynamique mitochondriale est perturbée après exposition avec des NPS FW2. Les modifications de l'homéostasie calcique et les altérations mitochondriales, induites par le stress oxydant, pourraient donc jouer un rôle clé dans l'aggravation de pathologies cardiovasculaires

induites par les NPs. Ces résultats laissent suggérer que l'exposition aux NPs FW2 pourrait être un facteur de risque dans l'aggravation de l'HTP.

Par ailleurs, ce premier objectif a montré que la taille des particules jouait sur la toxicité des particules dans les HPAEC. En effet, les NPs FW2 (diamètre 13 nm) semble avoir une plus grande toxicité à la même concentration que les PM_{2.5} (diamètre < 2.5 µm) (tableau ci-dessous).

	PM _{2.5}	NPs FW2
Cellulaire		
ERO globales	10 µg/cm ² (**)	5 µg/cm ² (**)
O ₂ ⁻ cytoplasmique	7.5 µg/cm ² (**)	5 µg/cm ² (*)
O ₂ ⁻ mitochondrial	5 µg/cm ² (*)	5 µg/cm ² (**)
Calcium cytoplasmique	5 µg/cm ² (*)	5 µg/cm ² (***)

- L'objectif de notre dernier axe de recherche, a donc été de comparer *in vitro* les effets des particules atmosphériques dans des conditions physiologique et pathologique mimant l'HTP. Nous avons donc mis au point une technique innovante afin de mimer *in vitro* la dysfonction endothéliale observée dans l'HTP. Tout d'abord, nous avons développé le modèle *in vitro*, qui mime la dynamique vasculaire observée dans l'HTP, et ensuite, nous avons observé les effets des NPs FW2 dans les deux conditions expérimentales, afin d'observer si l'exposition aux NPs FW2 pourrait être un facteur de risque dans l'exacerbation de l'HTP. Pour la condition physiologique, nous avons appliqué soit 5 % d'étirement ou aucun étirement aux cellules dans un environnement normoxique. En raison, de l'absence de différence significative entre 0 et 5 % d'étirement, nous avons choisi la condition statique. Pour la condition pathologique, nous avons appliqué 20 % d'étirement aux cellules (reflet de l'augmentation de la tension du vaisseau lors de l'HTP), que nous avons placé en hypoxie (1 % O₂) pour mimer l'environnement hypoxique dans cette pathologie. Nos résultats ont montré que dans la condition pathologique, il y a une augmentation significative plus importante du stress oxydant, et de l'inflammation, ainsi qu'une perturbation de l'homéostasie calcique par rapport à la condition physiologique. Nos résultats semblent donc montrer que l'exposition aux NPs FW2 serait un facteur de risque dans l'aggravation de pathologies vasculaires telles que l'HTP.



Perspectives

Dans la mesure où les PM_{2.5} et les NPs déclenchent *in situ* une réaction inflammatoire locale, avec un relargage des médiateurs de l'inflammation dans la circulation générale, qui pourrait expliquer l'aggravation des pathologies cardiovasculaires observée, il serait intéressant d'étudier, sur les HPAEC, les effets indirects des sécrétions épithéliales, produites au niveau respiratoire, par les PM. En utilisant l'approche des milieux conditionnés dans les conditions expérimentales physiologique et pathologique.

Par ailleurs, il serait pertinent de mettre en place des modèles de co-culture (CML et CE humaines) afin d'évaluer les effets de l'altération de l'homéostasie induite dans les HPAEC par les particules sur les CML, en particulier au niveau de l'hyperréactivité (sécrétion facteurs vasoactifs), du remodelage (prolifération/ apoptose) et de l'inflammation.

Enfin, il serait intéressant à la faveur des travaux ultérieurs de regarder les effets induits par les PM_{2.5} et les NPs FW2 *in vivo*, sur des modèles animaux sains et pathologiques (modèle animaux expérimentaux: hypoxie chronique ou monocrotaline).

Références

1. Newby DE, Mannucci PM, Tell GS, Baccarelli AA, Brook RD, Donaldson K, et al. Expert position paper on air pollution and cardiovascular disease. *European heart journal*. 2015;36(2):83-93b.
2. WHO. Household air pollution and health 2018. Available from: <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/household-air-pollution-and-health>.
3. Miller MR, Raftis JB, Langrish JP, McLean SG, Samutrtai P, Connell SP, et al. Inhaled Nanoparticles Accumulate at Sites of Vascular Disease. *ACS nano*. 2017;11(5):4542-52.
4. Courtois A, Andujar P, Ladeiro Y, Baudrimont I, Delannoy E, Leblais V, et al. Impairment of NO-dependent relaxation in intralobar pulmonary arteries: comparison of urban particulate matter and manufactured nanoparticles. *Environmental health perspectives*. 2008;116(10):1294-9.
5. Courtois A, Andujar P, Ladeiro Y, Ducret T, Rogerieux F, Lacroix G, et al. Effect of engineered nanoparticles on vasomotor responses in rat intrapulmonary artery. *Toxicology and applied pharmacology*. 2010;245(2):203-10.
6. Courtois A, Prouillac C, Baudrimont I, Ohayon-Courtes C, Freund-Michel V, Dubois M, et al. Characterization of the components of urban particulate matter mediating impairment of nitric oxide-dependent relaxation in intrapulmonary arteries. *Journal of applied toxicology : JAT*. 2014;34(6):667-74.
7. Barrier M, Begorre MA, Baudrimont I, Dubois M, Freund-Michel V, Marthan R, et al. Involvement of Heme Oxygenase-1 in particulate matter-induced impairment of NO-dependent relaxation in rat intralobar pulmonary arteries. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*. 2016;32:205-11.
8. Knuckles TL, Yi J, Frazer DG, Leonard HD, Chen BT, Castranova V, et al. Nanoparticle inhalation alters systemic arteriolar vasoreactivity through sympathetic and cyclooxygenase-mediated pathways. *Nanotoxicology*. 2012;6(7):724-35.
9. Calderon-Garciduenas L, Vincent R, Mora-Tiscareno A, Franco-Lira M, Henriquez-Roldan C, Barragan-Mejia G, et al. Elevated plasma endothelin-1 and pulmonary arterial pressure in children exposed to air pollution. *Environmental health perspectives*. 2007;115(8):1248-53.
10. Simonneau G, Gatzoulis MA, Adatia I, Celermajer D, Denton C, Ghofrani A, et al. Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *Journal of the American College of Cardiology*. 2013;62(25 Suppl):D34-41.
11. Ducret T, El Arrouchi J, Courtois A, Quignard JF, Marthan R, Savineau JP. Stretch-activated channels in pulmonary arterial smooth muscle cells from normoxic and chronically hypoxic rats. *Cell calcium*. 2010;48(5):251-9.
12. Freund-Michel V, Guibert C, Dubois M, Courtois A, Marthan R, Savineau JP, et al. Reactive oxygen species as therapeutic targets in pulmonary hypertension. *Therapeutic advances in respiratory disease*. 2013;7(3):175-200.
13. WHO. Ambient (outdoor) air quality and health 2018. Available from: [http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/ambient-\(outdoor\)-air-quality-and-health](http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/ambient-(outdoor)-air-quality-and-health).
14. Pope CA, 3rd, Burnett RT, Thun MJ, Calle EE, Krewski D, Ito K, et al. Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long-term exposure to fine particulate air pollution. *Jama*. 2002;287(9):1132-41.
15. Donaldson K, Stone V, Clouter A, Renwick L, MacNee W. Ultrafine particles. *Occupational and environmental medicine*. 2001;58(3):211-6, 199.
16. AIRPARIF. Les différents polluants et leur évolution. . 2010.
17. ANSES. Polluants « émergents » dans l'air ambiant. Identification, catégorisation et hiérarchisation de polluants actuellement non réglementés pour la surveillance de la qualité de l'air. . 2018.

18. Wilson SJ, Miller MR, Newby DE. Effects of Diesel Exhaust on Cardiovascular Function and Oxidative Stress. *Antioxidants & redox signaling*. 2018;28(9):819-36.
19. Holmes NS. A review of particle formation events and growth in the atmosphere in the various environments and discussion of mechanistic implications. *Atmospheric Environment*. 2007;41(10):2183-201.
20. Robert Delmas GM, Vincent-henri Peuch *Physique et chimie de l'atmosphère*2005.
21. John H. Seinfeld SNP. *Atmospheric Chemistry and Physics: From Air Pollution to Climate Change*2012.
22. Bukowiecki N, Dommen J, Prévôt ASH, Weingartner E, Baltensperger U. Fine and ultrafine particles in the Zürich (Switzerland) area measured with a mobile laboratory: an assessment of the seasonal and regional variation throughout a year. *Atmos Chem Phys*. 2003;3(5):1477-94.
23. CITEPA. *Inventaire des émissions de polluants atmosphériques et de gaz à effet de serre en France – Séries sectorielles et analyses étendues*. 2015.
24. Report E. *European Union emission inventory report 1990-2016* 2018.
25. Pierce JR, Riipinen I, Kulmala M, Ehn M, Petäjä T, Junninen H, et al. Quantification of the volatility of secondary organic compounds in ultrafine particles during nucleation events. *Atmos Chem Phys*. 2011;11(17):9019-36.
26. Kumar P, Morawska L, Birmili W, Paasonen P, Hu M, Kulmala M, et al. Ultrafine particles in cities. *Environment international*. 2014;66:1-10.
27. Kibble A, Harrison R. Point sources of air pollution. *Occupational medicine (Oxford, England)*. 2005;55(6):425-31.
28. Falcon-Rodriguez CI, Osornio-Vargas AR, Sada-Ovalle I, Segura-Medina P. *Aeroparticles, Composition, and Lung Diseases*. *Frontiers in immunology*. 2016;7:3.
29. polytechnique. – Chapitre 5 – Introduction aux aérosols atmosphériques Available from: http://www.lmd.polytechnique.fr/~sturquet/teaching_data/Seance2_Aerosols.pdf.
30. Juguet B CF, Le Moullec Y, Festy B. Etude de la fraction minérale de l'aérosol urbain à Paris, bilan d'une surveillance prolongée. . *Poll Atmosph*. 1983;101:3-12.
31. Thomson EM, Breznan D, Karthikeyan S, MacKinnon-Roy C, Vuong NQ, Dabek-Zlotorzynska E, et al. Contrasting biological potency of particulate matter collected at sites impacted by distinct industrial sources. *Particle and fibre toxicology*. 2016;13(1):65.
32. D RAeB. *Les Aérosols*. Lavoisier Tec & Doc, Paris ed2005.
33. Morawska L, Jamriska M, Thomas S, Ferreira L, Mengersen K, Wraith D, et al. Quantification of Particle Number Emission Factors for Motor Vehicles from On-Road Measurements. *Environmental science & technology*. 2005;39(23):9130-9.
34. Oberdorster G, Oberdorster E, Oberdorster J. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environmental health perspectives*. 2005;113(7):823-39.
35. RESPIRE. *Association Nationale pour la prévention et l'amélioration de la qualité de l'air : La législation sur l'air*. 2016. Available from: <http://www.respire-asso.org/la-legislation-sur-lair/>.
36. WHO. *Review of evidence on health aspects of air pollution-*.
37. EEA. *EEA : European Environment Agency. Air quality in Europe*. . 2017.
38. solidaire Mdltee. *Pollution de l'air : origines, situation et impacts*. 2017. Available from: <https://www.ecologique-solidaire.gouv.fr/pollution-lair-origines-situation-et-impacts>. .
39. M. Bentayeb VG, C. Monteil, E. Riviere. ANSES. *Normes de qualité de l'air ambiant*. 2017.
40. *Géod'Air*. Ministère de la transition écologique et solidaire. 2017.
41. AIRPARIF. *Synthèse des connaissances sur les particules en suspension dans l'air et des travaux d'AIRPARIF sur ces polluants*. . Mis à jour régulièrement.

42. Bertalanffy FD. Respiratory tissue: structure, histophysiology, cytodynamics. I. Review and basic cytomorphology. *International review of cytology*. 1964;16:233-328.
43. Pedersen M. Ciliary activity and pollution. *Lung*. 1990;168 Suppl:368-76.
44. Bayram H, Devalia JL, Sapsford RJ, Ohtoshi T, Miyabara Y, Sagai M, et al. The effect of diesel exhaust particles on cell function and release of inflammatory mediators from human bronchial epithelial cells in vitro. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 1998;18(3):441-8.
45. Brown JS, Zeman KL, Bennett WD. Ultrafine particle deposition and clearance in the healthy and obstructed lung. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2002;166(9):1240-7.
46. Chalupa DC, Morrow PE, Oberdorster G, Utell MJ, Frampton MW. Ultrafine particle deposition in subjects with asthma. *Environmental health perspectives*. 2004;112(8):879-82.
47. Blondonnet R, Jabaudon M, Clairefond G, Audard J, Sapin V, Constantin JM. Corrélation entre clairance liquidienne alvéolaire et sRAGE plasmatique dans un modèle murin de syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA) par instillation d'acide chlorhydrique. *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation*. 2014;33:A137.
48. Horemans B, Van Holsbeke C, Vos W, Darchuk L, Novakovic V, Fontan AC, et al. Particle deposition in airways of chronic respiratory patients exposed to an urban aerosol. *Environmental science & technology*. 2012;46(21):12162-9.
49. Saieg MA, Cury PM, Godleski JJ, Stearns R, Duarte LG, D'Agostino L, et al. Differential elemental distribution of retained particles along the respiratory tract. *Inhalation toxicology*. 2011;23(8):459-67.
50. Haddrell AE, Davies JF, Reid JP. Dynamics of Particle Size on Inhalation of Environmental Aerosol and Impact on Deposition Fraction. *Environmental science & technology*. 2015;49(24):14512-21.
51. Gerrity TR, Garrard CS, Yeates DB. A mathematical model of particle retention in the air-spaces of human lungs. *British journal of industrial medicine*. 1983;40(2):121-30.
52. Balashazy I, Hofmann W, Heistracher T. Local particle deposition patterns may play a key role in the development of lung cancer. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md : 1985)*. 2003;94(5):1719-25.
53. Chen J, Tan M, Nemmar A, Song W, Dong M, Zhang G, et al. Quantification of extrapulmonary translocation of intratracheal-instilled particles in vivo in rats: effect of lipopolysaccharide. *Toxicology*. 2006;222(3):195-201.
54. Schmid O, Moller W, Semmler-Behnke M, Ferron GA, Karg E, Lipka J, et al. Dosimetry and toxicology of inhaled ultrafine particles. *Biomarkers : biochemical indicators of exposure, response, and susceptibility to chemicals*. 2009;14 Suppl 1:67-73.
55. Li N, Hao M, Phalen RF, Hinds WC, Nel AE. Particulate air pollutants and asthma. A paradigm for the role of oxidative stress in PM-induced adverse health effects. *Clinical immunology (Orlando, Fla)*. 2003;109(3):250-65.
56. Londahl J, Moller W, Pagels JH, Kreyling WG, Swietlicki E, Schmid O. Measurement techniques for respiratory tract deposition of airborne nanoparticles: a critical review. *Journal of aerosol medicine and pulmonary drug delivery*. 2014;27(4):229-54.
57. Oberdorster G, Maynard A, Donaldson K, Castranova V, Fitzpatrick J, Ausman K, et al. Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy. *Particle and fibre toxicology*. 2005;2:8.
58. Daigle CC, Chalupa DC, Gibb FR, Morrow PE, Oberdorster G, Utell MJ, et al. Ultrafine particle deposition in humans during rest and exercise. *Inhalation toxicology*. 2003;15(6):539-52.
59. Nemmar A, Vanbilloen H, Hoylaerts MF, Hoet PH, Verbruggen A, Nemery B. Passage of intratracheally instilled ultrafine particles from the lung into the systemic

