



HAL
open science

Étude des mécanismes de régulation de la mort cellulaire apoptotique par les particules atmosphériques et leurs composés métalliques.

Mélanie Lovera-Leroux

► To cite this version:

Mélanie Lovera-Leroux. Étude des mécanismes de régulation de la mort cellulaire apoptotique par les particules atmosphériques et leurs composés métalliques.. Toxicologie. Université Paris 7 Diderot, 2014. Français. NNT: . tel-03187471

HAL Id: tel-03187471

<https://theses.hal.science/tel-03187471>

Submitted on 1 Apr 2021

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.



ANNÉE 2014

THÈSE

Pour l'obtention du Grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS.DIDEROT (Paris 7) SORBONNE PARIS CITE
Spécialité : Toxicologie

Ecole Doctorale 436 Médicament Toxicologie Chimie Environnement

Mélanie LOVERA-LEROUX

Etude des mécanismes de régulation de la mort cellulaire apoptotique
par les particules atmosphériques et leurs composés métalliques.

Soutenue le 31 mars 2014

Laboratoire « Réponses Moléculaires et Cellulaires aux Xénobiotiques »
Unité de Biologie Fonctionnelle et Adaptative
CNRS UMR 8251

Composition du jury :

Pr Guillaume GARÇON

Professeur, Université de Lille 2

Rapporteur

Dr Christophe LEMAIRE

MCU HDR, Université de Versailles Saint-Quentin

Rapporteur

Dr Laurent ALLEMAN

Maître-Assistant, Ecole Mines de Douai

Examineur

Dr Dominique LAGADIC-GOSSMANN

DR2 CNRS, Université de Rennes 1

Examinatrice

Pr Armelle BAEZA-SQUIBAN

Professeur, Université de Paris Diderot

Présidente

Dr Karine ANDRÉAU

MCU HDR, Université de Paris Diderot

Directrice de thèse

Remerciements

Les travaux de cette thèse ont été réalisés au sein du laboratoire des « Réponses Moléculaires et Cellulaires aux Xénobiotiques » de l'unité de Biologie Fonctionnelle et Adaptative. Elle a été financée par une bourse du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche de l'Ecole Doctorale « Médicament, Toxicologie, Chimie, Environnement » et en partie par l'Agence Nationale de la Recherche dans le cadre du projet MEGATOX.

J'exprime ma profonde reconnaissance aux Professeurs Francelyne Marano et Jean-Marie Dupret pour m'avoir accueillie dans leur laboratoire.

Avant toute chose, je tiens à adresser ma gratitude et mes sincères remerciements au Docteur Karine Andréau pour m'avoir encadré depuis mon Master 2 et m'avoir permis de mener à bien mon projet de thèse. Elle a su me donner confiance en moi et me transmettre sa passion pour la recherche et la rigueur scientifique qu'elle nécessite. Je la remercie surtout du soutien qu'elle m'a apporté aussi bien sur le plan professionnel que personnel et la patience dont elle a fait preuve.

Je remercie également le Professeur Armelle Baeza-Squiban pour sa confiance, son soutien et ses conseils précieux, surtout en cette fin de thèse, et qui me fait l'honneur de présider ce jury.

Je remercie tous les membres du Jury : le Professeur Guillaume Garçon et le Docteur Christophe Lemaire de me faire l'honneur d'être les rapporteurs de ma thèse ainsi que les Docteurs Laurent Alleman et Dominique Lagadic-Gossmann.

J'adresse des remerciements particuliers à Belinda Crobeddu (avec un seul « b » n'est-ce pas ?) qui a été ma stagiaire depuis son stage de Licence 3 et qui est aujourd'hui devenue Ingénieure avec fierté. Je la remercie de m'avoir aidé dans mes expériences et d'avoir égayé nos salles de travail de son grain de folie avec Mathilde Delaval, Audrey Ridoux, et depuis peu Leticia Santiago (et m'avoir permis d'en faire autant !), sans oublier les Docteurs Ioana Ferecatu et Aïda Bouharrou qui m'ont aidée, soutenue et transmis leur passion pour la recherche. Je les remercie aussi de m'avoir écouté et soutenue dans les moments difficiles, j'espère garder ces liens d'amitié qui se sont créés.

A toutes les personnes du laboratoire aussi bien celles qui sont parties que celles encore présentes: Sonja Boland, Florent Busi, Julien Dairou, Fernando Rodrigues-Lima merci pour votre aide scientifique et technique ; Rina Guanagnini, Sandra Vranic, Angélique Cocaign, Laura Boubliil, Isabelle George, Cécile Mathieu, Romain Duval, Linh-Chi Buy, Ximing Xu, Amine Manaa, merci pour votre aide scientifique et technique ainsi que les petits goûters partagés ; Emile Petit, Roseline Nila, Olja Kascanski et Françoise Contamina merci pour votre aide, votre gentillesse et nos discussions culturelles, scientifiques et amicales.

Je tiens également à remercier les personnes qui m'ont formée : Violaine Simon pour m'avoir initiée à la Flexstation, Nicole Boggetto et Blandine Gausserès pour m'avoir formé à l'utilisation de la cytométrie en flux et Nadim Kassis pour m'avoir transmis son savoir sur la réalisation et l'interprétation des RT-qPCR. Enfin, je remercie les partenaires du projet MEGATOX: Laurent Martinon, Jean Sciare, Isabelle Baudrimont...

Enfin, je remercie ma famille et mes amis (en particulier Jeni et Alix) de m'avoir soutenue et motivée dans les moments difficiles et d'avoir eu confiance en moi.

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

Marie Curie

« Tout obstacle renforce la détermination. Celui qui s'est fixé un but n'en change pas. »

Léonard De Vinci

A mes parents, Philippe et Catarina, qui ont fait de moi ce que je suis aujourd'hui, qui m'ont appris à toujours donner le meilleur de soi-même et qui m'ont appris cette devise « **quand on veut, on peut** » qui m'a accompagnée dans tous mes projets.

A mon frère Adrien de qui je suis fière et qui m'a apporté un grand soutien.

A mon mari Ange, aujourd'hui lié à moi pour la vie, et à **notre fille** Lucia, des petits bonheurs et du soutien au quotidien.

Aujourd'hui cette thèse vous est dédiée car c'est grâce à vous que j'ai pu en arriver là.

Mel, Ninie, Nam'Z

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS	I
SOMMAIRE	V
VALORISATIONS SCIENTIFIQUES.....	VIII
ABREVIATIONS.....	X
LISTE DES FIGURES.....	XII
LISTE DES TABLEAUX	XV
AVANT-PROPOS	XVI
I. INTRODUCTION.....	1
I.1) La pollution atmosphérique	2
I.1.1) La pollution particulaire	2
I.1.2) Règlementation de la qualité de l'air	8
I.2) Les voies respiratoires : cible principale des particules atmosphériques	11
I.2.1) Caractéristiques de l'appareil respiratoire.....	11
I.2.2) Déposition des particules dans l'appareil respiratoire.....	14
I.2.3) Devenir des particules dans l'appareil respiratoire et l'organisme.....	17
I.3) Effets des particules atmosphériques sur la santé humaine	20
I.3.1) Etudes épidémiologiques	20
I.3.2) Les pathologies respiratoires	22
I.3.3) Les pathologies cancéreuses.....	24
I.4) Mécanismes d'actions biologiques des particules atmosphériques	26
I.4.1) La réaction inflammatoire	26
I.4.2) Le stress oxydant.....	28
I.4.3) Le métabolisme des xénobiotiques.....	35
I.4.4) La cancérogénèse.....	36
I.5) La mort cellulaire par apoptose	41
I.5.1) Généralités.....	41
I.5.2) La voie intrinsèque	42
I.5.3) La voie extrinsèque.....	48
I.5.3) Rôle du calcium dans le processus apoptotique.....	49
I.5.4) Rôle du stress oxydant dans le processus apoptotique.....	51
I.5.5) Apoptose intrinsèque induite par les particules atmosphériques	51
I.5.6) Effets cytoprotecteurs des PM et de leurs composants	56
I.6) Objectifs de l'étude.....	59
II. MATÉRIEL ET MÉTHODES	63
II.1) Mise en culture et traitement des cellules	64
II.1.1) Culture cellulaire.....	64
II.1.2) Traitements des cellules	64
II.2) Particules et composés métalliques	66

II.2.1) Les méthodes de prélèvement des PM	66
II.2.2) Particules de Paris 2003	67
II.2.3) Particules de Paris et Ouagadougou 2009	68
II.2.4) Composés métalliques.....	70
II.2.5) Extraits organiques et aqueux des PM-AW	70
II.3) Evaluation de la cytotoxicité des particules par cytométrie en flux.....	71
II.4) Etude de la voie de signalisation anti-oxydante	73
II.4.1) Mesure de la production d'espèces réactives de l'oxygène par les PM: test DTT	73
II.4.2) Etude de l'effet des anti-oxydants par cytométrie en flux.....	73
II.4.3) Dosage du Glutathion	74
II.4.4) Quantification des ARN messagers par PCR quantitative en temps réel (rt-qPCR).....	74
II.4.5) Immunomarquage de Nrf2.....	76
II.5) Etude de la voie de signalisation calcique.....	77
II.5.1) Mesure du calcium intracellulaire par FlexStation.....	77
II.5.2) Mesure du calcium intracellulaire par cytométrie en flux.....	78
II.6) Etude des altérations morphologiques	78
II.6.1) Observation de l'actine en Microscopie électronique à fluorescence	78
II.6.2) Microscopie électronique à balayage (MEB).....	78
II.6.3) Culture des cellules en milieu gélifié (METHOCEL™).....	79
II.7) Analyse statistique.....	79
III. RÉSULTATS : RÔLE DE LA COMPOSITION PHYSICO-CHIMIQUE DES PARTICULES DANS LA RÉGULATION DE L'APOPTOSE.....	81
III.1) Introduction.....	82
III.1.1) Contexte de l'étude	82
III.1.2) Rappel sur les particules étudiées	83
III.2) Résultats	84
III.2.1) Etude de l'induction d'apoptose.....	84
III.2.2) Etude de l'inhibition de l'apoptose	92
III.3) Conclusion	102
IV. RÉSULTATS: MÉCANISMES MOLÉCULAIRES IMPLIQUÉS DANS L'EFFET ANTI-APOPTOTIQUE DES PARTICULES	103
IV.1) Contexte de l'étude	104
IV.2) Rôle de la voie anti-oxydante Nrf2 dans le mécanisme anti-apoptotique induit par les composés particulaires métalliques.....	105
IV.2.1) Résumé	105
IV.2.3) Article soumis	106
IV.2.3) Résultat supplémentaire & Discussion.....	153
IV.3) Résultats supplémentaires.....	159
IV.2.1) Rôle du calcium dans l'effet anti-apoptotique.....	159
IV.2.2) Interaction particules / cytosquelette	161

IV.2.2) Discussion	167
IV.4) Conclusion	169
V. CONCLUSIONS GENERALES & PERSPECTIVES	171
VI. ANNEXES	179
ANNEXE 1:	181
“Polycyclic aromatic hydrocarbon components contribute to the mitochondria-antiapoptotic effect of fine particulate matter on human bronchial epithelial cells <i>via</i> the aryl hydrocarbon receptor ”.	
Ioana Ferecatu, Marie-Caroline Borot, Camille Bossard, Melanie Leroux, Nicole Boggetto, Francelyne Marano, Armelle Baeza-Squiban, Karine Andreau.	
Particle and Fibre Toxicology 2010, 7:18	
ANNEXE 2 :	199
“Health and cellular impacts of air pollutants: from cytoprotection to cytotoxicity”.	
Karine Andreau, Melanie Leroux and Aïda Bouharrou	
Biochemistry Research International 2012, 493894	
VII. BIBLIOGRAPHIE	219

➤ **Articles publiés dans des revues avec comité de lecture (ACL)**

- ACL1. Andreau K., **Leroux M.**, Bouharrou A., Health and cellular impacts of air pollutants: from cytoprotection to cytotoxicity. *Biochem Res Int.* 2012; 2012: 493894.
- ACL2. Ferecatu I., Borot MC., Bossard C., **Leroux M.**, Boggetto N., Marano F., Baeza-Squiban A., Andreau K., Polycyclic aromatic hydrocarbon components contribute to the mitochondria-antiapoptotic effect of fine particulate matter on human bronchial epithelial cells *via* the aryl hydrocarbon receptor. *Part Fibre Toxicol.* 2010 Jul 21;7:18.

➤ **Articles soumis dans des revues avec comité de lecture (ACL)**

- ACL3. **Lovera-Leroux M.**, Crobeddu B., Kassis N., Baeza-Squiban A., Andreau K. Urban fine PM and their metallic compounds protect human bronchial epithelial cells from apoptosis: Role of Nrf2. Soumis
- ACL4. **Leroux M.**, Ferecatu I., Bouharrou A., Andreau K., Rôle des composés organiques et métalliques dans la résistance à la mort cellulaire conférée par des particules fines (PM2.5) urbaines. Soumis à *Pollution Atmosphérique*.

COMMUNICATIONS ORALES

➤ **Communication orales sans actes dans un congrès international ou national (COM)**

- COM1. **Leroux M.**, Ferecatu I., Bouharrou A., Andreau K., Role of organic compounds and metals in the resistance to cell death conferred by urban fine particles (PM2.5). 2nd European doctoral college on environment and health, Rennes, 2012.
- COM2. **Leroux M.**, Ferecatu I., Bouharrou A., Andreau K., Rôle des composés organiques et métalliques dans la résistance à la mort cellulaire conférée par des particules fines (PM2,5) urbaines. Journées interdisciplinaires de la Qualité de l'air, Lille, 2012.

COMMUNICATIONS PAR AFFICHES

➤ **Communication par affiche avec actes dans un congrès international (C-ACTI)**

- C-ACTI1. Andreau K., Ferecatu I., **Leroux M.**, Baeza-Squiban A., Marano F., Polycyclic aromatic hydrocarbon components contribute to the mitochondria-antiapoptotic effect of fine particulate matter on human bronchial epithelial cells *via* the aryl hydrocarbon receptor. *Tox Lett.* 2011, 205S: P2001.

➤ **Communications par affiche sans actes dans un congrès national (C-AFF)**

- C-AFF1. **Leroux M.**, Ferecatu I., Andreau K., Les éléments traces métalliques et les composés HAP contribuent à l'effet anti-apoptotique des particules fines atmosphériques (PM_{2.5}). 7ème Congrès des Jeunes Chercheurs-Prix René Descartes 2011, Paris, 2011.
- C-AFF2. Ferecatu I., Borot MC., Bossard C., **Leroux M.**, Boggetto N., Marano F., Baeza-Squiban A., Andreau K., Polycyclic aromatic hydrocarbon components contribute to the mitochondria-antiapoptotic effect of fine particles on human bronchial epithelial cells *via* the aryl hydrocarbon receptor. Conférence Nano 2011 de l'Institut National de Recherche et de Sécurité, Nancy, 2011.
- C-AFF3. Ferecatu I., Borot MC., **Leroux M.**, Marano F., Baeza-Squiban A., Andreau K., Les composés HAP contribuent à l'effet anti-apoptotique des particules fines atmosphériques (PM 2.5) par la voie du récepteur Aryl Hydrocarbure (AhR). Congrès de la Société Française de Toxicologie, Paris, 2010.
- C-AFF4. Ferecatu I., Borot MC., **Leroux M.**, Marano F., Baeza-Squiban A., Andreau K., Polycyclic aromatic hydrocarbon components contribute to mitochondria-anti apoptotic effect of fine particulate matter on human bronchial epithelial cells *via* the AhR pathway. Congrès de la Société de Pharmacotoxicologie Cellulaire « Toxicologie Prédictive : les Voies du Futur », Paris, 2010.
- C-AFF5. Ferecatu I., Borot MC., **Leroux M.**, Marano F., Baeza-Squiban A., Andreau K., Les composés HAP contribuent à l'effet anti-apoptotique des particules fines atmosphériques (PM 2.5) par la voie du récepteur Aryl hydrocarbure (AhR). Journées Nano Biotechnologie Nano Toxicologie Nano et Société, Orsay, 2010.

ABREVIATIONS

8-OHdG : 8-hydroxydeoxyguanine	Cyt c : Cytochrome <i>c</i>
A23187 ou A23 : ionophore calcique	DD : « Death Domain »
Aex : extrait aqueux des PM-AW	DED : Death Effector Domain
AhR : « Aryl hydrocarbon Receptor »	DiOC6(3) ou DiOC :
AIF : « Apoptosis Inducing Factor »	3,3'Dihexyloxacarbo-cyanine Iodide
AIP : « AhR Interacting Protein »	DISC : « Death Inducing Signaling Complex »
AnnV : Annexine V-FITC	DTNB : « 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) »
ANT : Adénine Nucléotide Translocator	DTT : dithiothréitol
AP-1 : Apoprotéine 1	EC : carbone élémentaire
Apaf1 : « Apoptotic peptidase activating factor- 1 »	EMX : Enzymes du Métabolisme des Xénobiotiques
APHEA : « Air Pollution and Health: a European Approach »	EndoG : endonucléase G
APHENA : « Air Pollution and Health: a European and North American Approach »	ERO : Espèces Réactives de l'Oxygène
AR : Amphiréguline	ESCAPE : « European Study of Cohorts for Air Pollution Effects »
ARE : éléments de réponse aux anti-oxydants	ETM : élément traces métalliques
Arnt : « Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator »	F : Particules Fines
B2M : β2 microglobuline	FADD : « Fas-Associated Death Domain »
BaP : Benzo(a)pyrene	FZ : Fongizone
BPCO : Broncho-pneumopathie chronique obstructive	GAPDH : Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
BPDE : anti-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxy-benzo[a] pyrene	Glx : GlutaMAX™
BSA : Bovine Serum Albumin	GM-CSF : Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor
CAD : « Caspase-Activated DNase »	GPx : Glutathion Peroxydase
Caspases : « cysteinyl aspartate specific proteases »	GR : Glutathion Reductase
CB : « Carbon Black »	GSH : glutathion réduit
CBP : cancers broncho-pulmonaires	GSSG : glutathion oxydé
CITEPA : Centre Interprofessionnel Technique d'Etudes de la Pollution Atmosphérique	GST : Glutathion S-transférase
CNPC : Carcinomes Non à Petites Cellules	GSTP1 : G lutathione S-transférase pi gene
COV : Composés Organiques Volatils	HAP : Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques
Cp : « Crossing point »	HE : hydroéthidine
CPC : Carcinome à Petites Pellules	HK-II : Hexokinase II
Ct : « Cycle threshold »	HO1 : Hème oxygénase 1
CYP : cytochromes P450	Htra2 : « High temperature requirement protein A2 »
Cyp-D : Cyclophiline-D	IAP : « Inhibitor Apoptosis Proteins »
	IARC : « International Agency for Research on Cancer »

ICAD : « Inhibitor of Caspase Activated DNase »

ICRP : « International Commission on Radiological Protection »

IEM : Indicateur d'exposition moyenne

IL-6 : Interleukine 6

Iono : ionomycine

IP ou PI : Iodure de Propidium

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

MAM : « Mitochondrial-associated endoplasmic reticulum membranes »

MAPK : « Mitogen-activated protein kinase »

MCU : « Mitochondrial Calcium Unipoter »

MEB : Microscopie électronique à balayage

MEGATOX : « MEGacity Aerosols chemical characterization and TOXicity »

MOMP : « Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization »

MRP : « Multidrug Resistance Protein »

NAT : arylamine N-acetyltransférase

NMMAPS : « National Morbidity, Mortality, and Air Pollution Study »

NQO-1 : « NADPH Quinone Oxydoreductase 1 »

Nrf2 ou NFE2L2 : «Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 »

OB : particules « Ouagadougou Biomasse »

OC : carbone organique

Oex : extrait organique des PM-AW

OMS : Organisation mondiale de la santé

OP : particules « Ouagadougou Photochimie »

PAPS : adenosine 3'-phosphate 5'-phosphosulphate

PCB : « Polychlorinated biphenyl »

pDi : particules Diesel

P-gp : glycoprotéine P

PM : «Particulate Matter »

PM0.1 : PM inférieures à 0,1 µm de diamètre aérodynamique

PM10 : PM inférieures à 10 µm de diamètre aérodynamique

PM2.5 : PM inférieures à 2,5 µm de diamètre aérodynamique

PM-AS : « PM Auteuil Summer »

PM-AW : « PM Auteuil Winter »

PMM : perméabilisation des membranes mitochondriales

PM-VS : « PM Vitry Summer »

PM-VW : « PM Vitry Winter »

PN : Polynucléaires Neutrophiles

PTP : Pore de Transition de Perméabilité

RE : Réticulum Endoplasmique

ROFA : Residual Oil Fly Ash

RT-qPCR : « Real Time Quantification Polymerase Chain Reaction »

SMAC/DIABLO : « Second Mitochondria-derived Activator of Caspases »

SOD : superoxyde dismutase

STS : staurosporine

TCDD : 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine

TNB : 2-nitro-5 thiobenzoïque acide

TNF-R : « Tumor Necrosis Factor Receptors »

TNFα : « Tumor Necrosis Factor α »

TR : particules « Trafic »

TRAIL : « TNF-related apoptosis inducing ligand »

TSP : « Total Suspended Particles»

TSPO : « Translocator protein»

UF : particules ultrafines

UG : Ultrosor G

UGT : « UDP-glucuronosyltransférase »

VDAC : « Voltage-dependent anion channel »

WB : particules « Wood Burning »

XB : xénobiotique

XIAP : « X-linked inhibitor of apoptosis protein »

XRE : éléments de réponse aux xénobiotiques

ΔΨm : potentiel transmembranaire mitochondrial

LISTE DES FIGURES

CHAPITRE I

Figure I.1: Classification des particules atmosphériques en fonction de leur diamètre aérodynamique.....	3
Figure I.2: Distribution granulométrique moyenne d'un aérosol urbain en fonction du nombre de PM, de leur surface ou de leur volume.....	3
Figure I.3: Classification des particules atmosphériques en fonction de leur pénétration et déposition dans l'appareil respiratoire.....	4
Figure I.4: Sources d'émissions de particules atmosphériques en France métropolitaine pour les TSP.....	4
Figure I.5: Emissions dans l'air de particules atmosphériques en France métropolitaine en kilotonnes (kt) par an.....	5
Figure I.6: Structure schématisée d'une particule fine.....	6
Figure I.7: Caractéristiques physiques des particules atmosphériques.....	7
Figure I.8 : Anatomie de l'appareil respiratoire.....	11
Figure I.9: Coupe histologique d'une bronche extra-pulmonaire humaine.....	13
Figure I.10: Schéma de l'épithélium alvéolaire.....	14
Figure I.11: Différents mécanismes de déposition des PM dans le tractus respiratoire.....	15
Figure I.12: Modèle de prédiction du dépôt fractionnée des particules inhalées.....	16
Figure I.13: Voies d'élimination et de translocation des particules déposées dans le tractus respiratoire.....	19
Figure I.14: Coupes de parenchymes pulmonaires de femmes ayant vécu à Vancouver ou Mexico City.....	20
Figure I.15: Apparence de la muqueuse respiratoire dans l'asthme et la BPCO.....	24
Figure I.16: Coupes histologiques de tumeurs broncho-pulmonaires.....	25
Figure I.17: Schéma de la réaction inflammatoire induite par les particules Diesel (pDi) au niveau de la muqueuse bronchique.....	27
Figure I.18: Réactions de réduction de l'oxygène et de production d'ERO <i>in vivo</i>	28
Figure I.19: Réactions en chaînes avec le Fer, formation de l'ion oxoferryle très réactionnel.....	29
Figure I.20: Réactions de production des ERO et systèmes de détoxification enzymatique.....	30
Figure I.21: Modèle de réponse hiérarchisée au stress oxydant induit par les particules.....	33
Figure I.22: Représentation schématique de la voie Nrf2.....	34
Figure I.23: Représentation schématique du métabolisme des xénobiotiques.....	36
Figure I.24: Processus multi-étapes de l'évolution d'une cellule cancéreuse.....	37
Figure I.25: Les 10 caractéristiques acquises par les cellules cancéreuses.....	37
Figure I.26: Mécanismes d'altération et de réparation de l'épithélium respiratoire.....	39
Figure I.27: Schéma hypothétique des cellules souches de l'épithélium respiratoire responsables de l'initiation des tumeurs pulmonaires.....	39