- circulation in hamster. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2001;164(9):1665-8.
60. Nemmar A, Hoet PH, Vanquickenborne B, Dinsdale D, Thomeer M, Hoylaerts MF, et al. Passage of inhaled particles into the blood circulation in humans. *Circulation*. 2002;105(4):411-4.
61. Peters A, Veronesi B, Calderon-Garciduenas L, Gehr P, Chen LC, Geiser M, et al. Translocation and potential neurological effects of fine and ultrafine particles a critical update. *Particle and fibre toxicology*. 2006;3:13.
62. Madl AK, Wilson DW, Segall HJ, Pinkerton KE. Alteration in lung particle translocation, macrophage function, and microfilament arrangement in monocrotaline-treated rats. *Toxicology and applied pharmacology*. 1998;153(1):28-38.
63. Renwick LC, Donaldson K, Clouter A. Impairment of alveolar macrophage phagocytosis by ultrafine particles. *Toxicology and applied pharmacology*. 2001;172(2):119-27.
64. Caraballo JC, Yshii C, Westphal W, Moninger T, Comellas AP. Ambient particulate matter affects occludin distribution and increases alveolar transepithelial electrical conductance. *Respirology (Carlton, Vic)*. 2011;16(2):340-9.
65. Roth C, Scheuch G, Stahlhofen W. Clearance Measurements with Radioactively Labelled Ultrafine Particles. *The Annals of Occupational Hygiene*. 1994;38(inhaled_particles_VII):101-6.
66. Moller W, Haussinger K, Winkler-Heil R, Stahlhofen W, Meyer T, Hofmann W, et al. Mucociliary and long-term particle clearance in the airways of healthy nonsmoker subjects. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md : 1985)*. 2004;97(6):2200-6.
67. Ghio AJ, Richards JH, Dittrich KL, Samet JM. Metal storage and transport proteins increase after exposure of the rat lung to an air pollution particle. *Toxicologic pathology*. 1998;26(3):388-94.
68. Elder A, Oberdorster G. Translocation and effects of ultrafine particles outside of the lung. *Clinics in occupational and environmental medicine*. 2006;5(4):785-96.
69. Nemmar A, Hoylaerts MF, Hoet PH, Nemery B. Possible mechanisms of the cardiovascular effects of inhaled particles: systemic translocation and prothrombotic effects. *Toxicology letters*. 2004;149(1-3):243-53.
70. Gradon L, Orlicki D, Podgorski A. Deposition and retention of ultrafine aerosol particles in the human respiratory system. Normal and pathological cases. *International journal of occupational safety and ergonomics : JOSE*. 2000;6(2):189-207.
71. Jakobsson JKF, Aaltonen HL, Nicklasson H, Gudmundsson A, Rissler J, Wollmer P, et al. Altered deposition of inhaled nanoparticles in subjects with chronic obstructive pulmonary disease. *BMC pulmonary medicine*. 2018;18(1):129.
72. Churg A, Brauer M. Ambient atmospheric particles in the airways of human lungs. *Ultrastructural pathology*. 2000;24(6):353-61.
73. Saber AT, Jacobsen NR, Jackson P, Poulsen SS, Kyjovska ZO, Halappanavar S, et al. Particle-induced pulmonary acute phase response may be the causal link between particle inhalation and cardiovascular disease. *Wiley interdisciplinary reviews Nanomedicine and nanobiotechnology*. 2014;6(6):517-31.
74. Mills NL, Donaldson K, Hadoke PW, Boon NA, MacNee W, Cassee FR, et al. Adverse cardiovascular effects of air pollution. *Nature clinical practice Cardiovascular medicine*. 2009;6(1):36-44.
75. Pries AR, Kuebler WM. Normal endothelium. *Handbook of experimental pharmacology*. 2006(176 Pt 1):1-40.
76. Libby P, Aikawa M, Jain MK. Vascular endothelium and atherosclerosis. *Handbook of experimental pharmacology*. 2006(176 Pt 2):285-306.

77. Arnout J, Hoylaerts MF, Lijnen HR. Haemostasis. Handbook of experimental pharmacology. 2006(176 Pt 2):1-41.
78. . Available from: lecorpshumain.fr.
79. Cumming G, Harding K, Horsfield K, Preston S. Gas diffusion in the lung. Clinical science. 1970;38(3):19p.
80. Parpaite T. Rôle de l'environnement cellulaire sur les canaux sensibles à l'étirement dans l'hypertension pulmonaire [Anatomie, Histologie, Anatomopathologie]2015.
81. Townsley MI. Structure and composition of pulmonary arteries, capillaries, and veins. Comprehensive Physiology. 2012;2(1):675-709.
82. Cournand A, Bloomfield RA, Lauson HD. Double lumen catheter for intravenous and intracardiac blood sampling and pressure recording. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine Society for Experimental Biology and Medicine (New York, NY). 1945;60:73-5.
83. Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. Nature. 2011;473(7347):317-25.
84. art sm.
85. Davidson SM, Duchon MR. Endothelial mitochondria: contributing to vascular function and disease. Circulation research. 2007;100(8):1128-41.
86. Wagenvoort CA, Wagenvoort N. Smooth muscle content of pulmonary arterial media in pulmonary venous hypertension compared with other forms of pulmonary hypertension. Chest. 1982;81(5):581-5.
87. Rossaint R, Pison U, Gerlach H, Falke KJ. Inhaled nitric oxide: its effects on pulmonary circulation and airway smooth muscle cells. European heart journal. 1993;14 Suppl I:133-40.
88. Seidelmann SB, Lighthouse JK, Greif DM. Development and pathologies of the arterial wall. Cellular and molecular life sciences : CMLS. 2014;71(11):1977-99.
89. Stenmark KR, Nozik-Grayck E, Gerasimovskaya E, Anwar A, Li M, Riddle S, et al. The adventitia: Essential role in pulmonary vascular remodeling. Comprehensive Physiology. 2011;1(1):141-61.
90. van Hinsbergh VW. Endothelium--role in regulation of coagulation and inflammation. Seminars in immunopathology. 2012;34(1):93-106.
91. Clapham DE. Calcium signaling. Cell. 2007;131(6):1047-58.
92. Sandow SL, Senadheera S, Grayson TH, Welsh DG, Murphy TV. Calcium and endothelium-mediated vasodilator signaling. Advances in experimental medicine and biology. 2012;740:811-31.
93. Tran QK, Watanabe H. Calcium signalling in the endothelium. Handbook of experimental pharmacology. 2006(176 Pt 1):145-87.
94. Billaud M, Lohman AW, Johnstone SR, Biwer LA, Mutchler S, Isakson BE. Regulation of cellular communication by signaling microdomains in the blood vessel wall. Pharmacological reviews. 2014;66(2):513-69.
95. Patrick Lacolley DB, Chantal Boulanger, Bijan Ghaleh, Gervaise Loirand, Florence Pinet, Janelise Samuel. Biologie et pathologie du coeur et des vaisseaux. John Libbey Eurotext ed2007.
96. Ambudkar IS, de Souza LB, Ong HL. TRPC1, Orai1, and STIM1 in SOCE: Friends in tight spaces. Cell calcium. 2017;63:33-9.
97. Tiruppathi C, Ahmmmed GU, Vogel SM, Malik AB. Ca²⁺ signaling, TRP channels, and endothelial permeability. Microcirculation (New York, NY : 1994). 2006;13(8):693-708.
98. Earley S, Brayden JE. Transient receptor potential channels in the vasculature. Physiological reviews. 2015;95(2):645-90.

99. Lam AK, Galione A. The endoplasmic reticulum and junctional membrane communication during calcium signaling. *Biochimica et biophysica acta*. 2013;1833(11):2542-59.
100. Chakraborty S, Hasan G. IP3R, store-operated Ca²⁺ entry and neuronal Ca²⁺ homeostasis in *Drosophila*. *Biochemical Society transactions*. 2012;40(1):279-81.
101. Robertson IBD. CHAPTER 9: Adrenoceptor Agonists & Sympathomimetic Drugs. *Basic & Clinical Pharmacology*, 13e ed2011.
102. Balint Z, Zabini D, Konya V, Nagaraj C, Vegh AG, Varo G, et al. Double-stranded RNA attenuates the barrier function of human pulmonary artery endothelial cells. *PloS one*. 2014;8(6):e63776.
103. Liao Y, Erxleben C, Abramowitz J, Flockerzi V, Zhu MX, Armstrong DL, et al. Functional interactions among Orai1, TRPCs, and STIM1 suggest a STIM-regulated heteromeric Orai/TRPC model for SOCE/Icrac channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008;105(8):2895-900.
104. Rode B, Bailey MA, Marthan R, Beech DJ, Guibert C. ORAI Channels as Potential Therapeutic Targets in Pulmonary Hypertension. *Physiology (Bethesda, Md)*. 2018;33(4):261-8.
105. Gunter TE, Yule DI, Gunter KK, Eliseev RA, Salter JD. Calcium and mitochondria. *FEBS letters*. 2004;567(1):96-102.
106. Culic O, Gruwel ML, Schrader J. Energy turnover of vascular endothelial cells. *The American journal of physiology*. 1997;273(1 Pt 1):C205-13.
107. SIMON M. 2009. Available from: <http://www.cours-pharmacie.com/biochimie/chaine-respiratoire-et-phosphorylation-oxydative.html>.
108. Kirichok Y, Krapivinsky G, Clapham DE. The mitochondrial calcium uniporter is a highly selective ion channel. *Nature*. 2004;427(6972):360-4.
109. Hoppe UC. Mitochondrial calcium channels. *FEBS letters*. 2010;584(10):1975-81.
110. van Breemen C, Fameli N, Evans AM. Pan-junctional sarcoplasmic reticulum in vascular smooth muscle: nanospace Ca²⁺ transport for site- and function-specific Ca²⁺ signalling. *The Journal of physiology*. 2013;591(8):2043-54.
111. Kluge MA, Fetterman JL, Vita JA. Mitochondria and endothelial function. *Circulation research*. 2013;112(8):1171-88.
112. Krols M, van Isterdael G, Asselbergh B, Kremer A, Lippens S, Timmerman V, et al. Mitochondria-associated membranes as hubs for neurodegeneration. *Acta neuropathologica*. 2016;131(4):505-23.
113. Widlansky ME, Gutterman DD. Regulation of endothelial function by mitochondrial reactive oxygen species. *Antioxidants & redox signaling*. 2011;15(6):1517-30.
114. Orrenius S, Zhivotovsky B, Nicotera P. Regulation of cell death: the calcium–apoptosis link. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2003;4:552.
115. Youle RJ, van der Bliek AM. Mitochondrial fission, fusion, and stress. *Science (New York, NY)*. 2012;337(6098):1062-5.
116. Ong SB, Subrayan S, Lim SY, Yellon DM, Davidson SM, Hausenloy DJ. Inhibiting mitochondrial fission protects the heart against ischemia/reperfusion injury. *Circulation*. 2010;121(18):2012-22.
117. Shenouda SM, Widlansky ME, Chen K, Xu G, Holbrook M, Tabit CE, et al. Altered mitochondrial dynamics contributes to endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Circulation*. 2011;124(4):444-53.
118. Maniatis NA, Brovkovich V, Allen SE, John TA, Shajahan AN, Tirupathi C, et al. Novel mechanism of endothelial nitric oxide synthase activation mediated by caveolae internalization in endothelial cells. *Circulation research*. 2006;99(8):870-7.

119. Sanz MJ, Hickey MJ, Johnston B, McCafferty DM, Raharjo E, Huang PL, et al. Neuronal nitric oxide synthase (NOS) regulates leukocyte-endothelial cell interactions in endothelial NOS deficient mice. *British journal of pharmacology*. 2001;134(2):305-12.
120. Hemmrich K, Suschek CV, Lorzynski G, Kolb-Bachofen V. iNOS activity is essential for endothelial stress gene expression protecting against oxidative damage. *Journal of applied physiology* (Bethesda, Md : 1985). 2003;95(5):1937-46.
121. Carreras MC, Franco MC, Finocchietto PV, Converso DP, Antico Arciuch VG, Holod S, et al. The biological significance of mtNOS modulation. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*. 2007;12:1041-8.
122. Dias RG, Negrao CE, Krieger MH. Nitric oxide and the cardiovascular system: cell activation, vascular reactivity and genetic variant. *Arquivos brasileiros de cardiologia*. 2011;96(1):68-75.
123. Zhao H, Hiroi T, Hansen BS, Rade JJ. Cyclic stretch induces cyclooxygenase-2 gene expression in vascular endothelial cells via activation of nuclear factor kappa-beta. *Biochemical and biophysical research communications*. 2009;389(4):599-601.
124. Wong MS, Vanhoutte PM. COX-mediated endothelium-dependent contractions: from the past to recent discoveries. *Acta pharmacologica Sinica*. 2010;31(9):1095-102.
125. Goedicke-Fritz S, Kaistha A, Kacik M, Markert S, Hofmeister A, Busch C, et al. Evidence for functional and dynamic microcompartmentation of Cav-1/TRPV4/K(Ca) in caveolae of endothelial cells. *European journal of cell biology*. 2015;94(7-9):391-400.
126. Ma X, Du J, Zhang P, Deng J, Liu J, Lam FF, et al. Functional role of TRPV4-KCa2.3 signaling in vascular endothelial cells in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Hypertension (Dallas, Tex : 1979)*. 2013;62(1):134-9.
127. Saliez J, Bouzin C, Rath G, Ghisdal P, Desjardins F, Rezzani R, et al. Role of caveolar compartmentation in endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated relaxation: Ca²⁺ signals and gap junction function are regulated by caveolin in endothelial cells. *Circulation*. 2008;117(8):1065-74.
128. Naik JS, Walker BR. Endothelial-dependent dilation following chronic hypoxia involves TRPV4-mediated activation of endothelial BK channels. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*. 2018;470(4):633-48.
129. Vanhoutte PM. Endothelium-dependent hyperpolarizations: the history. *Pharmacological research*. 2004;49(6):503-8.
130. Levin ER. Endothelins. *The New England journal of medicine*. 1995;333(6):356-63.
131. Genet N, Billaud M, Rossignol R, Dubois M, Gillibert-Duplantier J, Isakson BE, et al. Signaling Pathways Linked to Serotonin-Induced Superoxide Anion Production: A Physiological Role for Mitochondria in Pulmonary Arteries. *Frontiers in physiology*. 2017;8:76.
132. Badesch DB, Raskob GE, Elliott CG, Krichman AM, Farber HW, Frost AE, et al. Pulmonary arterial hypertension: baseline characteristics from the REVEAL Registry. *Chest*. 2010;137(2):376-87.
133. Ma L, Roman-Campos D, Austin ED, Eyries M, Sampson KS, Soubrier F, et al. A novel channelopathy in pulmonary arterial hypertension. *The New England journal of medicine*. 2013;369(4):351-61.
134. Galie N, Humbert M, Vachiery JL, Gibbs S, Lang I, Torbicki A, et al. 2015 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: The Joint Task Force for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS): Endorsed by: Association for European Paediatric and Congenital Cardiology (AEPC), International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT). *The European respiratory journal*. 2015;46(4):903-75.