Figure I.28: Les caractéristiques morphologiques de l'apoptose, de l'oncose, et de la nécrose...	42
Figure I.29: La chaîne respiratoire mitochondriale	43
Figure I.30: Mécanismes hypothétiques de la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale.....	44
Figure I.31: Structure et fonctions des caspases.....	46
Figure I.32: Les protéines de la famille Bcl-2.....	47
Figure I.33: Voies extrinsèque et intrinsèque de l'apoptose	49
Figure I.34: Apoptose dépendante et indépendante des ERO induite par les PM.....	52

CHAPITRE II

Figure II.1: Impacteur en cascade.....	67
Figure II.2: Fonctionnement d'un cytomètre en flux.....	71
Figure II.3: Le principe de quantification en RT-qPCR	76

CHAPITRE III

Figure III.1: Effet de l'exposition PM2.5 prélevées en 2003.....	85
Figure III.2: Effet de l'exposition aux particules TR.....	86
Figure III.3: Effet de l'exposition aux particules WB	87
Figure III.4: Effet de l'exposition aux particules OB.....	88
Figure III.5: Effet de l'exposition aux particules OP.....	89
Figure III.6: Composition chimique des particules OB3.....	90
Figure III.7: Potentiel pro-inflammatoire de différents lots de PM2.5.....	91
Figure III.8: Représentation en radars, des effets des PM sur l'expression des gènes de l'inflammation	91
Figure III.9: Effet anti-apoptotique de particules de différentes tailles	92
Figure III.10: Effet anti-apoptotique des différents composés particulaires	93
Figure III.11: Corrélation entre la composition des PM en HAP.....	95
Figure III.12: Corrélation entre la composition des PM en métaux	97
Figure III.13: Effet anti-apoptotique des composés métalliques des PM.....	99
Figure III.14: Effet anti-apoptotique des composés ferreux des PM	100

CHAPITRE IV

Figure IV.1: Effet des PM et de leurs composés métalliques et organiques sur la prolifération des cellules 16HBE en milieu semi-solide.....	158
Figure IV.2: Effet des PM2.5 sur le pic de calcium induit par A23	159
Figure IV.3: Effet des PM-AWsur le calcium intracellulaire.....	160

Figure IV.4: Effet des inducteurs d'apoptose sur l'actine et la tubuline	162
Figure IV.5: Effet des PM-AW sur l'actine.....	163
Figure IV.6: Effet des PM-AW et de l'A23 sur le cytosquelette.....	165
Figure IV.7: Effet des PM-AW et du STS sur le cytosquelette des cellules 16HBE.....	166

CHAPITRE V

Figure V.1: Modèle hypothétique mécaniste de l'effet anti-apoptotique de PM2.5	177
---	-----

LISTE DES TABLEAUX

CHAPITRE I

Tableau I.1: Normes européennes et françaises de qualité de l'air.....	10
Tableau I.2: Paramètres influençant la déposition des PM.	15
Tableau I.3: Comparatif entre l'asthme et la BPCO	22
Tableau I.4: Classification histologique selon l'OMS (2004) des carcinomes bronchopulmonaires	25
Tableau I.5: Mécanismes génétiques et épigénétiques d'altérations des oncogènes et gènes suppresseurs de tumeurs	40

CHAPITRE II

Tableau II.1: Traitements des cellules 16HBE.....	65
Tableau II.2: Protocole et modes d'actions des traitements.....	66
Tableau II.3: Prélèvements des particules atmosphériques.....	69 et 83
Tableau II.4: Composés métalliques des PM de 2003 et doses utilisés dans les expériences.....	70 et 98
Tableau II.5: Mesure de l'apoptose par cytométrie en flux.....	72
Tableau II.6: Séquence des amorces utilisées pour la RT-qPCR.....	75

CHAPITRE III

Tableau III.1: Composition en HAP des PM de 2003. D'après <i>Baulig et al. 2004</i>	94
Tableau III.2: L'effet anti-apoptotique des différents des PM-AW est lié aux HAP ayant cinq cycles benzéniques ou plus.....	96

CHAPITRE IV

Tableau IV.1: Récapitulatif des effets des inducteurs sur le calcium	167
---	-----

AVANT-PROPOS

Dés la fin du XVII^{ème} siècle, les prémisses de la révolution industrielle favorisent les premières préoccupations concernant la pollution atmosphérique, avec notamment la pétition de John Evelyn adressée au roi Charles II en 1661 demandant la relocalisation des industries les plus polluantes de Londres hors de la capitale (*Evelyn 1661; Seaton 2011*). Les scientifiques commencent à s'intéresser à la composition de l'air et aux effets des différents polluants sur la santé et l'environnement. Au XVIII^{ème} siècle, l'opinion scientifique s'accorde à admettre l'effet néfaste de certains polluants comme les fumées et le gaz sulfureux, mais n'est pas unanime sur l'aspect toxicologique de la pollution générale des villes (*Davenport et al. 1954; Halliday 1961*). En 1914 est publié un premier article indiquant que les cancers sont plus fréquents dans les villes polluées (*Halliday 1961*). La recherche sur la pollution atmosphérique connaît une recrudescence dans les années 1950 suite aux épisodes dramatiques de fortes pollutions dues à des fumées noires. Ces fumées noires, ou « smogs » (contraction de « smoke », fumée, et « fog », brouillard), contiennent notamment des molécules gazeuses irritantes ou toxiques (acide sulfureux, goudrons, gaz nitreux) très néfastes pour l'Homme. Ces épisodes de forte pollution ont eu lieu dans la vallée de la Meuse, en Belgique, en 1930 (du 1^{er} au 5 décembre), causant plus de 60 morts (*Friket 1931; Haldane 1931; Nemery et al. 2001*), en octobre 1948 (les 30 et 31 octobre) à Donora, en Pennsylvanie (20 morts, *Helpand et al. 2001*), et à Londres, en Angleterre en 1952 (du 5 au 9 décembre), causant plus de 4000 morts (*Stegeman et al. 2002*). Ces trois épisodes sont liés à une pollution latente due aux industries métallurgiques (cas de Donora) ou à une combustion excessive du charbon (cas de la Meuse et Londres). La formation de ces smogs hivernaux est associée à des conditions climatiques exceptionnelles où l'inversion des températures atmosphériques crée une couche d'air plus chaud en altitude qui piège la pollution dans une couche d'air froid près de la surface. De nombreux autres smogs se sont déclarés jusqu'à aujourd'hui.

Parmi les polluants atmosphériques, les particules en suspension sont très délétères pour l'Homme. Depuis les années 1950, de nombreuses études épidémiologiques ont permis d'établir un lien évident entre la pollution particulaire et l'augmentation de la mortalité et de la morbidité d'origines respiratoires et cardio-vasculaires (*Mills 1951; Mahoney 1976; Schwartz 1994*). Les recherches les plus récentes ont permis de démontrer clairement que ces effets sur la santé apparaissent à des concentrations modérées de polluants, rencontrées dans les grandes villes. A long terme, la pollution particulaire peut exacerber certaines pathologies pulmonaires, les troubles du développement de la fonction pulmonaire chez l'enfant et les cancers du poumon.

De nos jours, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) estime que la pollution atmosphérique par les particules (PM) contribue à environ 800.000 décès prématurés chaque année, ce qui la classe au 13^{ème} rang des causes de mortalité dans le monde. De plus, en octobre 2013, l'IARC («International Agency for Research on Cancer») a classé la pollution atmosphérique extérieure comme cancérigène certain pour l'Homme, les particules fines ont été également évaluées et classées séparément comme cancérigène certain. C'est pourquoi il est indispensable de poursuivre les recherches sur la composition de la pollution de l'air et sur ses mécanismes d'actions toxiques.

Dans ce contexte le but de ma thèse a été :

- D'étudier et de comparer la cytotoxicité de particules de différentes tailles et de différentes sources.
- D'étudier l'effet des particules atmosphériques sur la régulation de la mort cellulaire par apoptose.
- D'identifier les composés impliqués dans la résistance à l'apoptose causée par certaines particules fines étudiées.
- De décrypter les mécanismes moléculaires conduisant à cette résistance à l'apoptose.

I. INTRODUCTION

I.1) La pollution atmosphérique	2
I.1.1) La pollution particulaire	2
I.1.2) Règlementation de la qualité de l'air	8
I.2) Les voies respiratoires : cible principale des particules atmosphériques	11
I.2.1) Caractéristiques de l'appareil respiratoire.....	11
I.2.2) Déposition des particules dans l'appareil respiratoire	14
I.2.3) Devenir des particules dans l'appareil respiratoire et l'organisme	17
I.3) Effets des particules atmosphériques sur la santé humaine	20
I.3.1) Etudes épidémiologiques.....	20
I.3.2) Les pathologies respiratoires.....	22
I.3.3) Les pathologies cancéreuses.....	24
I.4) Mécanismes d'actions biologiques des particules atmosphériques	26
I.4.1) La réaction inflammatoire.....	26
I.4.2) Le stress oxydant	28
I.4.3) Le métabolisme des xénobiotiques	35
I.4.4) La cancérogénèse.....	36
I.5) La mort cellulaire par apoptose	41
I.5.1) Généralités	41
I.5.2) La voie intrinsèque.....	42
I.5.3) La voie extrinsèque	48
I.5.3) Rôle du calcium dans le processus apoptotique.....	49
I.5.4) Rôle du stress oxydant dans le processus apoptotique	51
I.5.5) Apoptose intrinsèque induite par les particules atmosphériques	51
I.5.6) Effets cytoprotecteurs des PM et de leurs composants.....	56
I.6) Objectifs de l'étude.....	59

I.1) LA POLLUTION ATMOSPHERIQUE

Dans le Code de l'Environnement, la pollution atmosphérique est définie comme étant « l'introduction par l'homme, directement ou indirectement, ou la présence, dans l'atmosphère et les espaces clos, d'agents chimiques, biologiques, ou physiques, ayant des conséquences préjudiciables de nature à mettre en danger la santé humaine, à nuire aux ressources biologiques et aux écosystèmes, à influencer sur les changements climatiques, à détériorer les biens matériels, à provoquer des nuisances olfactives excessives » (article L. 220-2). Par conséquent, la pollution atmosphérique correspond à la présence indésirable de polluants ou l'élévation excessive de la proportion de certains constituants de l'atmosphère.

L'air que nous respirons est principalement composé d'azote (78 %) et d'oxygène (21 %), dans les 1% restant sont présents des gaz rares (Argon, Néon, Hélium,...), de la vapeur d'eau, du dioxyde de carbone (CO₂), et de nombreux polluants plus ou moins nocifs pour l'Homme et son environnement. Ces polluants peuvent être d'origines naturelles telles que les végétaux, bactéries, les cendres et les gaz issus des éruptions volcaniques (dioxyde de soufre (SO₂), sulfure d'hydrogène (H₂S),...), l'érosion naturelle des sols (sable, terre), *etc.* ; ou d'origines anthropiques telles que les industries, les transports (usure de pneus, carburants,...), le chauffage (au bois ou au gaz), la production d'énergie, *etc.* Les polluants atmosphériques peuvent être de nature gazeuse (90 % des masses globales de polluants rejetés dans l'air) ou particulaire (particules en suspension dans l'air). La pollution particulaire est aujourd'hui reconnue comme très néfaste pour la santé.