135. Montani D, Gunther S, Dorfmüller P, Perros F, Girerd B, Garcia G, et al. Pulmonary arterial hypertension. *Orphanet journal of rare diseases*. 2013;8:97.
136. McGoon MD, Benza RL, Escribano-Subias P, Jiang X, Miller DP, Peacock AJ, et al. Pulmonary arterial hypertension: epidemiology and registries. *Journal of the American College of Cardiology*. 2013;62(25 Suppl):D51-9.
137. Humbert M, Sitbon O, Chaouat A, Bertocchi M, Habib G, Gressin V, et al. Survival in patients with idiopathic, familial, and anorexia-associated pulmonary arterial hypertension in the modern management era. *Circulation*. 2010;122(2):156-63.
138. Galie N, Humbert M, Vachiery JL, Gibbs S, Lang I, Torbicki A, et al. 2015 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: The Joint Task Force for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS): Endorsed by: Association for European Paediatric and Congenital Cardiology (AEPC), International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT). *European heart journal*. 2016;37(1):67-119.
139. Beall CM, Laskowski D, Erzurum SC. Nitric oxide in adaptation to altitude. *Free radical biology & medicine*. 2012;52(7):1123-34.
140. Kuhr FK, Smith KA, Song MY, Levitan I, Yuan JX. New mechanisms of pulmonary arterial hypertension: role of Ca²⁺(+) signaling. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2012;302(8):H1546-62.
141. Weitzenblum E, Chaouat A. Severe pulmonary hypertension in COPD: is it a distinct disease? *Chest*. 2005;127(5):1480-2.
142. Kim NH, Delcroix M, Jenkins DP, Channick R, Darteville P, Jansa P, et al. Chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Journal of the American College of Cardiology*. 2013;62(25 Suppl):D92-9.
143. Andersen CU, Møllekjær S, Nielsen-Kudsk JE, Bendstrup E, Hilberg O, Simonsen U. Pulmonary hypertension in chronic obstructive and interstitial lung diseases. *International journal of cardiology*. 2013;168(3):1795-804.
144. Seferian A, Simonneau G. [Pulmonary hypertension: definition, diagnostic and new classification]. *Presse medicale (Paris, France : 1983)*. 2014;43(9):935-44.
145. Hoeper MM, Humbert M, Souza R, Idrees M, Kawut SM, Sliwa-Hahnle K, et al. A global view of pulmonary hypertension. *The Lancet Respiratory medicine*. 2016;4(4):306-22.
146. Galie N, Corris PA, Frost A, Girgis RE, Granton J, Jing ZC, et al. Updated treatment algorithm of pulmonary arterial hypertension. *Journal of the American College of Cardiology*. 2013;62(25 Suppl):D60-72.
147. Raiesdana A, Loscalzo J. Pulmonary arterial hypertension. *Annals of medicine*. 2006;38(2):95-110.
148. Dantzker DR, Bower JS. Pulmonary vascular tone improves VA/Q matching in obliterative pulmonary hypertension. *Journal of applied physiology: respiratory, environmental and exercise physiology*. 1981;51(3):607-13.
149. Billaud M, Dahan D, Marthan R, Savineau JP, Guibert C. Role of the gap junctions in the contractile response to agonists in pulmonary artery from two rat models of pulmonary hypertension. *Respiratory research*. 2011;12:30.
150. Rodat L, Savineau JP, Marthan R, Guibert C. Effect of chronic hypoxia on voltage-independent calcium influx activated by 5-HT in rat intrapulmonary arteries. *Pflügers Archiv : European journal of physiology*. 2007;454(1):41-51.
151. Konik EA, Han YS, Brozovich FV. The role of pulmonary vascular contractile protein expression in pulmonary arterial hypertension. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2013;65:147-55.

152. Giaid A, Yanagisawa M, Langleben D, Michel RP, Levy R, Shennib H, et al. Expression of endothelin-1 in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *The New England journal of medicine*. 1993;328(24):1732-9.
153. Herve P, Launay JM, Scrobohaci ML, Brenot F, Simonneau G, Petitpretz P, et al. Increased plasma serotonin in primary pulmonary hypertension. *The American journal of medicine*. 1995;99(3):249-54.
154. Kaneko FT, Arroliga AC, Dweik RA, Comhair SA, Laskowski D, Oppedisano R, et al. Biochemical reaction products of nitric oxide as quantitative markers of primary pulmonary hypertension. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1998;158(3):917-23.
155. Christman BW, McPherson CD, Newman JH, King GA, Bernard GR, Groves BM, et al. An imbalance between the excretion of thromboxane and prostacyclin metabolites in pulmonary hypertension. *The New England journal of medicine*. 1992;327(2):70-5.
156. Shimoda LA, Sham JS, Sylvester JT. Altered pulmonary vasoreactivity in the chronically hypoxic lung. *Physiological research*. 2000;49(5):549-60.
157. Bonnet S, Belus A, Hyvelin JM, Roux E, Marthan R, Savineau JP. Effect of chronic hypoxia on agonist-induced tone and calcium signaling in rat pulmonary artery. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2001;281(1):L193-201.
158. Bonnet S, Michelakis ED, Porter CJ, Andrade-Navarro MA, Thebaud B, Bonnet S, et al. An abnormal mitochondrial-hypoxia inducible factor-1 α -Kv channel pathway disrupts oxygen sensing and triggers pulmonary arterial hypertension in fawn hooded rats: similarities to human pulmonary arterial hypertension. *Circulation*. 2006;113(22):2630-41.
159. Yuan JX, Aldinger AM, Juhaszova M, Wang J, Conte JV, Jr., Gaine SP, et al. Dysfunctional voltage-gated K⁺ channels in pulmonary artery smooth muscle cells of patients with primary pulmonary hypertension. *Circulation*. 1998;98(14):1400-6.
160. Platoshyn O, Golovina VA, Bailey CL, Limsuwan A, Krick S, Juhaszova M, et al. Sustained membrane depolarization and pulmonary artery smooth muscle cell proliferation. *American journal of physiology Cell physiology*. 2000;279(5):C1540-9.
161. Suresh K, Shimoda LA. Endothelial Cell Reactive Oxygen Species and Ca²⁺ Signaling in Pulmonary Hypertension. *Advances in experimental medicine and biology*. 2017;967:299-314.
162. Hampl V, Cornfield DN, Cowan NJ, Archer SL. Hypoxia potentiates nitric oxide synthesis and transiently increases cytosolic calcium levels in pulmonary artery endothelial cells. *The European respiratory journal*. 1995;8(4):515-22.
163. Fantozzi I, Zhang S, Platoshyn O, Remillard CV, Cowling RT, Yuan JX. Hypoxia increases AP-1 binding activity by enhancing capacitative Ca²⁺ entry in human pulmonary artery endothelial cells. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2003;285(6):L1233-45.
164. Heath D, Edwards JE. The pathology of hypertensive pulmonary vascular disease; a description of six grades of structural changes in the pulmonary arteries with special reference to congenital cardiac septal defects. *Circulation*. 1958;18(4 Part 1):533-47.
165. Weitzenblum E, Chaouat A, Kessler R. Pulmonary hypertension in chronic obstructive pulmonary disease. *Pneumonologia i alergologia polska*. 2013;81(4):390-8.
166. Chazova I, Loyd JE, Zhdanov VS, Newman JH, Belenkov Y, Meyrick B. Pulmonary artery adventitial changes and venous involvement in primary pulmonary hypertension. *The American journal of pathology*. 1995;146(2):389-97.
167. Shimoda LA, Wang J, Sylvester JT. Ca²⁺ channels and chronic hypoxia. *Microcirculation (New York, NY : 1994)*. 2006;13(8):657-70.
168. Masri FA, Xu W, Comhair SA, Asosingh K, Koo M, Vasanji A, et al. Hyperproliferative apoptosis-resistant endothelial cells in idiopathic pulmonary arterial

- hypertension. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2007;293(3):L548-54.
169. Sakao S, Tatsumi K, Voelkel NF. Endothelial cells and pulmonary arterial hypertension: apoptosis, proliferation, interaction and transdifferentiation. *Respiratory research*. 2009;10:95.
170. Tu L, Dewachter L, Gore B, Fadel E, Dartevielle P, Simonneau G, et al. Autocrine fibroblast growth factor-2 signaling contributes to altered endothelial phenotype in pulmonary hypertension. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2011;45(2):311-22.
171. Bonnet S, Rochefort G, Sutendra G, Archer SL, Haromy A, Webster L, et al. The nuclear factor of activated T cells in pulmonary arterial hypertension can be therapeutically targeted. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007;104(27):11418-23.
172. Galie N, Palazzini M, Manes A. Pulmonary arterial hypertension: from the kingdom of the near-dead to multiple clinical trial meta-analyses. *European heart journal*. 2010;31(17):2080-6.
173. Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*. 2008;454(7203):428-35.
174. Medzhitov R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature*. 2007;449(7164):819-26.
175. Soon E, Holmes AM, Treacy CM, Doughty NJ, Southgate L, Machado RD, et al. Elevated levels of inflammatory cytokines predict survival in idiopathic and familial pulmonary arterial hypertension. *Circulation*. 2010;122(9):920-7.
176. Rong Y, Zhou T, Cheng W, Guo J, Cui X, Liu Y, et al. Particle-size-dependent cytokine responses and cell damage induced by silica particles and macrophages-derived mediators in endothelial cell. *Environmental toxicology and pharmacology*. 2013;36(3):921-8.
177. Perros F, Humbert M, Cohen-Kaminsky S. Hypertension artérielle pulmonaire. *Medecine sciences : M/S*. 2013;29(6-7):607-16.
178. Tudor RM, Archer SL, Dorfmueller P, Erzurum SC, Guignabert C, Michelakis E, et al. Relevant issues in the pathology and pathobiology of pulmonary hypertension. *Journal of the American College of Cardiology*. 2013;62(25 Suppl):D4-12.
179. Stenmark KR, Davie NJ, Reeves JT, Frid MG. Hypoxia, leukocytes, and the pulmonary circulation. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md : 1985)*. 2005;98(2):715-21.
180. Humbert M, Monti G, Brenot F, Sitbon O, Portier A, Grangeot-Keros L, et al. Increased interleukin-1 and interleukin-6 serum concentrations in severe primary pulmonary hypertension. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1995;151(5):1628-31.
181. Chaouat A, Savale L, Chouaid C, Tu L, Sztrymf B, Canuet M, et al. Role for interleukin-6 in COPD-related pulmonary hypertension. *Chest*. 2009;136(3):678-87.
182. Joppa P, Petrasova D, Stancak B, Tkacova R. Systemic inflammation in patients with COPD and pulmonary hypertension. *Chest*. 2006;130(2):326-33.
183. Sanchez O, Marcos E, Perros F, Fadel E, Tu L, Humbert M, et al. Role of endothelium-derived CC chemokine ligand 2 in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2007;176(10):1041-7.
184. Gokce N, Keaney JF, Jr., Hunter LM, Watkins MT, Menzoian JO, Vita JA. Risk stratification for postoperative cardiovascular events via noninvasive assessment of endothelial function: a prospective study. *Circulation*. 2002;105(13):1567-72.
185. Sedeek M, Hebert RL, Kennedy CR, Burns KD, Touyz RM. Molecular mechanisms of hypertension: role of Nox family NADPH oxidases. *Current opinion in nephrology and hypertension*. 2009;18(2):122-7.

186. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2007;39(1):44-84.
187. Landmesser U, Harrison DG. Oxidant stress as a marker for cardiovascular events: Ox marks the spot. *Circulation*. 2001;104(22):2638-40.
188. Zhu L, Lu Y, Zhang J, Hu Q. Subcellular Redox Signaling. *Advances in experimental medicine and biology*. 2017;967:385-98.
189. Migdal C, Serres M. [Reactive oxygen species and oxidative stress]. *Medecine sciences : M/S*. 2011;27(4):405-12.
190. Tkaczyk J, Vizek M. Oxidative stress in the lung tissue--sources of reactive oxygen species and antioxidant defence. *Prague medical report*. 2007;108(2):105-14.
191. Novo E, Parola M. Redox mechanisms in hepatic chronic wound healing and fibrogenesis. *Fibrogenesis & tissue repair*. 2008;1(1):5.
192. Cadenas E, Davies KJ. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free radical biology & medicine*. 2000;29(3-4):222-30.
193. Dromparis P, Michelakis ED. Mitochondria in vascular health and disease. *Annual review of physiology*. 2013;75:95-126.
194. Lassegue B, San Martin A, Griendling KK. Biochemistry, physiology, and pathophysiology of NADPH oxidases in the cardiovascular system. *Circulation research*. 2012;110(10):1364-90.
195. Dikalov SI, Dikalova AE, Bikineyeva AT, Schmidt HH, Harrison DG, Griendling KK. Distinct roles of Nox1 and Nox4 in basal and angiotensin II-stimulated superoxide and hydrogen peroxide production. *Free radical biology & medicine*. 2008;45(9):1340-51.
196. Ovrevik J, Refsnes M, Lag M, Holme JA, Schwarze PE. Activation of Proinflammatory Responses in Cells of the Airway Mucosa by Particulate Matter: Oxidant- and Non-Oxidant-Mediated Triggering Mechanisms. *Biomolecules*. 2015;5(3):1399-440.
197. Rahman I, Biswas SK, Kode A. Oxidant and antioxidant balance in the airways and airway diseases. *European journal of pharmacology*. 2006;533(1-3):222-39.
198. Miller AF. Superoxide dismutases: ancient enzymes and new insights. *FEBS letters*. 2012;586(5):585-95.
199. Nishikawa M, Hashida M, Takakura Y. Catalase delivery for inhibiting ROS-mediated tissue injury and tumor metastasis. *Advanced drug delivery reviews*. 2009;61(4):319-26.
200. Mates JM, Sanchez-Jimenez FM. Role of reactive oxygen species in apoptosis: implications for cancer therapy. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2000;32(2):157-70.
201. Chen XL, Varner SE, Rao AS, Grey JY, Thomas S, Cook CK, et al. Laminar flow induction of antioxidant response element-mediated genes in endothelial cells. A novel anti-inflammatory mechanism. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(2):703-11.
202. Coste F, Guibert C, Magat J, Abell E, Vaillant F, Dubois M, et al. Chronic hypoxia aggravates monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension: a rodent relevant model to the human severe form of the disease. *Respiratory research*. 2017;18(1):47.
203. Fresquet F, Pourageaud F, Leblais V, Brandes RP, Savineau JP, Marthan R, et al. Role of reactive oxygen species and gp91phox in endothelial dysfunction of pulmonary arteries induced by chronic hypoxia. *British journal of pharmacology*. 2006;148(5):714-23.
204. Hoshikawa Y, Ono S, Suzuki S, Tanita T, Chida M, Song C, et al. Generation of oxidative stress contributes to the development of pulmonary hypertension induced by hypoxia. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md : 1985)*. 2001;90(4):1299-306.
205. Jankov RP, Kantores C, Pan J, Belik J. Contribution of xanthine oxidase-derived superoxide to chronic hypoxic pulmonary hypertension in neonatal rats. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2008;294(2):L233-45.

206. Mathew R, Yuan N, Rosenfeld L, Gewitz MH, Kumar A. Effects of monocrotaline on endothelial nitric oxide synthase expression and sulfhydryl levels in rat lungs. *Heart disease (Hagerstown, Md)*. 2002;4(3):152-8.
207. Lai YL, Wu HD, Chen CF. Antioxidants attenuate chronic hypoxic pulmonary hypertension. *Journal of cardiovascular pharmacology*. 1998;32(5):714-20.
208. Elmedal B, de Dam MY, Mulvany MJ, Simonsen U. The superoxide dismutase mimetic, tempol, blunts right ventricular hypertrophy in chronic hypoxic rats. *British journal of pharmacology*. 2004;141(1):105-13.
209. Cracowski JL, Leuchte HH. The potential of biomarkers in pulmonary arterial hypertension. *The American journal of cardiology*. 2012;110(6 Suppl):32s-8s.
210. Irodova NL, Lankin VZ, Konovalova GK, Kochetov AG, Chazova IE. Oxidative stress in patients with primary pulmonary hypertension. *Bulletin of experimental biology and medicine*. 2002;133(6):580-2.
211. Grobe AC, Wells SM, Benavidez E, Oishi P, Azakie A, Fineman JR, et al. Increased oxidative stress in lambs with increased pulmonary blood flow and pulmonary hypertension: role of NADPH oxidase and endothelial NO synthase. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2006;290(6):L1069-77.
212. Mittal M, Roth M, Konig P, Hofmann S, Dony E, Goyal P, et al. Hypoxia-dependent regulation of nonphagocytic NADPH oxidase subunit NOX4 in the pulmonary vasculature. *Circulation research*. 2007;101(3):258-67.
213. Dennis KE, Aschner JL, Milatovic D, Schmidt JW, Aschner M, Kaplowitz MR, et al. NADPH oxidases and reactive oxygen species at different stages of chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension in newborn piglets. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2009;297(4):L596-607.
214. Nandi M, Miller A, Stidwill R, Jacques TS, Lam AA, Haworth S, et al. Pulmonary hypertension in a GTP-cyclohydrolase 1-deficient mouse. *Circulation*. 2005;111(16):2086-90.
215. Khoo JP, Zhao L, Alp NJ, Bendall JK, Nicoli T, Rockett K, et al. Pivotal role for endothelial tetrahydrobiopterin in pulmonary hypertension. *Circulation*. 2005;111(16):2126-33.
216. Dumitrescu C, Biondi R, Xia Y, Cardounel AJ, Druhan LJ, Ambrosio G, et al. Myocardial ischemia results in tetrahydrobiopterin (BH4) oxidation with impaired endothelial function ameliorated by BH4. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007;104(38):15081-6.
217. Touyz RM. Reactive oxygen species as mediators of calcium signaling by angiotensin II: implications in vascular physiology and pathophysiology. *Antioxidants & redox signaling*. 2005;7(9-10):1302-14.
218. Bogen I, Kappl R, Kummerow C, Gulaboski R, Hoth M, Niemeyer BA. Redox regulation of calcium ion channels: chemical and physiological aspects. *Cell calcium*. 2011;50(5):407-23.
219. Chuang HH, Lin S. Oxidative challenges sensitize the capsaicin receptor by covalent cysteine modification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;106(47):20097-102.
220. Kolisek M, Beck A, Fleig A, Penner R. Cyclic ADP-ribose and hydrogen peroxide synergize with ADP-ribose in the activation of TRPM2 channels. *Molecular cell*. 2005;18(1):61-9.
221. Dreher D, Jornot L, Junod AF. Effects of hypoxanthine-xanthine oxidase on Ca²⁺ stores and protein synthesis in human endothelial cells. *Circulation research*. 1995;76(3):388-95.

222. Volk T, Hensel M, Kox WJ. Transient Ca²⁺ changes in endothelial cells induced by low doses of reactive oxygen species: role of hydrogen peroxide. *Molecular and cellular biochemistry*. 1997;171(1-2):11-21.
223. Evangelista AM, Thompson MD, Bolotina VM, Tong X, Cohen RA. Nox4- and Nox2-dependent oxidant production is required for VEGF-induced SERCA cysteine-674 S-glutathiolation and endothelial cell migration. *Free radical biology & medicine*. 2012;53(12):2327-34.
224. Wang XT, McCullough KD, Wang XJ, Carpenter G, Holbrook NJ. Oxidative stress-induced phospholipase C-gamma 1 activation enhances cell survival. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(30):28364-71.
225. Weissmann N, Winterhalder S, Nollen M, Voswinckel R, Quanz K, Ghofrani HA, et al. NO and reactive oxygen species are involved in biphasic hypoxic vasoconstriction of isolated rabbit lungs. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2001;280(4):L638-45.
226. Waypa GB, Marks JD, Mack MM, Boriboun C, Mungai PT, Schumacker PT. Mitochondrial reactive oxygen species trigger calcium increases during hypoxia in pulmonary arterial myocytes. *Circulation research*. 2002;91(8):719-26.
227. Cheng TH, Shih NL, Chen SY, Loh SH, Cheng PY, Tsai CS, et al. Reactive oxygen species mediate cyclic strain-induced endothelin-1 gene expression via Ras/Raf/extracellular signal-regulated kinase pathway in endothelial cells. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2001;33(10):1805-14.
228. Kuzkaya N, Weissmann N, Harrison DG, Dikalov S. Interactions of peroxynitrite, tetrahydrobiopterin, ascorbic acid, and thiols: implications for uncoupling endothelial nitric-oxide synthase. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(25):22546-54.
229. Takaki A, Morikawa K, Tsutsui M, Murayama Y, Tekes E, Yamagishi H, et al. Crucial role of nitric oxide synthases system in endothelium-dependent hyperpolarization in mice. *The Journal of experimental medicine*. 2008;205(9):2053-63.
230. Forstermann U, Munzel T. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. *Circulation*. 2006;113(13):1708-14.
231. Zou MH, Shi C, Cohen RA. Oxidation of the zinc-thiolate complex and uncoupling of endothelial nitric oxide synthase by peroxynitrite. *The Journal of clinical investigation*. 2002;109(6):817-26.
232. Gow AJ, Thom SR, Ischiropoulos H. Nitric oxide and peroxynitrite-mediated pulmonary cell death. *The American journal of physiology*. 1998;274(1 Pt 1):L112-8.
233. Mata-Greenwood E, Meyrick B, Steinhorn RH, Fineman JR, Black SM. Alterations in TGF-beta1 expression in lambs with increased pulmonary blood flow and pulmonary hypertension. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2003;285(1):L209-21.
234. Mata-Greenwood E, Meyrick B, Soifer SJ, Fineman JR, Black SM. Expression of VEGF and its receptors Flt-1 and Flk-1/KDR is altered in lambs with increased pulmonary blood flow and pulmonary hypertension. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2003;285(1):L222-31.
235. Wedgwood S, Devol JM, Grobe A, Benavidez E, Azakie A, Fineman JR, et al. Fibroblast growth factor-2 expression is altered in lambs with increased pulmonary blood flow and pulmonary hypertension. *Pediatric research*. 2007;61(1):32-6.
236. Wolin MS, Gupte SA, Neo BH, Gao Q, Ahmad M. Oxidant-redox regulation of pulmonary vascular responses to hypoxia and nitric oxide-cGMP signaling. *Cardiology in review*. 2010;18(2):89-93.

237. Diebold I, Flugel D, Becht S, Belaiba RS, Bonello S, Hess J, et al. The hypoxia-inducible factor-2 α is stabilized by oxidative stress involving NOX4. *Antioxidants & redox signaling*. 2010;13(4):425-36.
238. Black SM, DeVol JM, Wedgwood S. Regulation of fibroblast growth factor-2 expression in pulmonary arterial smooth muscle cells involves increased reactive oxygen species generation. *American journal of physiology Cell physiology*. 2008;294(1):C345-54.
239. Aggarwal S, Gross CM, Sharma S, Fineman JR, Black SM. Reactive oxygen species in pulmonary vascular remodeling. *Comprehensive Physiology*. 2013;3(3):1011-34.
240. Price LC, Wort SJ, Perros F, Dorfmuller P, Huertas A, Montani D, et al. Inflammation in pulmonary arterial hypertension. *Chest*. 2012;141(1):210-21.
241. Touyz RM, Tabet F, Schiffrin EL. Redox-dependent signalling by angiotensin II and vascular remodelling in hypertension. *Clinical and experimental pharmacology & physiology*. 2003;30(11):860-6.
242. Lee IT, Yang CM. Role of NADPH oxidase/ROS in pro-inflammatory mediators-induced airway and pulmonary diseases. *Biochemical pharmacology*. 2012;84(5):581-90.
243. Park HS, Kim SR, Lee YC. Impact of oxidative stress on lung diseases. *Respirology (Carlton, Vic)*. 2009;14(1):27-38.
244. Freund-Michel V, Khoyarattee N, Savineau JP, Muller B, Guibert C. Mitochondria: roles in pulmonary hypertension. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2014;55:93-7.
245. Liu Y, Li H, Bubolz AH, Zhang DX, Gutterman DD. Endothelial cytoskeletal elements are critical for flow-mediated dilation in human coronary arterioles. *Medical & biological engineering & computing*. 2008;46(5):469-78.
246. Dromparis P, Paulin R, Sutendra G, Qi AC, Bonnet S, Michelakis ED. Uncoupling protein 2 deficiency mimics the effects of hypoxia and endoplasmic reticulum stress on mitochondria and triggers pseudohypoxic pulmonary vascular remodeling and pulmonary hypertension. *Circulation research*. 2013;113(2):126-36.
247. Vaziri ND, Rodriguez-Iturbe B. Mechanisms of disease: oxidative stress and inflammation in the pathogenesis of hypertension. *Nature clinical practice Nephrology*. 2006;2(10):582-93.
248. Harrison DG, Widder J, Grumbach I, Chen W, Weber M, Searles C. Endothelial mechanotransduction, nitric oxide and vascular inflammation. *Journal of internal medicine*. 2006;259(4):351-63.
249. Damico R, Zulueta JJ, Hassoun PM. Pulmonary endothelial cell NOX. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2012;47(2):129-39.
250. Wong CM, Bansal G, Pavlickova L, Marcocci L, Suzuki YJ. Reactive oxygen species and antioxidants in pulmonary hypertension. *Antioxidants & redox signaling*. 2013;18(14):1789-96.
251. Bowers R, Cool C, Murphy RC, Tudor RM, Hopken MW, Flores SC, et al. Oxidative stress in severe pulmonary hypertension. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2004;169(6):764-9.
252. Pope CA, 3rd, Schwartz J, Ransom MR. Daily mortality and PM10 pollution in Utah Valley. *Archives of environmental health*. 1992;47(3):211-7.
253. Dockery DW, Pope CA, 3rd, Xu X, Spengler JD, Ware JH, Fay ME, et al. An association between air pollution and mortality in six U.S. cities. *The New England journal of medicine*. 1993;329(24):1753-9.
254. Schwartz J. Air pollution and daily mortality: a review and meta analysis. *Environmental research*. 1994;64(1):36-52.

255. Dominici F, Peng RD, Bell ML, Pham L, McDermott A, Zeger SL, et al. Fine particulate air pollution and hospital admission for cardiovascular and respiratory diseases. *Jama*. 2006;295(10):1127-34.
256. Pope CA, 3rd, Burnett RT, Thurston GD, Thun MJ, Calle EE, Krewski D, et al. Cardiovascular mortality and long-term exposure to particulate air pollution: epidemiological evidence of general pathophysiological pathways of disease. *Circulation*. 2004;109(1):71-7.
257. Brook RD, Franklin B, Cascio W, Hong Y, Howard G, Lipsett M, et al. Air pollution and cardiovascular disease: a statement for healthcare professionals from the Expert Panel on Population and Prevention Science of the American Heart Association. *Circulation*. 2004;109(21):2655-71.
258. Bhatnagar A. Environmental cardiology: studying mechanistic links between pollution and heart disease. *Circulation research*. 2006;99(7):692-705.
259. Samet JM, Zeger SL, Dominici F, Curriero F, Coursac I, Dockery DW, et al. The National Morbidity, Mortality, and Air Pollution Study. Part II: Morbidity and mortality from air pollution in the United States. Research report (Health Effects Institute). 2000;94(Pt 2):5-70; discussion 1-9.
260. von Klot S, Peters A, Aalto P, Bellander T, Berglind N, D'Ippoliti D, et al. Ambient air pollution is associated with increased risk of hospital cardiac readmissions of myocardial infarction survivors in five European cities. *Circulation*. 2005;112(20):3073-9.
261. Wellenius GA, Coull BA, Batalha JR, Diaz EA, Lawrence J, Godleski JJ. Effects of ambient particles and carbon monoxide on supraventricular arrhythmias in a rat model of myocardial infarction. *Inhalation toxicology*. 2006;18(14):1077-82.
262. Costa LG, Cole TB, Coburn J, Chang YC, Dao K, Roque P. Neurotoxicants are in the air: convergence of human, animal, and in vitro studies on the effects of air pollution on the brain. *BioMed research international*. 2014;2014:736385.
263. Eze IC, Schaffner E, Foraster M, Imboden M, von Eckardstein A, Gerbase MW, et al. Long-Term Exposure to Ambient Air Pollution and Metabolic Syndrome in Adults. *PloS one*. 2015;10(6):e0130337.
264. Dimakakou E, Johnston HJ, Streftaris G, Cherrie JW. Exposure to Environmental and Occupational Particulate Air Pollution as a Potential Contributor to Neurodegeneration and Diabetes: A Systematic Review of Epidemiological Research. *International journal of environmental research and public health*. 2018;15(8).
265. O'Neill MS, Veves A, Zanobetti A, Sarnat JA, Gold DR, Economides PA, et al. Diabetes enhances vulnerability to particulate air pollution-associated impairment in vascular reactivity and endothelial function. *Circulation*. 2005;111(22):2913-20.
266. Zanobetti A, Schwartz J. Cardiovascular damage by airborne particles: are diabetics more susceptible? *Epidemiology (Cambridge, Mass)*. 2002;13(5):588-92.
267. Brook RD, Rajagopalan S. Particulate matter, air pollution, and blood pressure. *Journal of the American Society of Hypertension : JASH*. 2009;3(5):332-50.
268. Dubowsky SD, Suh H, Schwartz J, Coull BA, Gold DR. Diabetes, obesity, and hypertension may enhance associations between air pollution and markers of systemic inflammation. *Environmental health perspectives*. 2006;114(7):992-8.
269. Nemery B, Hoet PH, Nemmar A. The Meuse Valley fog of 1930: an air pollution disaster. *Lancet (London, England)*. 2001;357(9257):704-8.
270. Helfand WH, Lazarus J, Theerman P. Donora, Pennsylvania: an environmental disaster of the 20th century. *American journal of public health*. 2001;91(4):553.
271. Bell ML, Davis DL. Reassessment of the lethal London fog of 1952: novel indicators of acute and chronic consequences of acute exposure to air pollution. *Environmental health perspectives*. 2001;109 Suppl 3:389-94.