I.1.1) La pollution particulaire

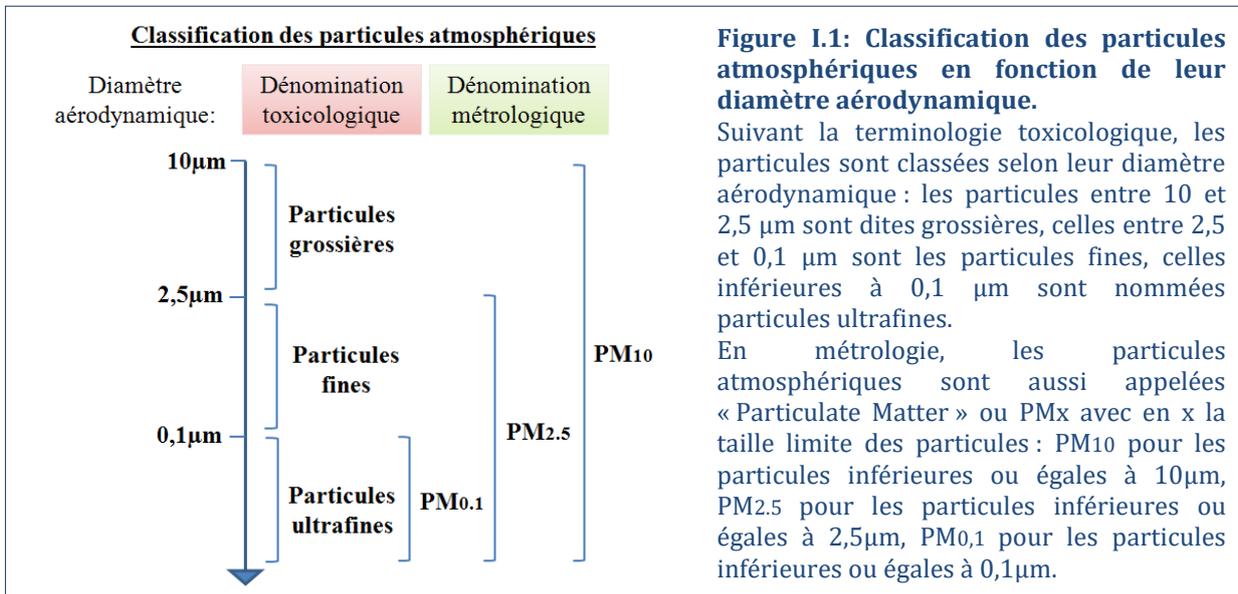
I.1.1.i) Classification des particules atmosphériques

Il existe plusieurs classifications possibles des particules atmosphériques selon les effets qu'elles induisent sur la santé humaine, leurs sources, ou leurs caractéristiques physico-chimiques. Cependant, elles sont communément réparties en fonction de leur taille, qui est mesurée grâce au diamètre aérodynamique permettant de décrire le comportement d'une particule en suspension. Le diamètre aérodynamique d'une particule est défini comme le diamètre d'une sphère de masse volumique 1 g/cm³ qui a la même vitesse de chute dans l'air que la particule considérée, dans les mêmes conditions de température, de pression et d'humidité (AFNOR 1985).

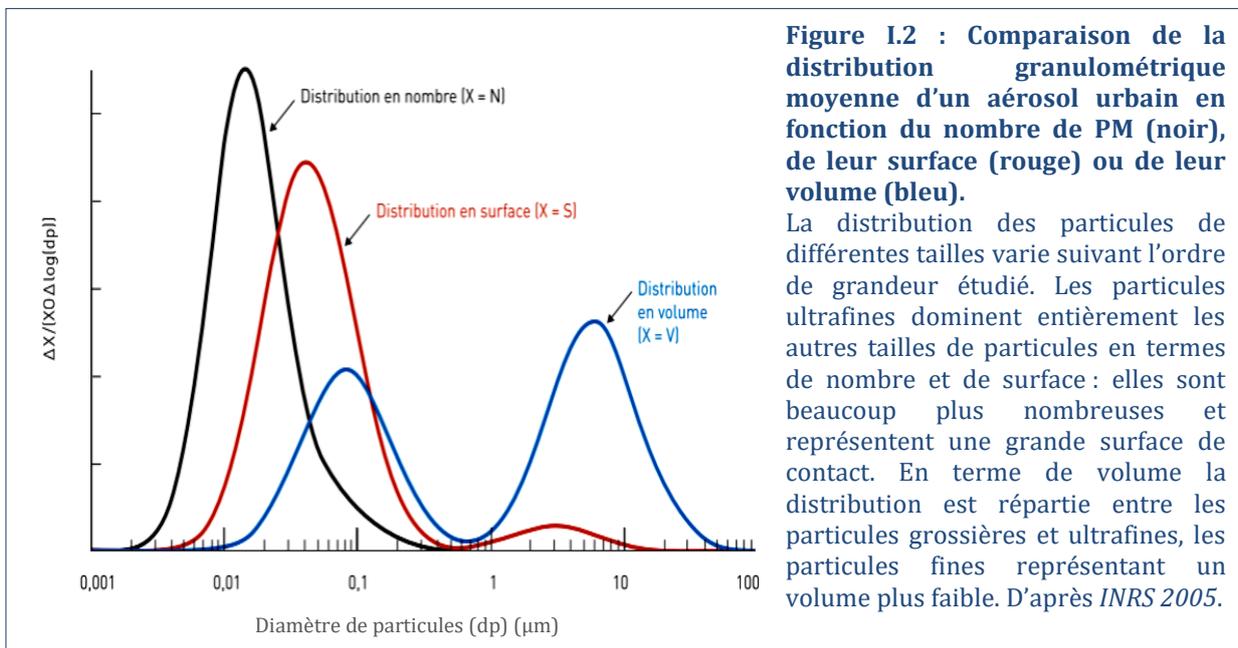
Selon la dénomination métrologique, les particules atmosphériques inhalables sont appelées PM pour « Particulate Matter », avec un indice de taille (Choi *et al.* 2004), alors que la dénomination toxicologique utilise les adjectifs « grossières, fines, ultrafines et/ou nanoparticules » (Figure I.1). Ainsi, les particules peuvent être classées en quatre catégories selon leur diamètre aérodynamique :

- **les PM_{0.1}** ont un diamètre aérodynamique inférieur ou égal à 0,1 µm et correspondent aux particules **ultrafines (UF)** ;
- **les PM_{2.5}** ont un diamètre aérodynamique inférieur ou égal à 2,5 µm, dans cette catégorie sont regroupées les particules **ultrafines (UF) et fines (F)** ;

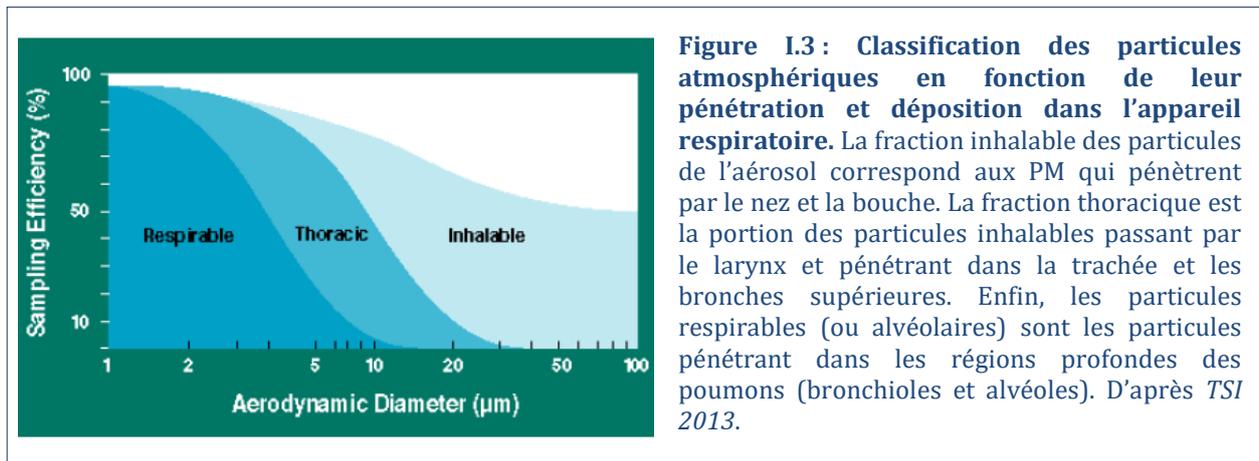
- les **PM10** ont un diamètre aérodynamique inférieur ou égal à 10 μm , c'est un mélange de particules **ultrafines (UF)**, **fines (F)** et **grossières (G)**;
- les **TSP** (« Total Suspended Particles ») ont un diamètre aérodynamique compris entre 0,01 et 100 μm , comprenant tout l'aérosol.



Les PM sont aussi caractérisées par : leur nombre, leur surface et leur volume. Ainsi, la **figure 1.2** illustre le fait que même si la distribution en taille des PM s'étend largement, les particules ultrafines dominent largement l'aérosol en référence à leur nombre et leur surface.

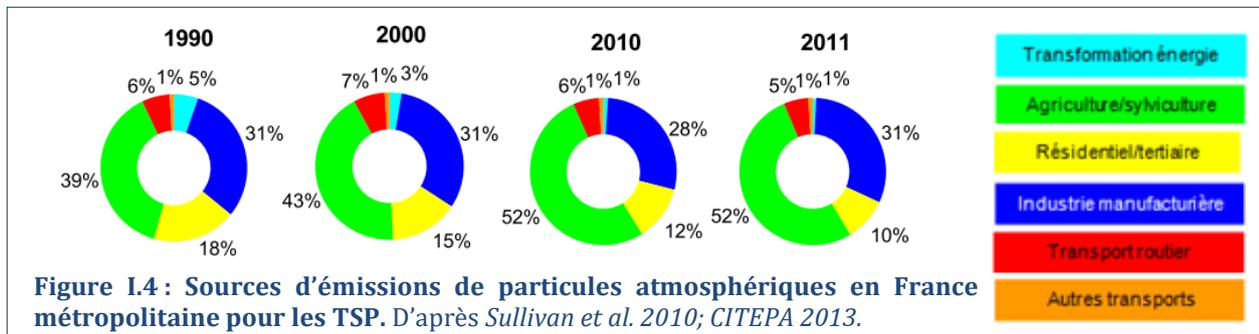


Enfin, dans les domaines professionnel et médical, les particules sont définies en fonction de leur capacité à pénétrer et se déposer dans les diverses régions du tractus respiratoire : particules inhalables, thoraciques ou alvéolaires (**Figure I.3**) en lien avec leurs effets sur la santé humaine (voir § I.2.3 et § I.3).



1.1.1.ii) Sources

Chaque année depuis 1961, le CITEPA (Centre Interprofessionnel Technique d'Etudes de la Pollution Atmosphérique) réalise des inventaires nationaux d'émissions de polluants atmosphériques et de gaz à effet de serre, conformément aux engagements internationaux de la France (voir § 1.1.4.3). Les figures 1.4 et 1.5 montrent que tous les secteurs d'activité contribuent aux émissions de particules avec, pour l'année 2011, par ordre d'importance : l'agriculture/sylviculture (52%, cultures, herbicides et pesticides), l'industrie manufacturière (31%, essentiellement le BTP), le secteur résidentiel/tertiaire (10%, principalement dû au chauffage), le trafic routier (5%), et enfin, à moindre part, les autres modes de transport hors routier (1%) et la distribution/transformation d'énergie (1%) (*CITEPA 2013*).