272. Schwartz J. Short term fluctuations in air pollution and hospital admissions of the elderly for respiratory disease. *Thorax*. 1995;50(5):531-8.
273. Dockery DW, Schwartz J. Particulate air pollution and mortality: more than the Philadelphia story. *Epidemiology (Cambridge, Mass)*. 1995;6(6):629-32.
274. Zanobetti A, Schwartz J, Dockery DW. Airborne particles are a risk factor for hospital admissions for heart and lung disease. *Environmental health perspectives*. 2000;108(11):1071-7.
275. Schwartz J. Is there harvesting in the association of airborne particles with daily deaths and hospital admissions? *Epidemiology (Cambridge, Mass)*. 2001;12(1):55-61.
276. Katsouyanni K, Touloumi G, Samoli E, Gryparis A, Le Tertre A, Monopolis Y, et al. Confounding and effect modification in the short-term effects of ambient particles on total mortality: results from 29 European cities within the APHEA2 project. *Epidemiology (Cambridge, Mass)*. 2001;12(5):521-31.
277. Gold DR, Litonjua A, Schwartz J, Lovett E, Larson A, Nearing B, et al. Ambient pollution and heart rate variability. *Circulation*. 2000;101(11):1267-73.
278. Lee MS, Eum KD, Fang SC, Rodrigues EG, Modest GA, Christiani DC. Oxidative stress and systemic inflammation as modifiers of cardiac autonomic responses to particulate air pollution. *International journal of cardiology*. 2014;176(1):166-70.
279. Annesi-Maesano I, Moreau D, Caillaud D, Lavaud F, Le Moullec Y, Taytard A, et al. Residential proximity fine particles related to allergic sensitisation and asthma in primary school children. *Respiratory medicine*. 2007;101(8):1721-9.
280. Roy A, Gong J, Thomas DC, Zhang J, Kipen HM, Rich DQ, et al. The cardiopulmonary effects of ambient air pollution and mechanistic pathways: a comparative hierarchical pathway analysis. *PloS one*. 2014;9(12):e114913.
281. Lawal AO, Davids LM, Marnewick JL. Diesel exhaust particles and endothelial cells dysfunction: An update. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*. 2016;32:92-104.
282. Van Eeden S, Leipsic J, Paul Man SF, Sin DD. The relationship between lung inflammation and cardiovascular disease. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2012;186(1):11-6.
283. Kunzli N. Unifying susceptibility, exposure, and time: discussion of unifying analytic approaches and future directions. *Journal of toxicology and environmental health Part A*. 2005;68(13-14):1263-71.
284. Bourdrel T, Bind MA, Bejot Y, Morel O, Argacha JF. Cardiovascular effects of air pollution. *Archives of cardiovascular diseases*. 2017;110(11):634-42.
285. Laden F, Neas LM, Dockery DW, Schwartz J. Association of fine particulate matter from different sources with daily mortality in six U.S. cities. *Environmental health perspectives*. 2000;108(10):941-7.
286. Janssen NA, Hoek G, Simic-Lawson M, Fischer P, van Bree L, ten Brink H, et al. Black carbon as an additional indicator of the adverse health effects of airborne particles compared with PM10 and PM2.5. *Environmental health perspectives*. 2011;119(12):1691-9.
287. Oberdorster G, Utell MJ. Ultrafine particles in the urban air: to the respiratory tract--and beyond? *Environmental health perspectives*. 2002;110(8):A440-1.
288. Cohen AJ, Brauer M, Burnett R, Anderson HR, Frostad J, Estep K, et al. Estimates and 25-year trends of the global burden of disease attributable to ambient air pollution: an analysis of data from the Global Burden of Diseases Study 2015. *Lancet (London, England)*. 2017;389(10082):1907-18.
289. Nemmar A, Holme JA, Rosas I, Schwarze PE, Alfaro-Moreno E. Recent advances in particulate matter and nanoparticle toxicology: a review of the in vivo and in vitro studies. *BioMed research international*. 2013;2013:279371.

290. Tabor CM, Shaw CA, Robertson S, Miller MR, Duffin R, Donaldson K, et al. Platelet activation independent of pulmonary inflammation contributes to diesel exhaust particulate-induced promotion of arterial thrombosis. *Particle and fibre toxicology*. 2016;13:6.
291. Frampton MW. Systemic and cardiovascular effects of airway injury and inflammation: ultrafine particle exposure in humans. *Environmental health perspectives*. 2001;109 Suppl 4:529-32.
292. Delfino RJ, Sioutas C, Malik S. Potential role of ultrafine particles in associations between airborne particle mass and cardiovascular health. *Environmental health perspectives*. 2005;113(8):934-46.
293. Brook RD, Rajagopalan S, Pope CA, 3rd, Brook JR, Bhatnagar A, Diez-Roux AV, et al. Particulate matter air pollution and cardiovascular disease: An update to the scientific statement from the American Heart Association. *Circulation*. 2010;121(21):2331-78.
294. Rajagopalan S, Sun Q, Chen LC. Particulate pollution and endothelial function: deja vu all over again in the air. *Circulation*. 2005;111(22):2869-71.
295. Urch B, Silverman F, Corey P, Brook JR, Lukic KZ, Rajagopalan S, et al. Acute blood pressure responses in healthy adults during controlled air pollution exposures. *Environmental health perspectives*. 2005;113(8):1052-5.
296. Brook RD, Brook JR, Urch B, Vincent R, Rajagopalan S, Silverman F. Inhalation of fine particulate air pollution and ozone causes acute arterial vasoconstriction in healthy adults. *Circulation*. 2002;105(13):1534-6.
297. Kunzli N, Jerrett M, Garcia-Esteban R, Basagana X, Beckermann B, Gilliland F, et al. Ambient air pollution and the progression of atherosclerosis in adults. *PLoS one*. 2010;5(2):e9096.
298. Brunner H, Cockcroft JR, Deanfield J, Donald A, Ferrannini E, Halcox J, et al. Endothelial function and dysfunction. Part II: Association with cardiovascular risk factors and diseases. A statement by the Working Group on Endothelins and Endothelial Factors of the European Society of Hypertension. *Journal of hypertension*. 2005;23(2):233-46.
299. Kaess BM, Rong J, Larson MG, Hamburg NM, Vita JA, Levy D, et al. Aortic stiffness, blood pressure progression, and incident hypertension. *Jama*. 2012;308(9):875-81.
300. Olsen Y, Karotki DG, Jensen DM, Beko G, Kjeldsen BU, Clausen G, et al. Vascular and lung function related to ultrafine and fine particles exposure assessed by personal and indoor monitoring: a cross-sectional study. *Environmental health : a global access science source*. 2014;13:112.
301. Hajat A, Allison M, Diez-Roux AV, Jenny NS, Jorgensen NW, Szpiro AA, et al. Long-term exposure to air pollution and markers of inflammation, coagulation, and endothelial activation: a repeat-measures analysis in the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Epidemiology (Cambridge, Mass)*. 2015;26(3):310-20.
302. Sun Q, Yue P, Ying Z, Cardounel AJ, Brook RD, Devlin R, et al. Air pollution exposure potentiates hypertension through reactive oxygen species-mediated activation of Rho/ROCK. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2008;28(10):1760-6.
303. Langrish JP, Unosson J, Bosson J, Barath S, Muala A, Blackwell S, et al. Altered nitric oxide bioavailability contributes to diesel exhaust inhalation-induced cardiovascular dysfunction in man. *Journal of the American Heart Association*. 2013;2(1):e004309.
304. Krishnan RM, Adar SD, Szpiro AA, Jorgensen NW, Van Hee VC, Barr RG, et al. Vascular responses to long- and short-term exposure to fine particulate matter: MESA Air (Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis and Air Pollution). *Journal of the American College of Cardiology*. 2012;60(21):2158-66.
305. Tornqvist H, Mills NL, Gonzalez M, Miller MR, Robinson SD, Megson IL, et al. Persistent endothelial dysfunction in humans after diesel exhaust inhalation. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2007;176(4):395-400.

306. Bloomfield GS, Vedanthan R, Vasudevan L, Kithei A, Were M, Velazquez EJ. Mobile health for non-communicable diseases in Sub-Saharan Africa: a systematic review of the literature and strategic framework for research. *Globalization and health*. 2014;10:49.
307. Fuks KB, Weinmayr G, Foraster M, Dratva J, Hampel R, Houthuijs D, et al. Arterial blood pressure and long-term exposure to traffic-related air pollution: an analysis in the European Study of Cohorts for Air Pollution Effects (ESCAPE). *Environmental health perspectives*. 2014;122(9):896-905.
308. Cai Y, Zhang B, Ke W, Feng B, Lin H, Xiao J, et al. Associations of Short-Term and Long-Term Exposure to Ambient Air Pollutants With Hypertension: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Hypertension (Dallas, Tex : 1979)*. 2016;68(1):62-70.
309. Pascal M, Corso M, Chanel O, Declercq C, Badaloni C, Cesaroni G, et al. Assessing the public health impacts of urban air pollution in 25 European cities: results of the Aphekom project. *The Science of the total environment*. 2013;449:390-400.
310. Aphekom. the Aphekom project 2011. Available from: <http://aphekom.org/web/aphekom.org/home>.
311. Sabine Host ECeAS. Impacts sanitaires de la pollution atmosphérique urbaine et des expositions à proximité du trafic routier dans l'agglomération parisienne. 2012.
312. Vouk VB, Piver WT. Metallic elements in fossil fuel combustion products: amounts and form of emissions and evaluation of carcinogenicity and mutagenicity. *Environmental health perspectives*. 1983;47:201-25.
313. Valavanidis A, Fiotakis K, Vlachogianni T. Airborne particulate matter and human health: toxicological assessment and importance of size and composition of particles for oxidative damage and carcinogenic mechanisms. *Journal of environmental science and health Part C, Environmental carcinogenesis & ecotoxicology reviews*. 2008;26(4):339-62.
314. Conner SD, Schmid SL. Regulated portals of entry into the cell. *Nature*. 2003;422(6927):37-44.
315. Hillaireau H, Couvreur P. Nanocarriers' entry into the cell: relevance to drug delivery. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2009;66(17):2873-96.
316. Dobrovolskaia MA, Patri AK, Zheng J, Clogston JD, Ayub N, Aggarwal P, et al. Interaction of colloidal gold nanoparticles with human blood: effects on particle size and analysis of plasma protein binding profiles. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine*. 2009;5(2):106-17.
317. Liu Y, Jiao F, Qiu Y, Li W, Lao F, Zhou G, et al. The effect of Gd@C82(OH)22 nanoparticles on the release of Th1/Th2 cytokines and induction of TNF-alpha mediated cellular immunity. *Biomaterials*. 2009;30(23-24):3934-45.
318. Greulich C, Diendorf J, Simon T, Eggeler G, Epple M, Koller M. Uptake and intracellular distribution of silver nanoparticles in human mesenchymal stem cells. *Acta biomaterialia*. 2011;7(1):347-54.
319. Nishikawa T, Iwakiri N, Kaneko Y, Taguchi A, Fukushima K, Mori H, et al. Nitric oxide release in human aortic endothelial cells mediated by delivery of amphiphilic polysiloxane nanoparticles to caveolae. *Biomacromolecules*. 2009;10(8):2074-85.
320. Landgraf L, Muller I, Ernst P, Schafer M, Rosman C, Schick I, et al. Comparative evaluation of the impact on endothelial cells induced by different nanoparticle structures and functionalization. *Beilstein journal of nanotechnology*. 2015;6:300-12.
321. Dausend J, Musyanovych A, Dass M, Walther P, Schrezenmeier H, Landfester K, et al. Uptake mechanism of oppositely charged fluorescent nanoparticles in HeLa cells. *Macromolecular bioscience*. 2008;8(12):1135-43.
322. Mekki M. Caractérisation physico-chimique et évaluation toxicologique de fumées particulaires produites lors de tirs de petit calibre et de fumigènes : étude comparative: Normandie Université; 2017.

323. Stadtman ER. Role of oxidant species in aging. *Current medicinal chemistry*. 2004;11(9):1105-12.
324. BeruBe K, Balharry D, Sexton K, Koshy L, Jones T. Combustion-derived nanoparticles: mechanisms of pulmonary toxicity. *Clinical and experimental pharmacology & physiology*. 2007;34(10):1044-50.
325. Donaldson K, Stone V, Borm PJ, Jimenez LA, Gilmour PS, Schins RP, et al. Oxidative stress and calcium signaling in the adverse effects of environmental particles (PM10). *Free radical biology & medicine*. 2003;34(11):1369-82.
326. Pereira CE, Heck TG, Saldiva PH, Rhoden CR. Ambient particulate air pollution from vehicles promotes lipid peroxidation and inflammatory responses in rat lung. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas*. 2007;40(10):1353-9.
327. Kelley MA, Hebert VY, Thibeaux TM, Orchard MA, Hasan F, Cormier SA, et al. Model combustion-generated particulate matter containing persistent free radicals redox cycle to produce reactive oxygen species. *Chemical research in toxicology*. 2013;26(12):1862-71.
328. Bryan Hellack CN, Catrin Albrecht, Thomas A. J. Kuhlbusch, Sonja Boland, Armelle Baeza-Squiban, Wendel Wohllebenf and Roel P. F. Schinsb Analytical methods to assess the oxidative potential of nanoparticles: a review *Environmental Science: Nano*. 2017(10).
329. Rossner P, Jr., Topinka J, Hovorka J, Milcova A, Schmuczerova J, Krouzek J, et al. An acellular assay to assess the genotoxicity of complex mixtures of organic pollutants bound on size segregated aerosol. Part II: oxidative damage to DNA. *Toxicology letters*. 2010;198(3):312-6.
330. Chuang HC, Cheng YL, Lei YC, Chang HH, Cheng TJ. Protective effects of pulmonary epithelial lining fluid on oxidative stress and DNA single-strand breaks caused by ultrafine carbon black, ferrous sulphate and organic extract of diesel exhaust particles. *Toxicology and applied pharmacology*. 2013;266(3):329-34.
331. Nymark P, Jensen KA, Suhonen S, Kembouche Y, Vippola M, Kleinjans J, et al. Free radical scavenging and formation by multi-walled carbon nanotubes in cell free conditions and in human bronchial epithelial cells. *Particle and fibre toxicology*. 2014;11:4.
332. Knaapen AM, Borm PJ, Albrecht C, Schins RP. Inhaled particles and lung cancer. Part A: Mechanisms. *International journal of cancer*. 2004;109(6):799-809.
333. Dergham M, Lepers C, Verdin A, Billet S, Cazier F, Courcot D, et al. 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). *Chemical research in toxicology*. 2012;25(4):904-19.
334. Vattanasit U, Navasumrit P, Khadka MB, Kanitwithayanun J, Promvijit J, Autrup H, et al. Oxidative DNA damage and inflammatory responses in cultured human cells and in humans exposed to traffic-related particles. *International journal of hygiene and environmental health*. 2014;217(1):23-33.
335. Kermanizadeh A, Chauche C, Brown DM, Loft S, Moller P. The role of intracellular redox imbalance in nanomaterial induced cellular damage and genotoxicity: a review. *Environmental and molecular mutagenesis*. 2015;56(2):111-24.
336. Mazzoli-Rocha F, Fernandes S, Einicker-Lamas M, Zin WA. Roles of oxidative stress in signaling and inflammation induced by particulate matter. *Cell biology and toxicology*. 2010;26(5):481-98.
337. Brown DM, Wilson MR, MacNee W, Stone V, Donaldson K. Size-dependent proinflammatory effects of ultrafine polystyrene particles: a role for surface area and oxidative stress in the enhanced activity of ultrafines. *Toxicology and applied pharmacology*. 2001;175(3):191-9.