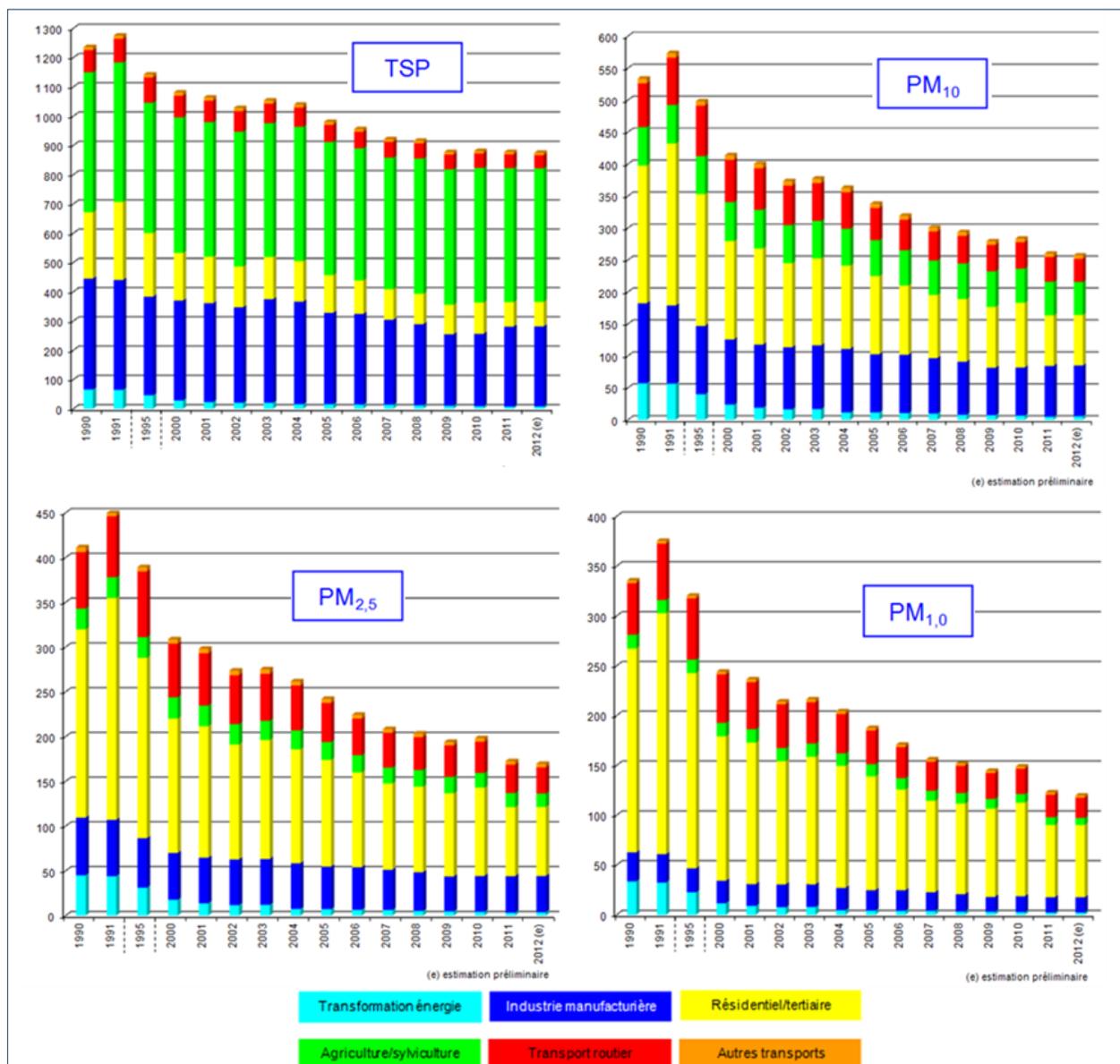


Figure I.5: Emissions dans l'air de particules atmosphériques en France métropolitaine en kilotonnes (kt) par an. TSP : Ensemble des particules (« Total suspended particles »), PM₁₀ : particules atmosphériques de diamètre aérodynamique inférieur à 10 µm, PM_{2,5} : particules atmosphériques de diamètre aérodynamique inférieur à 2,5 µm, PM₁ : particules atmosphériques de diamètre aérodynamique inférieur à 1 µm. Emissions inventoriées entre 1990 à 2011. Les données pour l'année 2012 sont une estimation préliminaire. D'après CITEPA 2013.

On observe une diminution nette des émissions de particules atmosphériques en France métropolitaine de 1990 à 2011 (-359 kt pour les TSP, **Figure I.5**). Celle-ci est d'autant plus marquée pour les PM de petite taille (respectivement -51%, -58% et -63% pour les PM₁₀, PM_{2,5}, PM₁, *CITEPA 2013*). Il est à noter que tous les secteurs participent à la diminution observée depuis 2000, sauf pour le secteur agricole/sylvicole qui domine de plus en plus les émissions de TSP et PM₁₀ (respectivement 52% et 20% en 2011, **Figure I.4**). Les sources d'émissions des particules fines (PM_{2,5} et PM₁) sont dominées par le secteur résidentiel, l'industrie et le transport routier, respectivement 45%, 24%, et 18% des émissions de PM_{2,5} en 2011 (**Figure**

I.4). Cette observation est représentative de la composition particulaire, puisque les particules Diesel (pDi), ainsi que les suies issues de la combustion d'énergies industrielles et résidentielles, sont des polluants primaires carbonés (un noyau de carbone suie avec des composés organiques adsorbés), principalement retrouvés dans les fractions fines et ultrafines de l'aérosol.

I.1.1.iii) Composition et structure

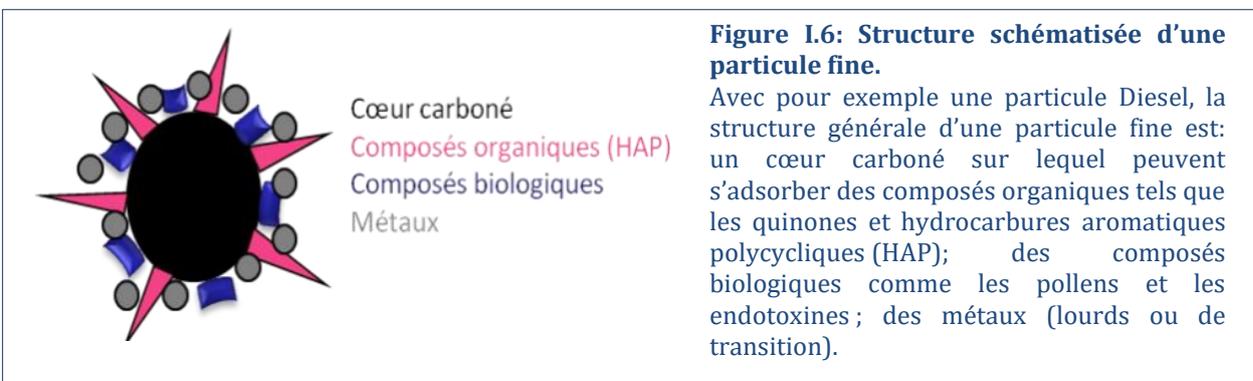
La pollution particulaire est un mélange hétérogène de particules, dont la composition varie suivant leur granulométrie, leurs origines (sources d'émissions), les conditions météorologiques (temps, vents, saisons), leurs transformations dans l'air (photochimie, hydrolyse, catalyse) et leurs interactions avec d'autres composés atmosphériques (*Lelieveld et al. 2002; Perrone et al. 2013*).

Présents dans des proportions variables dans les 3 fractions granulométriques des PM, les principaux composés identifiés sont :

- **Des composés carbonés**

Les composés carbonés sont constitués d'une fraction élémentaire et d'une fraction organique. Le **carbone élémentaire** (EC), aussi appelé noir de carbone ou carbone suie, est principalement d'origine primaire et résulte de la combustion complète de la matière organique, tandis que, le **carbone organique** (OC) est d'origine primaire et secondaire et provient de la combustion incomplète de la matière organique. L'EC est constitué de petites particules qui s'agrègent en chapelet, cette structure se rapproche du graphite (avec des microcristaux reliés par des hydrocarbures saturé ou insaturés) et forme un cœur carboné sur lequel s'adsorbent d'autres composés, notamment des composés organiques (**Figure I.6, Ebner et al. 2005; Pernelet-Joly 2008**).

Ce sont principalement des PM_{2.5}, produites lors de la combustion de carburants comme le fioul, l'essence, le kérosène et le Diesel, qui forme des suies essentiellement carbonées et parfois soufrées (**Figure I.7A-E**). Ainsi, les pDi sont les particules modèles pour l'étude des PM_{2.5}. Elles sont structurées autour d'un cœur carboné sur lequel s'adsorbent plus de 400 espèces, parmi lesquelles des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), des quinones, des aldéhydes, des métaux, des sulfates, *etc.* (**Figure I.6**)



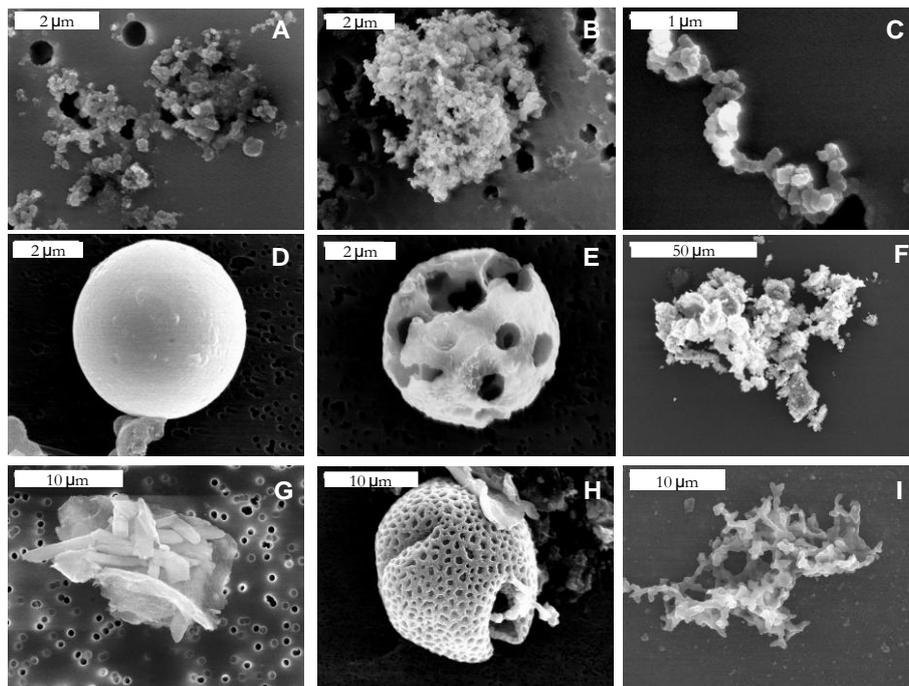


Figure I.7: Caractéristiques physiques des particules atmosphériques (Paris 2003). Les particules atmosphériques contiennent des suies (A-C), des cendres volantes (D et E), des particules d'usure (F) ou des particules biologiques (G-I). Les photos A et B montrent des suies agrégées en paquet d'une dizaine de μm ou en forme de chapelet (C). Pour tous, l'élément de base est une structure sphérique d'environ 100 nm de diamètre. Les cendres volantes de charbon sont caractérisées par une surface lisse (D) alors que celles issues du fioul sont reconnaissables par leur aspect « troué » (E). Des particules terrigènes (G), des pollens (H) ou d'autres particules probablement d'origine végétale peuvent aussi exister (I). L'ensemble des photos ont été prises en microscopie électronique à balayage. D'après *Baulig et al. 2004*.

- **Des composés organiques**

Les composés organiques contiennent au moins un atome de carbone associé à des atomes d'hydrogène, oxygène, azote, soufre, nitrates et/ou sulfates. Ils sont issus de phénomènes de combustions (industrielle et résidentielle), évaporations de solvants (peintures, produits d'entretien), évaporations de composés organiques (carburants) et réactions biologiques... Parmi ceux-ci, sont retrouvés les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), les hydrocarbures aliphatiques et nitro-aromatiques, les quinones, les aldéhydes, *etc.* (*Yu, J.Z. et al. 2011; Val et al. 2013*). Une attention particulière est portée aux HAP de par leurs effets cancérigènes, génotoxiques, et perturbateurs endocriniens pour l'Homme (*Bekki et al. 2013; Kim, K.H. et al. 2013*) ainsi que leur présence dans les fractions fines et ultrafines de l'aérosol (*Jeng 2010; Val et al. 2013*).

- **Des composés minéraux**

Les particules minérales sont principalement des particules terrigènes, issues de l'érosion des sols et des routes (**Figure I.7F-G**), de la remise en suspension de poussières désertiques, des embruns, et des travaux de chantiers. Ce sont aussi des sels tels que le carbonate de calcium et le chlorure de sodium provenant notamment de l'évaporation de l'eau de mer et des exploitations minières (*Pernelet-Joly 2008*). Ces composés sont retrouvés essentiellement dans la fraction grossière des particules atmosphériques (*Lelieveld et al. 2002*).

- **Des composés inorganiques**

Les composés inorganiques sont essentiellement des polluants secondaires, parmi lesquels les sulfates (SO_2 , SO_4), les halogénures, l'acide sulfurique (H_2SO_4) et les nitrates, issus de la transformation des particules et de l'oxydation du soufre et de l'azote ; des acides chlorhydriques (HCl) et bromhydriques (HBr), dus à l'hydrolyse des halogénures, bromures et chlorures de plomb émis par les gaz d'échappement ; de l'ozone O_3 , qui résulte, sous l'action du rayonnement solaire, de la transformation chimique des oxydes d'azote NO_x (NO et NO_2) et des composés organiques. Ces composés sont principalement de petite taille, et peuvent s'adsorber sur le carbone (particules fines et ultrafines, **Figure I.6**).