338. Dick CA, Singh P, Daniels M, Evansky P, Becker S, Gilmour MI. Murine pulmonary inflammatory responses following instillation of size-fractionated ambient particulate matter. *Journal of toxicology and environmental health Part A*. 2003;66(23):2193-207.
339. Schwarze PE, Ovrevik J, Hetland RB, Becher R, Cassee FR, Lag M, et al. Importance of size and composition of particles for effects on cells in vitro. *Inhalation toxicology*. 2007;19 Suppl 1:17-22.
340. Oberdorster G, Ferin J, Lehnert BE. Correlation between particle size, in vivo particle persistence, and lung injury. *Environmental health perspectives*. 1994;102 Suppl 5:173-9.
341. Sager TM, Kommineni C, Castranova V. Pulmonary response to intratracheal instillation of ultrafine versus fine titanium dioxide: role of particle surface area. *Particle and fibre toxicology*. 2008;5:17.
342. Donaldson K, Tran CL. Inflammation caused by particles and fibers. *Inhalation toxicology*. 2002;14(1):5-27.
343. Duffin R, Tran L, Brown D, Stone V, Donaldson K. Proinflammatory effects of low-toxicity and metal nanoparticles in vivo and in vitro: highlighting the role of particle surface area and surface reactivity. *Inhalation toxicology*. 2007;19(10):849-56.
344. Baeza-Squiban A, Bonvallot V, Boland S, Marano F. Airborne particles evoke an inflammatory response in human airway epithelium. Activation of transcription factors. *Cell biology and toxicology*. 1999;15(6):375-80.
345. Squadrito GL, Cueto R, Dellinger B, Pryor WA. Quinoid redox cycling as a mechanism for sustained free radical generation by inhaled airborne particulate matter. *Free radical biology & medicine*. 2001;31(9):1132-8.
346. Gurgueira SA, Lawrence J, Coull B, Murthy GG, Gonzalez-Flecha B. Rapid increases in the steady-state concentration of reactive oxygen species in the lungs and heart after particulate air pollution inhalation. *Environmental health perspectives*. 2002;110(8):749-55.
347. Dellinger B, Pryor WA, Cueto R, Squadrito GL, Hegde V, Deutsch WA. Role of free radicals in the toxicity of airborne fine particulate matter. *Chemical research in toxicology*. 2001;14(10):1371-7.
348. Fuentes-Mattei E, Rivera E, Gioda A, Sanchez-Rivera D, Roman-Velazquez FR, Jimenez-Velez BD. Use of human bronchial epithelial cells (BEAS-2B) to study immunological markers resulting from exposure to PM(2.5) organic extract from Puerto Rico. *Toxicology and applied pharmacology*. 2010;243(3):381-9.
349. Hiura TS, Kempiak SJ, Nel AE. Activation of the human RANTES gene promoter in a macrophage cell line by lipopolysaccharide is dependent on stress-activated protein kinases and the I κ B kinase cascade: implications for exacerbation of allergic inflammation by environmental pollutants. *Clinical immunology (Orlando, Fla)*. 1999;90(3):287-301.
350. Stone V, Johnston H, Clift MJ. Air pollution, ultrafine and nanoparticle toxicology: cellular and molecular interactions. *IEEE transactions on nanobioscience*. 2007;6(4):331-40.
351. Araujo JA, Barajas B, Kleinman M, Wang X, Bennett BJ, Gong KW, et al. Ambient particulate pollutants in the ultrafine range promote early atherosclerosis and systemic oxidative stress. *Circulation research*. 2008;102(5):589-96.
352. Li R, Ning Z, Cui J, Khalsa B, Ai L, Takabe W, et al. Ultrafine particles from diesel engines induce vascular oxidative stress via JNK activation. *Free radical biology & medicine*. 2009;46(6):775-82.
353. Mazzoli-Rocha F, Magalhaes CB, Malm O, Saldiva PH, Zin WA, Faffe DS. Comparative respiratory toxicity of particles produced by traffic and sugar cane burning. *Environmental research*. 2008;108(1):35-41.
354. Garza KM, Soto KF, Murr LE. Cytotoxicity and reactive oxygen species generation from aggregated carbon and carbonaceous nanoparticulate materials. *International journal of nanomedicine*. 2008;3(1):83-94.

355. Montiel-Davalos A, Ventura-Gallegos JL, Alfaro-Moreno E, Soria-Castro E, Garcia-Latorre E, Cabanas-Moreno JG, et al. TiO₂ nanoparticles induce dysfunction and activation of human endothelial cells. *Chemical research in toxicology*. 2012;25(4):920-30.
356. Corbalan JJ, Medina C, Jacoby A, Malinski T, Radomski MW. Amorphous silica nanoparticles trigger nitric oxide/peroxynitrite imbalance in human endothelial cells: inflammatory and cytotoxic effects. *International journal of nanomedicine*. 2011;6:2821-35.
357. Chuang KJ, Lee KY, Pan CH, Lai CH, Lin LY, Ho SC, et al. Effects of zinc oxide nanoparticles on human coronary artery endothelial cells. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*. 2016;93:138-44.
358. Lai CY, Lai CH, Chuang HC, Pan CH, Yen CC, Lin WY, et al. Physicochemistry and cardiovascular toxicity of metal fume PM_{2.5}: a study of human coronary artery endothelial cells and welding workers. *Scientific reports*. 2016;6:33515.
359. Du Y, Navab M, Shen M, Hill J, Pakbin P, Sioutas C, et al. Ambient ultrafine particles reduce endothelial nitric oxide production via S-glutathionylation of eNOS. *Biochemical and biophysical research communications*. 2013;436(3):462-6.
360. Nurkiewicz TR, Porter DW, Hubbs AF, Stone S, Chen BT, Frazer DG, et al. Pulmonary nanoparticle exposure disrupts systemic microvascular nitric oxide signaling. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*. 2009;110(1):191-203.
361. Ikeda M. Exposure to complex mixtures: implications for biological monitoring. *Toxicology letters*. 1995;77(1-3):85-91.
362. Vesterdal LK, Folkmann JK, Jacobsen NR, Sheykhzade M, Wallin H, Loft S, et al. Pulmonary exposure to carbon black nanoparticles and vascular effects. *Particle and fibre toxicology*. 2010;7:33.
363. Dianat M, Radmanesh E, Badavi M, Mard SA, Goudarzi G. Disturbance effects of PM₁₀ on iNOS and eNOS mRNA expression levels and antioxidant activity induced by ischemia-reperfusion injury in isolated rat heart: protective role of vanillic acid. *Environmental science and pollution research international*. 2016;23(6):5154-65.
364. Ramirez-Lee Manuel A, Martinez-Cuevas PP, Rosas-Hernandez H, Oros-Ovalle C, Bravo-Sanchez M, Martinez-Castanon GA, et al. Evaluation of vascular tone and cardiac contractility in response to silver nanoparticles, using Langendorff rat heart preparation. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine*. 2017;13(4):1507-18.
365. Vesterdal LK, Mikkelsen L, Folkmann JK, Sheykhzade M, Cao Y, Roursgaard M, et al. Carbon black nanoparticles and vascular dysfunction in cultured endothelial cells and artery segments. *Toxicology letters*. 2012;214(1):19-26.
366. Guo C, Xia Y, Niu P, Jiang L, Duan J, Yu Y, et al. Silica nanoparticles induce oxidative stress, inflammation, and endothelial dysfunction in vitro via activation of the MAPK/Nrf2 pathway and nuclear factor-kappaB signaling. *International journal of nanomedicine*. 2015;10:1463-77.
367. Knuckles TL, Lund AK, Lucas SN, Campen MJ. Diesel exhaust exposure enhances vasoconstriction via uncoupling of eNOS. *Toxicology and applied pharmacology*. 2008;230(3):346-51.
368. Nurkiewicz TR, Porter DW, Barger M, Castranova V, Boegehold MA. Particulate matter exposure impairs systemic microvascular endothelium-dependent dilation. *Environmental health perspectives*. 2004;112(13):1299-306.
369. Chen EY, Garnica M, Wang YC, Chen CS, Chin WC. Mucin secretion induced by titanium dioxide nanoparticles. *PloS one*. 2011;6(1):e16198.
370. Simon M, Barberet P, Delville MH, Moretto P, Sez nec H. Titanium dioxide nanoparticles induced intracellular calcium homeostasis modification in primary human

- keratinocytes. Towards an in vitro explanation of titanium dioxide nanoparticles toxicity. *Nanotoxicology*. 2011;5(2):125-39.
371. Stone V, Brown DM, Watt N, Wilson M, Donaldson K, Ritchie H, et al. Ultrafine Particle-Mediated Activation of Macrophages: Intracellular Calcium Signaling and Oxidative Stress. *Inhalation toxicology*. 2000;12 Suppl 3:345-51.
372. Geng H, Meng Z, Zhang Q. In vitro responses of rat alveolar macrophages to particle suspensions and water-soluble components of dust storm PM(2.5). *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*. 2006;20(5):575-84.
373. Neri T, Pergoli L, Petrini S, Gravendonk L, Balia C, Scalise V, et al. Particulate matter induces prothrombotic microparticle shedding by human mononuclear and endothelial cells. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*. 2016;32:333-8.
374. Li R, Kou X, Geng H, Xie J, Tian J, Cai Z, et al. Mitochondrial damage: an important mechanism of ambient PM2.5 exposure-induced acute heart injury in rats. *Journal of hazardous materials*. 2015;287:392-401.
375. Wold LE, Ying Z, Hutchinson KR, Velten M, Gorr MW, Velten C, et al. Cardiovascular remodeling in response to long-term exposure to fine particulate matter air pollution. *Circulation Heart failure*. 2012;5(4):452-61.
376. Guerrero-Beltran CE, Bernal-Ramirez J, Lozano O, Oropeza-Almazan Y, Castillo EC, Garza JR, et al. Silica nanoparticles induce cardiotoxicity interfering with energetic status and Ca(2+) handling in adult rat cardiomyocytes. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2017;312(4):H645-h61.
377. Brown DM, Donaldson K, Borm PJ, Schins RP, Dehnhardt M, Gilmour P, et al. Calcium and ROS-mediated activation of transcription factors and TNF-alpha cytokine gene expression in macrophages exposed to ultrafine particles. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2004;286(2):L344-53.
378. Dubes V, Parpaite T, Ducret T, Quignard JF, Mornet S, Reinhardt N, et al. Calcium signalling induced by in vitro exposure to silicium dioxide nanoparticles in rat pulmonary artery smooth muscle cells. *Toxicology*. 2017;375:37-47.
379. Zhang FL, Casey PJ. Protein prenylation: molecular mechanisms and functional consequences. *Annual review of biochemistry*. 1996;65:241-69.
380. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological reviews*. 2002;82(1):47-95.
381. Hidalgo C, Donoso P. Crosstalk between calcium and redox signaling: from molecular mechanisms to health implications. *Antioxidants & redox signaling*. 2008;10(7):1275-312.
382. Sahoo N, Hoshi T, Heinemann SH. Oxidative modulation of voltage-gated potassium channels. *Antioxidants & redox signaling*. 2014;21(6):933-52.
383. Kozai D, Sakaguchi R, Ohwada T, Mori Y. Deciphering Subtype-Selective Modulations in TRPA1 Biosensor Channels. *Current neuropharmacology*. 2015;13(2):266-78.
384. Hotamisligil GS. Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease. *Cell*. 2010;140(6):900-17.
385. Kaneto H, Matsuoka TA, Nakatani Y, Kawamori D, Miyatsuka T, Matsuhisa M, et al. Oxidative stress, ER stress, and the JNK pathway in type 2 diabetes. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*. 2005;83(6):429-39.
386. Lee H, Noh JY, Oh Y, Kim Y, Chang JW, Chung CW, et al. IRE1 plays an essential role in ER stress-mediated aggregation of mutant huntingtin via the inhibition of autophagy flux. *Human molecular genetics*. 2012;21(1):101-14.
387. Jakobsen CH, Storvold GL, Bremseth H, Follestad T, Sand K, Mack M, et al. DHA induces ER stress and growth arrest in human colon cancer cells: associations with cholesterol and calcium homeostasis. *Journal of lipid research*. 2008;49(10):2089-100.

388. Mendez R, Zheng Z, Fan Z, Rajagopalan S, Sun Q, Zhang K. Exposure to fine airborne particulate matter induces macrophage infiltration, unfolded protein response, and lipid deposition in white adipose tissue. *American journal of translational research*. 2013;5(2):224-34.
389. Liu Y, Chen YY, Cao JY, Tao FB, Zhu XX, Yao CJ, et al. Oxidative stress, apoptosis, and cell cycle arrest are induced in primary fetal alveolar type II epithelial cells exposed to fine particulate matter from cooking oil fumes. *Environmental science and pollution research international*. 2015;22(13):9728-41.
390. Zhou W, Tian D, He J, Zhang L, Tang X, Zhang L, et al. Exposure scenario: Another important factor determining the toxic effects of PM_{2.5} and possible mechanisms involved. *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)*. 2017;226:412-25.
391. Xu X, Qimuge A, Wang H, Xing C, Gu Y, Liu S, et al. IRE1 α /XBP1s branch of UPR links HIF1 α activation to mediate ANGII-dependent endothelial dysfunction under particulate matter (PM) 2.5 exposure. *Scientific reports*. 2017;7(1):13507.
392. Christen V, Fent K. Silica nanoparticles and silver-doped silica nanoparticles induce endoplasmic reticulum stress response and alter cytochrome P4501A activity. *Chemosphere*. 2012;87(4):423-34.
393. Chen R, Huo L, Shi X, Bai R, Zhang Z, Zhao Y, et al. Endoplasmic reticulum stress induced by zinc oxide nanoparticles is an earlier biomarker for nanotoxicological evaluation. *ACS nano*. 2014;8(3):2562-74.
394. Anspach L, Unger RE, Brochhausen C, Gibson MI, Klok HA, Kirkpatrick CJ, et al. Impact of polymer-modified gold nanoparticles on brain endothelial cells: exclusion of endoplasmic reticulum stress as a potential risk factor. *Nanotoxicology*. 2016;10(9):1341-50.
395. Simon M, Saez G, Muggiolu G, Lavenas M, Le Trequesser Q, Michelet C, et al. In situ quantification of diverse titanium dioxide nanoparticles unveils selective endoplasmic reticulum stress-dependent toxicity. *Nanotoxicology*. 2017;11(1):134-45.
396. Gu Y, Cheng S, Chen G, Shen Y, Li X, Jiang Q, et al. The effects of endoplasmic reticulum stress inducer thapsigargin on the toxicity of ZnO or TiO₂ nanoparticles to human endothelial cells. *Toxicology mechanisms and methods*. 2017;27(3):191-200.
397. Fujioka K, Hanada S, Inoue Y, Sato K, Hirakuri K, Shiraishi K, et al. Effects of silica and titanium oxide particles on a human neural stem cell line: morphology, mitochondrial activity, and gene expression of differentiation markers. *International journal of molecular sciences*. 2014;15(7):11742-59.
398. Li N, Sioutas C, Cho A, Schmitz D, Misra C, Sempf J, et al. Ultrafine particulate pollutants induce oxidative stress and mitochondrial damage. *Environmental health perspectives*. 2003;111(4):455-60.
399. Xia T, Kovochich M, Brant J, Hotze M, Sempf J, Oberley T, et al. Comparison of the abilities of ambient and manufactured nanoparticles to induce cellular toxicity according to an oxidative stress paradigm. *Nano letters*. 2006;6(8):1794-807.
400. Sun L, Li Y, Liu X, Jin M, Zhang L, Du Z, et al. Cytotoxicity and mitochondrial damage caused by silica nanoparticles. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*. 2011;25(8):1619-29.
401. Tseng CY, Chang JF, Wang JS, Chang YJ, Gordon MK, Chao MW. Protective Effects of N-Acetyl Cysteine against Diesel Exhaust Particles-Induced Intracellular ROS Generates Pro-Inflammatory Cytokines to Mediate the Vascular Permeability of Capillary-Like Endothelial Tubes. *PloS one*. 2015;10(7):e0131911.
402. Wang JS, Tseng CY, Chao MW. Diesel Exhaust Particles Contribute to Endothelial Apoptosis via Autophagy Pathway. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*. 2017;156(1):72-83.