- **Des métaux**

Les métaux et métalloïdes sont des éléments inorganiques naturellement présents dans l'environnement (croûte terrestre et aérosols marins) et à l'état de traces dans les sols (moins de 1 g/kg), d'où leur noms d'élément traces métalliques (ETM, nomination préférentielle à « métaux lourds » couramment utilisée et désignant les métaux ayant une masse volumique supérieure à 5 g/cm³). Les ETM sont également largement utilisés dans l'industrie depuis la révolution industrielle.

Les rejets d'éléments métalliques tels que Pb, Hg, Zn, Cd, Cu et Cr ont été multipliés par trois, depuis le début de l'ère industrielle (*INERIS 2006*). Ainsi, les sources d'émissions anthropiques sont principalement l'industrie métallurgique (sidérurgie, *etc.*), les phénomènes abrasifs (freinage des véhicules, usure de la chaussée, remise en suspension, *etc.*), et la combustion (chauffage, incinération, *etc.*, *Pernelet-Joly 2008*). Certains métaux peuvent également être des traceurs spécifiques d'émissions d'origines anthropiques comme le zinc, le potassium et le soufre, marqueurs de combustions de biomasse.

Parmi les métaux adsorbés sur les particules, sont retrouvés : du vanadium (V), du cadmium (Cd), du mercure (Hg), du plomb (Pb), de l'aluminium (Al), du titane (Ti), du cuivre (Cu), du zinc (Zn), *etc.* (*Andreau et al. 2012*). En général les PM ne contiennent que d'infimes quantités d'ETM (quelques $\mu\text{g/g}$ de PM), néanmoins, certaines catégories de particules sont connues pour être riches en métaux, telles que les ROFA (« Residual Oil Fly Ash » = cendres volantes résiduelles d'huile, *Baulig et al. 2004*).

- **Des composés biologiques**

Des composés biologiques comme des pollens (**Figure I.7 H-I**), des spores et divers micro-organismes (algues, champignons, bactéries, virus ...) sont généralement retrouvés dans la fraction grossière de l'aérosol (*Pernelet-Joly 2008*).

I.1.2) Règlementation de la qualité de l'air

Les épisodes majeurs de pollution de l'air extérieur ayant eu lieu au début du XX^{ème} siècle en Belgique, Pennsylvanie et à Londres, ont conduit les autorités internationales, européennes et françaises à légiférer afin de limiter la présence de polluants dans l'atmosphère et d'améliorer la qualité de l'air *via* la définition de différentes valeurs :

- **Les valeurs limites d'exposition** sont les valeurs à atteindre dans un délai donné et à ne pas dépasser ;
- **Les valeurs cibles** sont les valeurs à atteindre dans la mesure du possible afin d'éviter les effets nocifs sur la santé et/ou l'environnement ;
- **Les seuils d'information et de recommandation** sont les niveaux au-delà desquels une exposition de courte durée présente un risque pour la santé pour des personnes sensibles et qui nécessitent l'information immédiate de ces personnes ainsi que des recommandations pour réduire certaines émissions ;
- **Les seuils d'alerte** sont les niveaux de pollutions au-delà desquels une exposition de courte durée présente un risque pour la santé humaine dans son ensemble, ou pour l'environnement, et à partir desquels des mesures de restriction des activités polluantes doivent être prises d'urgence (*AirParif*).

L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) recommande des valeurs limites d'exposition pour certains polluants dont les particules atmosphériques : 50 µg/m³/jour et 20 µg/m³ de moyenne annuelle pour les PM₁₀ ; 25 µg/m³/jour et 10 µg/m³ de moyenne annuelle pour les PM_{2.5}. Ces lignes directrices, dont la dernière mise à jour date de 2005, s'appuient sur des études scientifiques montrant qu'il n'a pas été observé d'effets nuisibles sur la santé en-dessous de ces valeurs seuils. Elles constituent l'évaluation la plus reconnue et la plus actuelle des effets de la pollution atmosphérique sur la santé humaine et préconisent des objectifs de qualité de l'air qui réduisent fortement les risques sanitaires (*OMS 2006; Respire*).

Sur la base des recommandations de l'OMS, la Communauté Européenne établit des directives, notamment celles du 14 avril 2008 (2008/50/CE) et du 15 décembre 2004 (2004/107/CE) qui visent à : évaluer la qualité de l'air selon des méthodes définies, définir des objectifs de qualité afin de prévenir ou réduire les effets de la pollution atmosphérique sur la santé et l'environnement, préserver une bonne qualité de l'air, et informer le public. Cette législation concerne un certain nombre de polluants dont les particules PM₁₀ et PM_{2.5} (**Tableau I.1**).

Au niveau national, les critères de qualité de l'air sont retranscrits dans la Loi n°96-1236 du 30 décembre 1996 sur l'Air et l'Utilisation Rationnelle de l'Energie (LAURE) et le Code de l'environnement (articles R221-1 à R221-3) régulièrement mis à jour, conformément aux directives européennes relatives à la pollution atmosphérique (**Tableau I.1**). Ainsi, afin de lutter contre la pollution particulaire et de réduire les polluants précurseurs (oxydes d'azote, ammoniac), la France redouble d'efforts et un « plan particules », a été publié en juillet 2010 à la suite du Grenelle de l'Environnement (Grenelle 2). Il donne notamment pour objectif la diminution de 30% des émissions de PM_{2.5} en 2015 (**Tableau I.1**).

Tableau I.1: Normes européennes et françaises de qualité de l'air. D'après *Union Européenne 2008; AirParif*.

Polluants	Valeurs limites	Objectifs	Seuil de recommandation et d'information	Seuil d'alerte
Normes européennes				
PM10	En moyenne annuelle : 40 µg/m ³ . En moyenne journalière : 50 µg/m ³ à ne pas dépasser plus de 35 jours par an.			
PM2.5	En moyenne annuelle : <u>Phase 1</u> : 28 µg/m ³ pour l'année 2008, décroissant linéairement chaque année pour atteindre 25 µg/m ³ en 2015. <u>Phase 2</u> : 20 µg/m ³ en 2020 [£] .	Valeur cible pour la protection de la santé : 25 µg/m ³ en moyenne annuelle (devait être respectée le 1er janvier 2010) Concentration qui doit être respectée en 2015 : 20 µg/m ³ pour l'IEM (indice d'exposition moyenne)		
Normes françaises				
PM10	En moyenne annuelle 40 µg/m ³ En moyenne journalière : 50 µg/m ³ à ne pas dépasser plus de 35 jours par an.	30 µg/m ³ en moyenne annuelle 20 µg/m ³ pour l'IEM 2015 [§]	50 µg/m ³ en moyenne journalière	80 µg/m ³ en moyenne journalière
PM2.5	En moyenne annuelle : 28 µg/m ³ pour l'année 2008, décroissant linéairement chaque année pour atteindre 25 µg/m ³ en 2015.	10 µg/m ³ en moyenne annuelle		
<p>[£] valeur limite indicative qui sera révisée par la commission européenne en 2013 à la lumière des informations complémentaires sur l'impact sanitaire et environnemental, la faisabilité technique et l'expérience acquise en matière de valeur cible dans les États membres</p> <p>[§] IEM 2015 : Indicateur d'exposition moyenne de référence, correspondant à la concentration moyenne annuelle en µg/m³ sur les années 2013, 2014 et 2015.</p>				

I.2) LES VOIES RESPIRATOIRES : CIBLE PRINCIPALE DES PARTICULES ATMOSPHERIQUES

Lors de la respiration, un adulte au repos inspire et expire environ 6 à 10 litres d'air par minute et peut atteindre 200 litres par minute lorsque la respiration s'accélère pendant l'effort. Chaque jour, nous inspirons en moyenne 15 m³ d'air. Les particules atmosphériques sont en suspension dans l'air que nous respirons, le tractus respiratoire est donc la principale voie d'entrée des PM dans l'organisme.

I.2.1) Caractéristiques de l'appareil respiratoire

I.2.1.i) Anatomie de l'appareil respiratoire

D'un point de vue anatomique, **le tractus respiratoire** s'étend des fosses nasales jusqu'aux alvéoles pulmonaires. Il est constitué : du nez et des fosses nasales, du pharynx, du larynx, de la trachée, des bronches, des bronchioles, des poumons, de la plèvre, et des muscles respiratoires (muscles intercostaux et diaphragme, **Figure I.8**).

Les voies aériennes peuvent être séparées en deux parties :

- **les voies aériennes supérieures** ou extra-thoraciques, qui vont du nez jusqu'à la partie extra-thoracique de la trachée ;
- **les voies aériennes inférieures** s'étendent de la partie thoracique de la trachée aux bronchioles pulmonaires, elles contiennent l'arbre bronchique dans lequel ont lieu les échanges gazeux caractéristiques de la respiration.

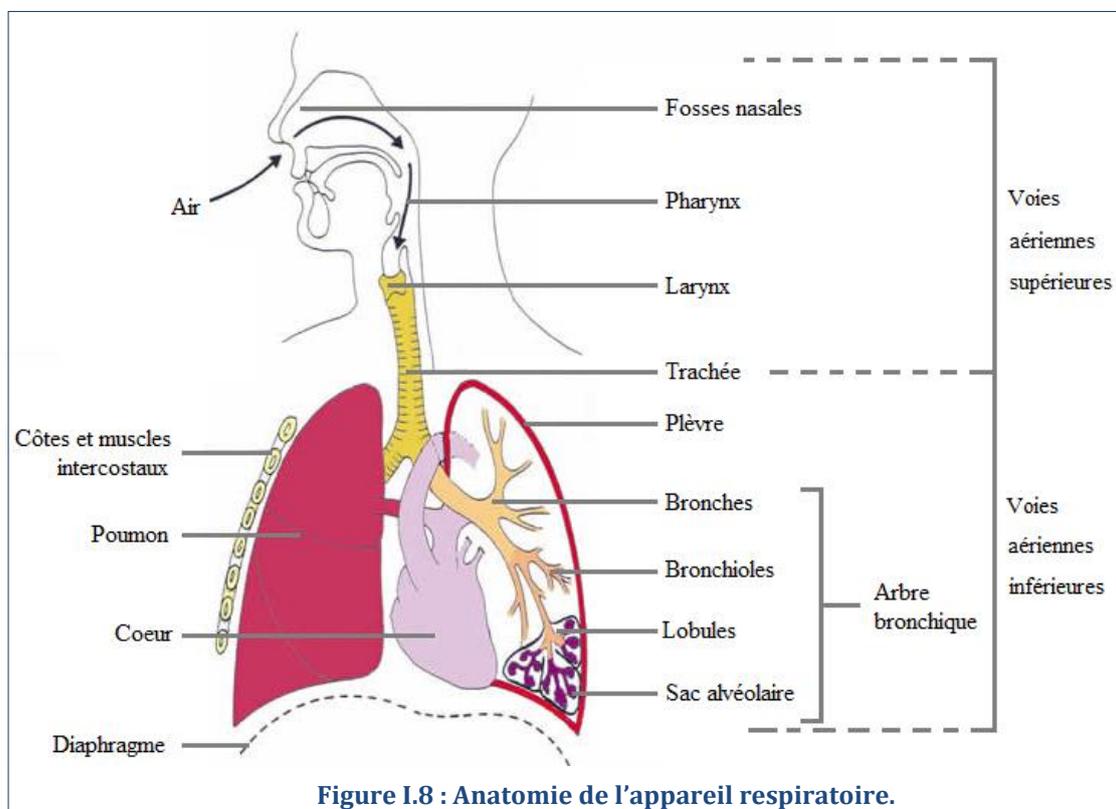


Figure I.8 : Anatomie de l'appareil respiratoire.

D'un point de vue physiologique, l'appareil respiratoire est subdivisé en trois parties :

- **La zone de conduction** : des fosses nasales jusqu'aux grosses bronches.

- **La zone de transition** qui comprend des bronches et bronchioles partiellement alvéolées.
- **La zone respiratoire ou zone de diffusion**, constituée des sacs alvéolaires.

La **zone de conduction** a pour rôle le conditionnement de l'air. Les fosses nasales sont constituées de proéminences osseuses, nommées cornets, permettant d'augmenter la surface de contact entre l'air inspiré et la muqueuse nasale, la surface de contact atteignant ainsi 120 cm². L'air est ensuite transporté à travers la **zone de conduction**, dans les bronches, qui se subdivisent en bronches et bronchioles de plus en plus petites, atteignant une surface de 1 à 2 m². L'air va finir sa course dans les **alvéoles pulmonaires** où la surface d'échange gazeux est supérieure à 80 m². Les échanges gazeux permettant de fournir l'oxygène au sang et d'éjecter le dioxyde de carbone se font grâce à un processus de diffusion passive à travers les parois alvéolaires.