403. Sanders K, Degn LL, Mundy WR, Zucker RM, Dreher K, Zhao B, et al. In vitro phototoxicity and hazard identification of nano-scale titanium dioxide. *Toxicology and applied pharmacology*. 2012;258(2):226-36.
404. Yang L, Wang Y, Lin Z, Zhou X, Chen T, He H, et al. Mitochondrial OGG1 protects against PM2.5-induced oxidative DNA damage in BEAS-2B cells. *Experimental and molecular pathology*. 2015;99(2):365-73.
405. Sharma V, Anderson D, Dhawan A. Zinc oxide nanoparticles induce oxidative DNA damage and ROS-triggered mitochondria mediated apoptosis in human liver cells (HepG2). *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*. 2012;17(8):852-70.
406. Siddiqui MA, Alhadlaq HA, Ahmad J, Al-Khedhairy AA, Musarrat J, Ahamed M. Copper oxide nanoparticles induced mitochondria mediated apoptosis in human hepatocarcinoma cells. *PloS one*. 2013;8(8):e69534.
407. Xin L, Wang J, Fan G, Che B, Wu Y, Guo S, et al. Oxidative stress and mitochondrial injury-mediated cytotoxicity induced by silver nanoparticles in human A549 and HepG2 cells. *Environmental toxicology*. 2016;31(12):1691-9.
408. Yu KN, Chang SH, Park SJ, Lim J, Lee J, Yoon TJ, et al. Titanium Dioxide Nanoparticles Induce Endoplasmic Reticulum Stress-Mediated Autophagic Cell Death via Mitochondria-Associated Endoplasmic Reticulum Membrane Disruption in Normal Lung Cells. *PloS one*. 2015;10(6):e0131208.
409. Zhang R, Piao MJ, Kim KC, Kim AD, Choi JY, Choi J, et al. Endoplasmic reticulum stress signaling is involved in silver nanoparticles-induced apoptosis. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2012;44(1):224-32.
410. Freyre-Fonseca V, Delgado-Buenrostro NL, Gutierrez-Cirlos EB, Calderon-Torres CM, Cabellos-Avelar T, Sanchez-Perez Y, et al. Titanium dioxide nanoparticles impair lung mitochondrial function. *Toxicology letters*. 2011;202(2):111-9.
411. Nayak D, Kumari M, Rajachandar S, Ashe S, Thathapudi NC, Nayak B. Biofilm Impeding AgNPs Target Skin Carcinoma by Inducing Mitochondrial Membrane Depolarization Mediated through ROS Production. *ACS applied materials & interfaces*. 2016;8(42):28538-53.
412. Guo C, Wang J, Jing L, Ma R, Liu X, Gao L, et al. Mitochondrial dysfunction, perturbations of mitochondrial dynamics and biogenesis involved in endothelial injury induced by silica nanoparticles. *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)*. 2018;236:926-36.
413. Lanone S, Rogerieux F, Geys J, Dupont A, Maillot-Marechal E, Boczkowski J, et al. Comparative toxicity of 24 manufactured nanoparticles in human alveolar epithelial and macrophage cell lines. *Particle and fibre toxicology*. 2009;6:14.
414. Andreau K, Leroux M, Bouharrou A. Health and cellular impacts of air pollutants: from cytoprotection to cytotoxicity. *Biochemistry research international*. 2012;2012:493894.
415. Donaldson K, Stone V. Current hypotheses on the mechanisms of toxicity of ultrafine particles. *Annali dell'Istituto superiore di sanita*. 2003;39(3):405-10.
416. Donaldson K, Tran L, Jimenez LA, Duffin R, Newby DE, Mills N, et al. Combustion-derived nanoparticles: a review of their toxicology following inhalation exposure. *Particle and fibre toxicology*. 2005;2:10.
417. Szmítko PE, Wang CH, Weisel RD, Jeffries GA, Anderson TJ, Verma S. Biomarkers of vascular disease linking inflammation to endothelial activation: Part II. *Circulation*. 2003;108(17):2041-8.
418. Zhang WC, Wang YG, Zhu ZF, Wu FQ, Peng YD, Chen ZY, et al. Regulatory T cells protect fine particulate matter-induced inflammatory responses in human umbilical vein endothelial cells. *Mediators of inflammation*. 2014;2014:869148.

419. Schwarze PE, Totlandsdal AI, Lag M, Refsnes M, Holme JA, Ovrevik J. Inflammation-related effects of diesel engine exhaust particles: studies on lung cells in vitro. *BioMed research international*. 2013;2013:685142.
420. Kelly FJ, Fussell JC. Linking ambient particulate matter pollution effects with oxidative biology and immune responses. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2015;1340:84-94.
421. Galkina E, Ley K. Vascular adhesion molecules in atherosclerosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2007;27(11):2292-301.
422. Mestas J, Ley K. Monocyte-endothelial cell interactions in the development of atherosclerosis. *Trends in cardiovascular medicine*. 2008;18(6):228-32.
423. Montiel-Davalos A, Ibarra-Sanchez Mde J, Ventura-Gallegos JL, Alfaro-Moreno E, Lopez-Marure R. Oxidative stress and apoptosis are induced in human endothelial cells exposed to urban particulate matter. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*. 2010;24(1):135-41.
424. Napierska D, Thomassen LC, Vanaudenaerde B, Luyts K, Lison D, Martens JA, et al. Cytokine production by co-cultures exposed to monodisperse amorphous silica nanoparticles: the role of size and surface area. *Toxicology letters*. 2012;211(2):98-104.
425. Alinovi R, Goldoni M, Pinelli S, Campanini M, Aliatis I, Bersani D, et al. Oxidative and pro-inflammatory effects of cobalt and titanium oxide nanoparticles on aortic and venous endothelial cells. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*. 2015;29(3):426-37.
426. Hetland RB, Cassee FR, Refsnes M, Schwarze PE, Lag M, Boere AJ, et al. Release of inflammatory cytokines, cell toxicity and apoptosis in epithelial lung cells after exposure to ambient air particles of different size fractions. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*. 2004;18(2):203-12.
427. Oberdorster G. Pulmonary effects of inhaled ultrafine particles. *International archives of occupational and environmental health*. 2001;74(1):1-8.
428. Neophytou AM, Hart JE, Cavallari JM, Smith TJ, Dockery DW, Coull BA, et al. Traffic-related exposures and biomarkers of systemic inflammation, endothelial activation and oxidative stress: a panel study in the US trucking industry. *Environmental health : a global access science source*. 2013;12:105.
429. Lawal A, Zhang M, Dittmar M, Lulla A, Araujo JA. Heme oxygenase-1 protects endothelial cells from the toxicity of air pollutant chemicals. *Toxicology and applied pharmacology*. 2015;284(3):281-91.
430. Smith KR, Veranth JM, Hu AA, Lighty JS, Aust AE. Interleukin-8 levels in human lung epithelial cells are increased in response to coal fly ash and vary with the bioavailability of iron, as a function of particle size and source of coal. *Chemical research in toxicology*. 2000;13(2):118-25.
431. Ghio AJ, Kim C, Devlin RB. Concentrated ambient air particles induce mild pulmonary inflammation in healthy human volunteers. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2000;162(3 Pt 1):981-8.
432. Totlandsdal AI, Lag M, Lilleaas E, Cassee F, Schwarze P. Differential proinflammatory responses induced by diesel exhaust particles with contrasting PAH and metal content. *Environmental toxicology*. 2015;30(2):188-96.
433. Becker S, Mundandhara S, Devlin RB, Madden M. Regulation of cytokine production in human alveolar macrophages and airway epithelial cells in response to ambient air pollution particles: further mechanistic studies. *Toxicology and applied pharmacology*. 2005;207(2 Suppl):269-75.

434. Behbod B, Urch B, Speck M, Scott JA, Liu L, Poon R, et al. Endotoxin in concentrated coarse and fine ambient particles induces acute systemic inflammation in controlled human exposures. *Occupational and environmental medicine*. 2013;70(11):761-7.
435. Val S, Hussain S, Boland S, Hamel R, Baeza-Squiban A, Marano F. Carbon black and titanium dioxide nanoparticles induce pro-inflammatory responses in bronchial epithelial cells: need for multiparametric evaluation due to adsorption artifacts. *Inhalation toxicology*. 2009;21 Suppl 1:115-22.
436. Hussain S, Boland S, Baeza-Squiban A, Hamel R, Thomassen LC, Martens JA, et al. Oxidative stress and proinflammatory effects of carbon black and titanium dioxide nanoparticles: role of particle surface area and internalized amount. *Toxicology*. 2009;260(1-3):142-9.
437. Auger F, Gendron MC, Chamot C, Marano F, Dazy AC. Responses of well-differentiated nasal epithelial cells exposed to particles: role of the epithelium in airway inflammation. *Toxicology and applied pharmacology*. 2006;215(3):285-94.
438. Veranth JM, Cutler NS, Kaser EG, Reilly CA, Yost GS. Effects of cell type and culture media on Interleukin-6 secretion in response to environmental particles. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*. 2008;22(2):498-509.
439. Takizawa H, Ohtoshi T, Kawasaki S, Abe S, Sugawara I, Nakahara K, et al. Diesel exhaust particles activate human bronchial epithelial cells to express inflammatory mediators in the airways: a review. *Respirology (Carlton, Vic)*. 2000;5(2):197-203.
440. Bonvallot V, Baeza-Squiban A, Baulig A, Brulant S, Boland S, Muzeau F, et al. Organic compounds from diesel exhaust particles elicit a proinflammatory response in human airway epithelial cells and induce cytochrome p450 1A1 expression. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2001;25(4):515-21.
441. Upadhyay S, Stoeger T, George L, Schladweiler MC, Kodavanti U, Ganguly K, et al. Ultrafine carbon particle mediated cardiovascular impairment of aged spontaneously hypertensive rats. *Particle and fibre toxicology*. 2014;11:36.
442. Tamagawa E, Bai N, Morimoto K, Gray C, Mui T, Yatera K, et al. Particulate matter exposure induces persistent lung inflammation and endothelial dysfunction. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2008;295(1):L79-85.
443. Totlandsdal AI, Refsnes M, Skomedal T, Osnes JB, Schwarze PE, Lag M. Particle-induced cytokine responses in cardiac cell cultures--the effect of particles versus soluble mediators released by particle-exposed lung cells. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*. 2008;106(1):233-41.
444. Sisler JD, Pirela SV, Friend S, Farcas M, Schwegler-Berry D, Shvedova A, et al. Small airway epithelial cells exposure to printer-emitted engineered nanoparticles induces cellular effects on human microvascular endothelial cells in an alveolar-capillary co-culture model. *Nanotoxicology*. 2015;9(6):769-79.
445. Bengalli R, Longhin E, Marchetti S, Proverbio MC, Battaglia C, Camatini M. The role of IL-6 released from pulmonary epithelial cells in diesel UFP-induced endothelial activation. *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)*. 2017;231(Pt 2):1314-21.
446. Alfaro-Moreno E, Nawrot TS, Vanaudenaerde BM, Hoylaerts MF, Vanoirbeek JA, Nemery B, et al. Co-cultures of multiple cell types mimic pulmonary cell communication in response to urban PM10. *The European respiratory journal*. 2008;32(5):1184-94.
447. Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2008;9(3):231-41.
448. Choy JC, Granville DJ, Hunt DW, McManus BM. Endothelial cell apoptosis: biochemical characteristics and potential implications for atherosclerosis. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2001;33(9):1673-90.

449. Haddad JJ. Redox and oxidant-mediated regulation of apoptosis signaling pathways: immuno-pharmaco-redox conception of oxidative siege versus cell death commitment. *International immunopharmacology*. 2004;4(4):475-93.
450. Orrenius S. Reactive oxygen species in mitochondria-mediated cell death. *Drug metabolism reviews*. 2007;39(2-3):443-55.
451. Lavrik I, Golks A, Kramer PH. Death receptor signaling. *Journal of cell science*. 2005;118(Pt 2):265-7.
452. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*. 2007;35(4):495-516.
453. Huttemann M, Helling S, Sanderson TH, Sinkler C, Samavati L, Mahapatra G, et al. Regulation of mitochondrial respiration and apoptosis through cell signaling: cytochrome c oxidase and cytochrome c in ischemia/reperfusion injury and inflammation. *Biochimica et biophysica acta*. 2012;1817(4):598-609.
454. Youle RJ, Strasser A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2008;9(1):47-59.
455. Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiological reviews*. 2007;87(1):99-163.
456. Brentnall M, Rodriguez-Menocal L, De Guevara RL, Cepero E, Boise LH. Caspase-9, caspase-3 and caspase-7 have distinct roles during intrinsic apoptosis. *BMC cell biology*. 2013;14:32.
457. Gottlieb TM, Leal JF, Seger R, Taya Y, Oren M. Cross-talk between Akt, p53 and Mdm2: possible implications for the regulation of apoptosis. *Oncogene*. 2002;21(8):1299-303.
458. Mohammadinejad R, Moosavi MA, Tavakol S, Vardar DO, Hosseini A, Rahmati M, et al. Necrotic, apoptotic and autophagic cell fates triggered by nanoparticles. *Autophagy*. 2018:1-30.
459. Pavagadhi S, Betha R, Venkatesan S, Balasubramanian R, Hande MP. Physicochemical and toxicological characteristics of urban aerosols during a recent Indonesian biomass burning episode. *Environmental science and pollution research international*. 2013;20(4):2569-78.
460. Sanchez-Perez Y, Chirino YI, Osornio-Vargas AR, Herrera LA, Morales-Barcenas R, Lopez-Saavedra A, et al. Cytoplasmic p21(CIP1/WAF1), ERK1/2 activation, and cytoskeletal remodeling are associated with the senescence-like phenotype after airborne particulate matter (PM(10)) exposure in lung cells. *Toxicology letters*. 2014;225(1):12-9.
461. Reyes-Zarate E, Sanchez-Perez Y, Gutierrez-Ruiz MC, Chirino YI, Osornio-Vargas AR, Morales-Barcenas R, et al. Atmospheric particulate matter (PM10) exposure-induced cell cycle arrest and apoptosis evasion through STAT3 activation via PKCzeta and Src kinases in lung cells. *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)*. 2016;214:646-56.
462. Abbas I, Garcon G, Saint-Georges F, Billet S, Verdin A, Gosset P, et al. Occurrence of molecular abnormalities of cell cycle in L132 cells after in vitro short-term exposure to air pollution PM(2.5). *Chemico-biological interactions*. 2010;188(3):558-65.
463. Andrysik Z, Vondracek J, Marvanova S, Ciganek M, Neca J, Pencikova K, et al. Activation of the aryl hydrocarbon receptor is the major toxic mode of action of an organic extract of a reference urban dust particulate matter mixture: the role of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mutation research*. 2011;714(1-2):53-62.
464. Soberanes S, Urich D, Baker CM, Burgess Z, Chiarella SE, Bell EL, et al. Mitochondrial complex III-generated oxidants activate ASK1 and JNK to induce alveolar epithelial cell death following exposure to particulate matter air pollution. *The Journal of biological chemistry*. 2009;284(4):2176-86.

465. Shi Y, Wang F, He J, Yadav S, Wang H. Titanium dioxide nanoparticles cause apoptosis in BEAS-2B cells through the caspase 8/t-Bid-independent mitochondrial pathway. *Toxicology letters*. 2010;196(1):21-7.
466. Chin BY, Choi ME, Burdick MD, Strieter RM, Risby TH, Choi AM. Induction of apoptosis by particulate matter: role of TNF-alpha and MAPK. *The American journal of physiology*. 1998;275(5 Pt 1):L942-9.
467. Deng X, Zhang F, Wang L, Rui W, Long F, Zhao Y, et al. Airborne fine particulate matter induces multiple cell death pathways in human lung epithelial cells. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*. 2014;19(7):1099-112.
468. Dagher Z, Garcon G, Billet S, Gosset P, Ledoux F, Courcot D, et al. Activation of different pathways of apoptosis by air pollution particulate matter (PM2.5) in human epithelial lung cells (L132) in culture. *Toxicology*. 2006;225(1):12-24.
469. Liang S, Sun K, Wang Y, Dong S, Wang C, Liu L, et al. Role of Cyt-C/caspases-9,3, Bax/Bcl-2 and the FAS death receptor pathway in apoptosis induced by zinc oxide nanoparticles in human aortic endothelial cells and the protective effect by alpha-lipoic acid. *Chemico-biological interactions*. 2016;258:40-51.
470. Agopyan N, Head J, Yu S, Simon SA. TRPV1 receptors mediate particulate matter-induced apoptosis. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2004;286(3):L563-72.
471. Franco R, Sanchez-Olea R, Reyes-Reyes EM, Panayiotidis MI. Environmental toxicity, oxidative stress and apoptosis: menage a trois. *Mutation research*. 2009;674(1-2):3-22.
472. Turner J, Hernandez M, Snawder JE, Handorean A, McCabe KM. A toxicology suite adapted for comparing parallel toxicity responses of model human lung cells to diesel exhaust particles and their extracts. *Aerosol science and technology : the journal of the American Association for Aerosol Research*. 2015;49(8):599-610.
473. Peixoto MS, de Oliveira Galvao MF, Batistuzzo de Medeiros SR. Cell death pathways of particulate matter toxicity. *Chemosphere*. 2017;188:32-48.
474. Sciare J, D'Argouges O, Sarda-Esteve R, Gaimoz C, Dolgorouky C, Bonnaire N, et al. Large contribution of water-insoluble secondary organic aerosols in the region of Paris (France) during wintertime. *J Geophys Res*. 2011;116(D22 (Nov 17):D22203.
475. Yttri KE, Lund Myhre C, Eckhardt S, Fiebig M, Dye C, Hirdman D, et al. Quantifying black carbon from biomass burning by means of levoglucosan – a one-year time series at the Arctic observatory Zeppelin. *Atmos Chem Phys*. 2014;14(12):6427-42.
476. Panteliadis P, Hafkenscheid T, Cary B, Diapouli E, Fischer A, Favez O, et al. ECOC comparison exercise with identical thermal protocols after temperature offset correction – instrument diagnostics by in-depth evaluation of operational parameters. *Atmos Meas Tech*. 2015;8(2):779-92.
477. Janssen NA, Yang A, Strak M, Steenhof M, Hellack B, Gerlofs-Nijland ME, et al. Oxidative potential of particulate matter collected at sites with different source characteristics. *The Science of the total environment*. 2014;472:572-81.
478. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*. 1983;65(1-2):55-63.
479. Chen X, Zhong Z, Xu Z, Chen L, Wang Y. 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein as a fluorescent probe for reactive oxygen species measurement: Forty years of application and controversy. *Free radical research*. 2010;44(6):587-604.
480. Dikalov S, Griendling KK, Harrison DG. Measurement of reactive oxygen species in cardiovascular studies. *Hypertension (Dallas, Tex : 1979)*. 2007;49(4):717-27.

481. Deschacht M, Horemans T, Martinet W, Bult H, Maes L, Cos P. Comparative EPR study of different macrophage types stimulated for superoxide and nitric oxide production. *Free radical research*. 2010;44(7):763-72.
482. Wang H, Joseph JA. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free radical biology & medicine*. 1999;27(5-6):612-6.
483. Forchhammer L, Loft S, Roursgaard M, Cao Y, Riddervold IS, Sigsgaard T, et al. Expression of adhesion molecules, monocyte interactions and oxidative stress in human endothelial cells exposed to wood smoke and diesel exhaust particulate matter. *Toxicology letters*. 2012;209(2):121-8.
484. Chin LK, Yu JQ, Fu Y, Yu T, Liu AQ, Luo KQ. Production of reactive oxygen species in endothelial cells under different pulsatile shear stresses and glucose concentrations. *Lab on a chip*. 2011;11(11):1856-63.
485. Johnson-Cadwell LI, Jekabsons MB, Wang A, Polster BM, Nicholls DG. 'Mild Uncoupling' does not decrease mitochondrial superoxide levels in cultured cerebellar granule neurons but decreases spare respiratory capacity and increases toxicity to glutamate and oxidative stress. *Journal of neurochemistry*. 2007;101(6):1619-31.
486. Ahmed KA, Sawa T, Ihara H, Kasamatsu S, Yoshitake J, Rahaman MM, et al. Regulation by mitochondrial superoxide and NADPH oxidase of cellular formation of nitrated cyclic GMP: potential implications for ROS signalling. *The Biochemical journal*. 2012;441(2):719-30.
487. Bkaily G, Al-Khoury J, Simon Y, Jacques D. Intracellular Free Calcium Measurement Using Confocal Imaging. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)*. 2017;1527:177-87.
488. Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *The Journal of biological chemistry*. 1985;260(6):3440-50.
489. Navarro-Dorado J, Garcia-Alonso M, van Breemen C, Tejerina T, Fameli N. Calcium oscillations in human mesenteric vascular smooth muscle. *Biochemical and biophysical research communications*. 2014;445(1):84-8.
490. Hajnoczky G, Robb-Gaspers LD, Seitz MB, Thomas AP. Decoding of cytosolic calcium oscillations in the mitochondria. *Cell*. 1995;82(3):415-24.
491. Tauskela JS, Comas T, Hewitt K, Monette R, Paris J, Hogan M, et al. Cross-tolerance to otherwise lethal N-methyl-D-aspartate and oxygen-glucose deprivation in preconditioned cortical cultures. *Neuroscience*. 2001;107(4):571-84.
492. Scaduto RC, Jr., Grotyohann LW. Measurement of mitochondrial membrane potential using fluorescent rhodamine derivatives. *Biophysical journal*. 1999;76(1 Pt 1):469-77.
493. Li N, Sul JY, Haydon PG. A calcium-induced calcium influx factor, nitric oxide, modulates the refilling of calcium stores in astrocytes. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2003;23(32):10302-10.
494. Calderon-Garciduenas L, Mora-Tiscareno A, Fordham LA, Chung CJ, Garcia R, Osnaya N, et al. Canines as sentinel species for assessing chronic exposures to air pollutants: part I. Respiratory pathology. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*. 2001;61(2):342-55.
495. Kreyling WG, Semmler M, Erbe F, Mayer P, Takenaka S, Schulz H, et al. Translocation of ultrafine insoluble iridium particles from lung epithelium to extrapulmonary organs is size dependent but very low. *Journal of toxicology and environmental health Part A*. 2002;65(20):1513-30.
496. Mahne S, Chuang GC, Pankey E, Kiruri L, Kadowitz PJ, Dellinger B, et al. Environmentally persistent free radicals decrease cardiac function and increase pulmonary artery pressure. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2012;303(9):H1135-42.

497. Morishita M, Bard RL, Wang L, Das R, Dvonch JT, Spino C, et al. The characteristics of coarse particulate matter air pollution associated with alterations in blood pressure and heart rate during controlled exposures. *Journal of exposure science & environmental epidemiology*. 2015;25(2):153-9.
498. Touyz RM, Schiffrin EL. Reactive oxygen species in vascular biology: implications in hypertension. *Histochemistry and cell biology*. 2004;122(4):339-52.
499. Guibert C, Marthan R, Savineau JP. Modulation of ion channels in pulmonary arterial hypertension. *Current pharmaceutical design*. 2007;13(24):2443-55.
500. Lai N, Lu W, Wang J. Ca²⁺ and ion channels in hypoxia-mediated pulmonary hypertension. *International journal of clinical and experimental pathology*. 2015;8(2):1081-92.
501. Cao Y, Roursgaard M, Danielsen PH, Moller P, Loft S. Carbon black nanoparticles promote endothelial activation and lipid accumulation in macrophages independently of intracellular ROS production. *PloS one*. 2014;9(9):e106711.
502. Brown DM, Dickson C, Duncan P, Al-Attili F, Stone V. Interaction between nanoparticles and cytokine proteins: impact on protein and particle functionality. *Nanotechnology*. 2010;21(21):215104.
503. Quintero M, Colombo SL, Godfrey A, Moncada S. Mitochondria as signaling organelles in the vascular endothelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103(14):5379-84.
504. Yu Q, Chan SY. Mitochondrial and Metabolic Drivers of Pulmonary Vascular Endothelial Dysfunction in Pulmonary Hypertension. *Advances in experimental medicine and biology*. 2017;967:373-83.
505. Ke S, Zhou T, Yang P, Wang Y, Zhang P, Chen K, et al. Gold nanoparticles enhance TRAIL sensitivity through Drp1-mediated apoptotic and autophagic mitochondrial fission in NSCLC cells. *International journal of nanomedicine*. 2017;12:2531-51.
506. Shen Y, Wu L, Qin D, Xia Y, Zhou Z, Zhang X, et al. Carbon black suppresses the osteogenesis of mesenchymal stem cells: the role of mitochondria. *Particle and fibre toxicology*. 2018;15(1):16.
507. Izikki M, Guignabert C, Fadel E, Humbert M, Tu L, Zadigue P, et al. Endothelial-derived FGF2 contributes to the progression of pulmonary hypertension in humans and rodents. *The Journal of clinical investigation*. 2009;119(3):512-23.
508. Anwar MA, Shalhoub J, Lim CS, Gohel MS, Davies AH. The effect of pressure-induced mechanical stretch on vascular wall differential gene expression. *Journal of vascular research*. 2012;49(6):463-78.
509. Welsh DJ, Peacock AJ. Cellular responses to hypoxia in the pulmonary circulation. *High altitude medicine & biology*. 2013;14(2):111-6.
510. Shamsuzzaman AS, Gersh BJ, Somers VK. Obstructive sleep apnea: implications for cardiac and vascular disease. *Jama*. 2003;290(14):1906-14.
511. Allahdadi KJ, Walker BR, Kanagy NL. Augmented endothelin vasoconstriction in intermittent hypoxia-induced hypertension. *Hypertension (Dallas, Tex : 1979)*. 2005;45(4):705-9.
512. Freese C, Schreiner D, Anspach L, Bantz C, Maskos M, Unger RE, et al. In vitro investigation of silica nanoparticle uptake into human endothelial cells under physiological cyclic stretch. *Particle and fibre toxicology*. 2014;11:68.
513. Gilbert G, Courtois A, Dubois M, Cussac LA, Ducret T, Lory P, et al. T-type voltage gated calcium channels are involved in endothelium-dependent relaxation of mice pulmonary artery. *Biochemical pharmacology*. 2017;138:61-72.

514. Xu L, Chen Y, Yang K, Wang Y, Tian L, Zhang J, et al. Chronic hypoxia increases TRPC6 expression and basal intracellular Ca²⁺ concentration in rat distal pulmonary venous smooth muscle. *PloS one*. 2014;9(11):e112007.
515. Vishnu N, Jadoon Khan M, Karsten F, Groschner LN, Waldeck-Weiermair M, Rost R, et al. ATP increases within the lumen of the endoplasmic reticulum upon intracellular Ca²⁺ release. *Molecular biology of the cell*. 2014;25(3):368-79.
516. McGuinnes C, Duffin R, Brown S, N LM, Megson IL, Macnee W, et al. Surface derivatization state of polystyrene latex nanoparticles determines both their potency and their mechanism of causing human platelet aggregation in vitro. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*. 2011;119(2):359-68.

Effets de la pollution atmosphérique particulaire sur la circulation pulmonaire: rôles du stress oxydant et de la signalisation calcique

L'exposition humaine aux particules atmosphérique (PM) est une préoccupation majeure de santé publique. La pollution particulaire est constituée de particules grossières (PM₁₀ diamètre < 10 µm), de particules fines (PM_{2.5} diamètre < 2.5 µm) et de nanoparticules (PM_{0.1} ou NPs diamètre < 100 nm). L'excès de mortalité constaté par les études épidémiologiques est principalement associé aux pathologies respiratoires et cardiovasculaires. Après inhalation, les particules les plus fines (PM_{2.5} et NPs) pénètrent profondément dans les voies respiratoires jusqu'aux alvéoles pulmonaires. Des études ont montré qu'elles peuvent franchir la barrière alvéolo-capillaire pour se retrouver dans la circulation systémique et y exercer leurs effets délétères sur les organes cibles tel que le système cardiovasculaire. La circulation pulmonaire constitue donc une cible privilégiée des particules inhalées, particulièrement les cellules endothéliales qui tapissent la lumière des vaisseaux. L'hypertension pulmonaire (HTP) est une pathologie de la circulation pulmonaire caractérisée par un remodelage des vaisseaux pulmonaires, une hyperréactivité et une inflammation. Des études récentes ont montré le rôle prépondérant du calcium et du stress oxydant dans la physiopathologie de cette maladie. Cependant, peu d'études mécanistiques visent à expliquer les effets des PM sur les cellules cibles vasculaires pulmonaires. Dans ce contexte, ce travail vise à mieux caractériser les effets cellulaires et moléculaires des particules sur les cellules endothéliales d'artères pulmonaires humaines (HPAEC).

L'impact des PM_{2.5} et des NPs noires de carbone (FW2) sur les cellules endothéliales d'artères pulmonaires humaines entraîne des dérégulations de l'homéostasie cellulaire. En effet, nos résultats montrent une augmentation significative du stress oxydant et, notamment, de la production d'anion superoxyde cytoplasmique et mitochondrial, des perturbations de la signalisation calcique, des dommages mitochondriaux, ainsi qu'un déséquilibre de la sécrétion de facteurs vasoactifs tels que le monoxyde d'azote (NO). Nous avons, également, étudié sur ces cellules cibles vasculaires pulmonaires humaines, dans des conditions physiologique et pathologique mimant l'HTP, les effets des particules sur la signalisation calcique ainsi que le rôle du stress oxydant dans les effets observés. Nous avons, dans un premier temps, développé et validé un modèle *in vitro* qui mime la dynamique vasculaire observée dans l'HTP. Dans une deuxième étape, nous avons observé les effets des NPs FW2, dans les deux conditions expérimentales. Nos résultats montrent, dans les cellules placées en conditions pathologiques, une augmentation significative de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) ainsi qu'une augmentation significative de la réponse pro-inflammatoire caractérisée par la sécrétion d'interleukines telles que l'IL-6 par rapport aux cellules placées en condition physiologique. De plus, la signalisation calcique semble également altérée dans les conditions pathologiques.

En conclusion, l'exposition humaine aux particules atmosphériques pourrait être un facteur de risque dans l'aggravation de pathologies cardiovasculaires telles que l'HTP.

Mots clés : pollution atmosphérique, PM_{2.5}, nanoparticules noires de carbone, stress oxydant, signalisation calcique, cellules endothéliales d'artères pulmonaires humaines, hypertension pulmonaire.