I.2.1.ii) Histologie de l'appareil respiratoire

La muqueuse respiratoire est présente des fosses nasales jusqu'aux bronchioles terminales intra-pulmonaires. La muqueuse respiratoire est constituée de : l'épithélium respiratoire ; d'une lame basale constituée par un tissu conjonctif dense riche en Collagène IV (*lamina densa*) et en laminine (*lamina lucida*) et du chorion qui comprend un tissu conjonctif lâche, vascularisé et innervé reposant sur une couche fibro-cartilagineuse constituant le squelette du larynx, de la trachée et des bronches.

L'épithélium respiratoire tapisse l'arbre respiratoire des fosses nasales jusqu'aux alvéoles, il constitue une barrière physique entre l'intérieur et l'extérieur de l'organisme. L'intégrité de cette barrière repose sur l'existence de plusieurs types de jonctions entre les cellules épithéliales et/ou la matrice extracellulaire (jonctions adhérentes, desmosomes, hémidesmosomes) qui maintiennent l'unité structurale et mécanique de l'épithélium ; les jonctions gap quant à elles permettent le passage de petites molécules entre les cellules.

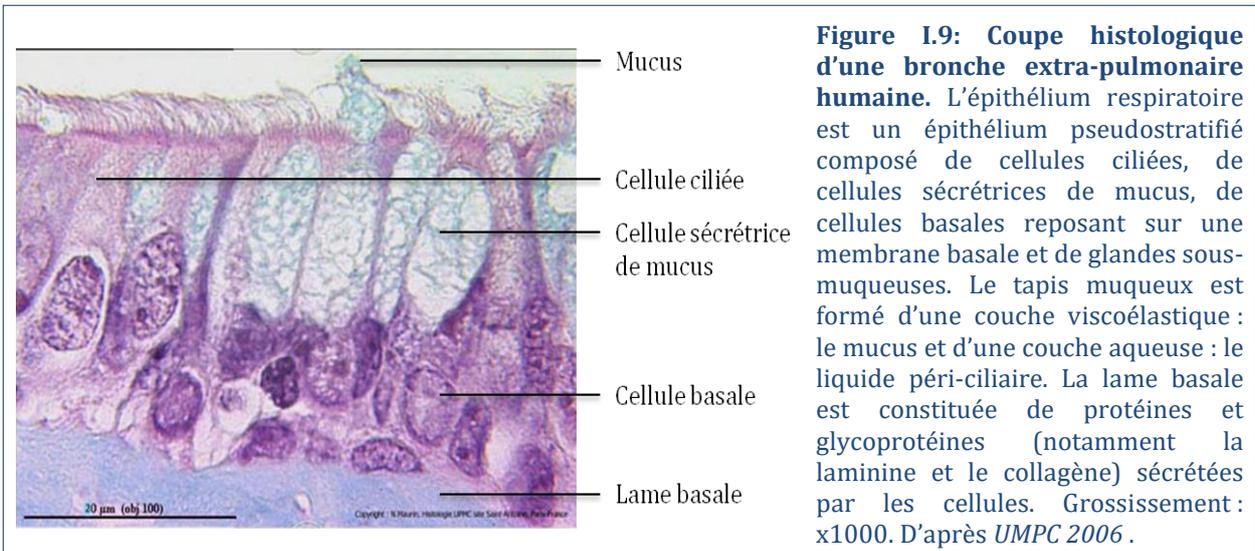
L'épithélium exerce d'autres fonctions essentielles comme la défense contre les agressions et les infections *via* la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, et l'élimination des particules inhalées *via* le transport mucociliaire.

L'épithélium respiratoire est constitué de divers types cellulaires qui diffèrent non seulement dans leur localisation mais aussi dans leurs fonctions et leur sensibilité aux toxiques. La structure cellulaire des voies aériennes supérieures et des bronches est très différente de celle des alvéoles pulmonaires : l'épithélium des fosses nasales jusqu'aux bronchioles respiratoires est cylindrique, pseudostratifié, cilié et muco-sécréteur ; tandis que l'épithélium des alvéoles est monostratifié et ne secrète pas de mucus (**Figures I.9 et I.10**).

➤ **L'épithélium respiratoire**

Constitué de cellules ciliées, cellules sécrétrices, cellules de Clara, cellules caliciformes et cellules basales (**Figure I.9**) au sein de la muqueuse respiratoire, l'épithélium n'est pas uniforme. Les deux bronches souches ont la même structure que la trachée, puis, au fur et à mesure de la diminution de leur diamètre, les bronchioles présentent de moins en moins de

cartilage, de cils et de cellules à mucus, leur structure histologique se modifie pour ressembler de plus en plus à celle des tissus de la zone d'échange gazeux au niveau des alvéoles pulmonaires.



Les cellules basales représentent un tiers des cellules épithéliales. Ce sont de petites cellules plates n'atteignant pas le pôle apical et sont reliées par des hémidesmosomes à la matrice extracellulaire. Les cellules basales sont considérées comme les **cellules souches épithéliales** capables de générer tous les autres types cellulaires de l'épithélium (*Sullivan et al. 2010*).

Les cellules ciliées sont les cellules les plus abondantes de l'épithélium, elles sont retrouvées des fosses nasales jusqu'aux bronchioles. Chaque cellule ciliée contient environ **200 cils** (de 5 à 7 µm de long pour 0,2 µm de diamètre), ainsi que des **microvillosités** (de 0,2 à 0,3 µm de long) insérées entre les cils vibratiles. Le battement coordonné des cils, tournés vers la lumière bronchique, permet la propulsion du mucus vers le larynx. Le nombre de cellules ciliées, la vitesse de battement et la longueur des cils diminuent en descendant dans l'arbre bronchique.

Les cellules sécrétrices de mucus, ou cellules caliciformes, sont semblables à celles retrouvées au niveau de l'intestin. Disséminées parmi les cellules ciliées, elles contiennent des granules de sécrétion et contribuent, avec les glandes sous-muqueuses, à la production du mucus. Le nombre de cellules caliciformes diminue en descendant dans l'arbre bronchique et elles sont progressivement remplacées par les cellules de Clara au niveau des bronchioles.

Les cellules de Clara sont des **cellules de transition** entre celles des voies de conduction et celles de la zone d'échange gazeux. Ce sont des cellules pyramidales, avec des microvillosités courtes et irrégulières, elles contiennent des grains de sécrétion. Leur rôle est de protéger et maintenir l'épithélium bronchique en sécrétant notamment des protéines, des oxydases, ainsi que des composants du surfactant alvéolaire. Ces cellules présentent également des **potentialités de cellules souches** (*Sullivan et al. 2010*).

➤ **La paroi alvéolaire**

Afin de permettre la diffusion optimale des gaz et leur transport entre les poumons et le sang, la paroi alvéolaire est très mince et étroitement reliée aux capillaires sanguins (**Figure**

I.10). La surface de la paroi alvéolaire est tapissée d'une simple couche de cellules pavimenteuses, nommées **pneumocytes de type I** qui représentent 90% de la surface des alvéoles (mais 40% en terme de nombre de cellules) et jouent un rôle essentiel dans les échanges gazeux entre l'air des alvéoles et les capillaires sanguins. Il existe également des **pneumocytes de type II**, de forme cubique ou ronde, qui occupent 10% de la surface des alvéoles (mais 60% du nombre de cellules) et qui sont capables de se multiplier et se différencier en pneumocytes de type I. Les pneumocytes de type II sécrètent le surfactant, une substance tensioactive tapissant la face luminale, pour faciliter l'expansion des alvéoles à l'inspiration et les maintenir ouvertes pendant l'expiration. Enfin, les alvéoles contiennent également des **fibroblastes** responsables de la synthèse du collagène, des **lymphocytes**, et des **macrophages** jouant un rôle fondamental dans les mécanismes de défense et de clairance alvéolaire (voir § I.2.3.i).

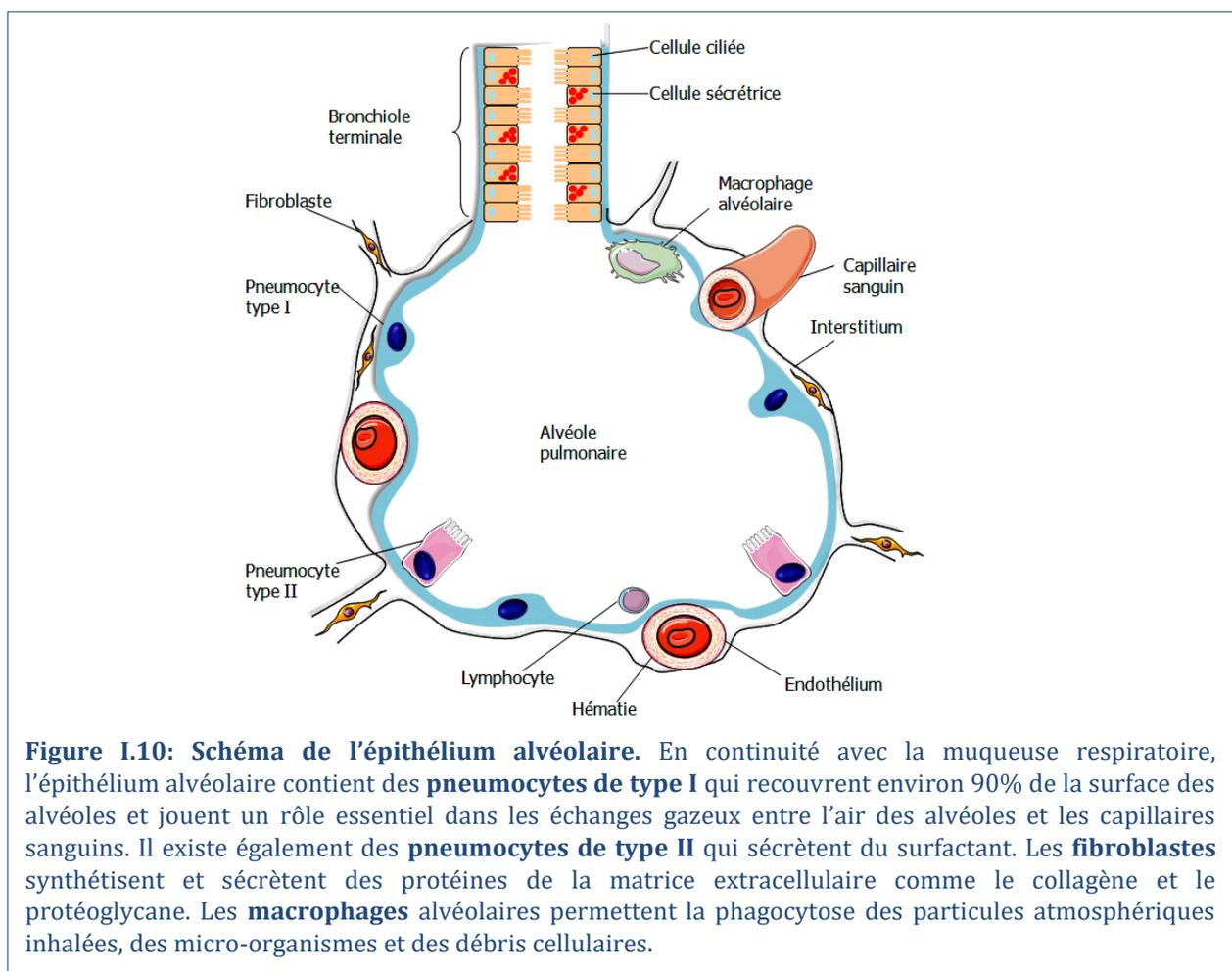


Figure I.10: Schéma de l'épithélium alvéolaire. En continuité avec la muqueuse respiratoire, l'épithélium alvéolaire contient des **pneumocytes de type I** qui recouvrent environ 90% de la surface des alvéoles et jouent un rôle essentiel dans les échanges gazeux entre l'air des alvéoles et les capillaires sanguins. Il existe également des **pneumocytes de type II** qui sécrètent du surfactant. Les **fibroblastes** synthétisent et sécrètent des protéines de la matrice extracellulaire comme le collagène et le protéoglycane. Les **macrophages** alvéolaires permettent la phagocytose des particules atmosphériques inhalées, des micro-organismes et des débris cellulaires.

I.2.2) Déposition des particules dans l'appareil respiratoire

I.2.2.i) Mécanismes de déposition des particules dans l'appareil respiratoire

La déposition des particules dans le tractus respiratoire se fait par 4 types de mécanismes (**Figure I.11**, Heyder 2004; depoussierage.fr).

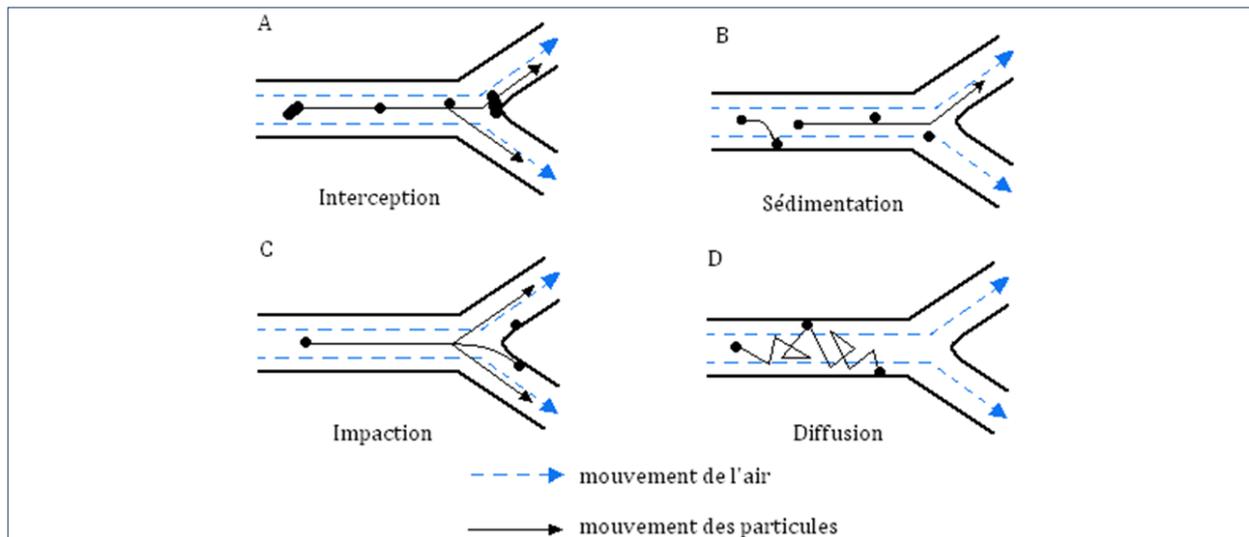


Figure I.11 : Différents mécanismes de déposition des PM dans le tractus respiratoire Humain.

La déposition des particules dans le tractus respiratoire se fait par 4 types de mécanismes :

A) Interception : la particule entre en contact avec la paroi respiratoire lorsqu'elle se déplace proche de la paroi ou lors des bifurcations des voies aériennes, cela concerne surtout les particules fibreuses (comme l'amiante) ou les agrégats.

B) Impaction : au niveau des bifurcations bronchiques, les particules en suspension peuvent s'échapper du flux d'air en raison de leur inertie et continuer leur chemin pour s'impacter sur la paroi se trouvant sur leur trajectoire. La probabilité d'impaction dépend de la vitesse de l'air inspiré et de la taille de la particule, ce phénomène touche surtout les particules de taille supérieures à 0,5 µm.

C) Sédimentation : en raison des forces de frottements de l'air, les PM finissent par perdre leur flottabilité dans l'air et « tombent » sur la paroi sous l'effet de la gravité. Ce phénomène est lié à la masse des particules et concerne essentiellement les particules de taille supérieures à 0,5 µm.

D) Diffusion : ce phénomène concerne les particules les plus fines (inférieures à 0,5 µm), qui ont un mouvement aléatoire, semblable au mouvement brownien. Plus la particule est petite, plus cette agitation est énergique et peut provoquer le dépôt de particules sur les parois de manière aléatoire, essentiellement dans les bronchioles et les alvéoles.

Le dépôt des particules inhalées dans les voies respiratoires est influencé par de nombreux facteurs tels que l'âge, la respiration, les conditions météorologiques et les propriétés des particules, résumés dans le **Tableau I.2**.

Tableau I.2 : Paramètres influençant la déposition des PM.

Paramètres influençant la déposition des PM	Références bibliographiques
<ul style="list-style-type: none"> • Les conditions météorologiques. 	<i>Fernandez Tena et al. 2012; Xi et al. 2013</i>
<ul style="list-style-type: none"> • La vitesse et intensité de la respiration : rapide ou lente, forte ou faible, par le nez ou la bouche, au repos ou pendant un effort physique. 	<i>Kim, C.S. et al. 1998; Oravisjarvi et al. 2011</i>
<ul style="list-style-type: none"> • La géométrie des voies aériennes : l'anatomie de l'appareil respiratoire est notamment différente chez l'homme et la femme ainsi que chez l'enfant et l'adulte. 	<i>Kim, C.S. et al. 1998; Bennett et al. 2003; Bennett et al. 2008</i>
<ul style="list-style-type: none"> • Les conditions physiques de l'individu (âge, état de santé...). 	<i>Kim, C.S. et al. 1997; Darquenne 2012; Horemans et al. 2012; Londahl et al. 2012</i>
<ul style="list-style-type: none"> • La taille, la forme et les propriétés physico-chimiques des PM. 	<i>Carvalho et al. 2011; Fernandez Tena et al. 2012 (Figures I.11 et I.12)</i>

1.2.2.ii) Modèles mathématiques

Il existe plusieurs modèles mathématiques permettant de prédire le dépôt des particules dans l'appareil respiratoire. Le plus reconnu est celui de l' « International Commission on Radiological Protection » (ICRP, **Figure I.12**, *Oberdorster et al. 2002; Oberdorster et al. 2005*). Ce modèle s'applique pour une respiration nasale, au repos, chez un homme, et pour un aérosol monodispersé sans agrégats. Ainsi, dans ce contexte, les particules supérieures à 1 μm se déposent quasi-exclusivement dans la région nasopharyngée (principalement par interception) de même que les particules ultrafines inférieures à 1 nm (dû à leur mouvement similaire à des gaz). Enfin, les particules capables de se déposer au niveau trachéal et alvéolaire ont des tailles comprises entre 1 nm et 0,1 μm .

Tous les modèles mathématiques tiennent compte au maximum des facteurs influençant la déposition des PM (**Tableau I.2**), ce qui leur permet d'être généralement très concordant avec les observations *in vivo* (*Churg et al. 1997; Farhadi Ghalati et al. 2012*). Ainsi, les études de même que les modèles mathématiques montrent que la déposition des particules est très inégale et présente des zones de dépôt très localisées appelées « hot spot » (*Balashazy et al. 2003; Phalen et al. 2010*).

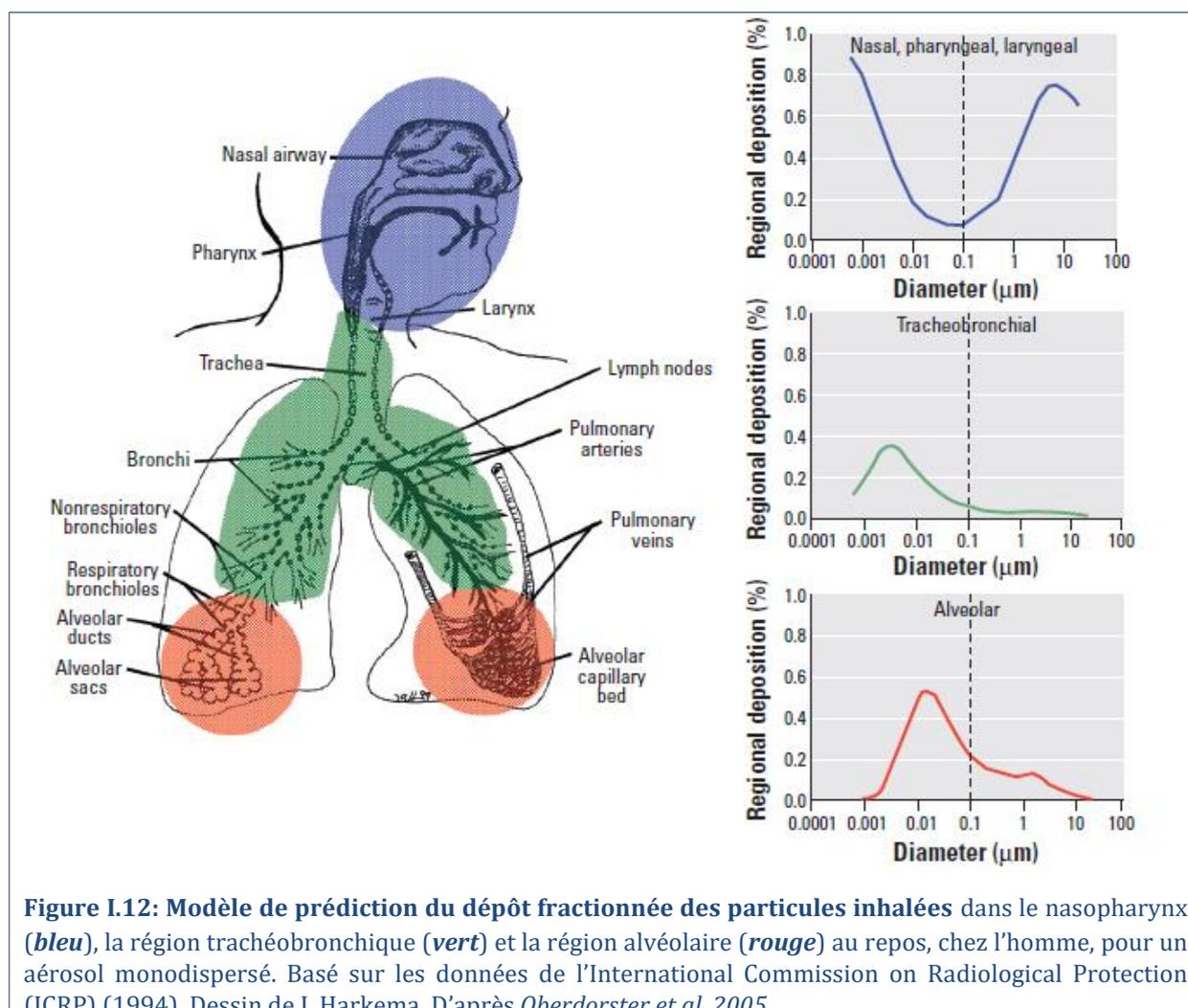


Figure I.12: Modèle de prédiction du dépôt fractionnée des particules inhalées dans le nasopharynx (*bleu*), la région trachéobronchique (*vert*) et la région alvéolaire (*rouge*) au repos, chez l'homme, pour un aérosol monodispersé. Basé sur les données de l'International Commission on Radiological Protection (ICRP) (1994). Dessin de J. Harkema. D'après *Oberdorster et al. 2005*.

I.2.3) Devenir des particules dans l'appareil respiratoire et l'organisme

Les particules déposées dans l'appareil respiratoire peuvent être i) épurées *via* la clairance respiratoire (mucociliaire et alvéolaire) ; ii) phagocytées par les cellules épithéliales ; iii) transloquées vers d'autres régions de l'organisme ; ou iv) retenues au sein de l'appareil respiratoire (**Figure I.13**).

I.2.3.i) Elimination par la clairance respiratoire

La clairance respiratoire comprend une première phase rapide (moins de 36 heures) : **la clairance mucociliaire**, qui a lieu dans la zone de conduction et la zone de transition de l'arbre respiratoire, et une phase plus lente (jusqu'à plusieurs mois) : **la clairance alvéolaire**, qui a lieu dans la zone respiratoire. En effet, des études réalisées chez l'Homme ont mis en évidence une rétention bronchique de 11% (*Roth et al. 1997*) et parmi ces particules retenues, la moitié est épurée de manière rapide (24 heures après inhalation) grâce à l'épithélium mucociliaire et l'autre moitié est retenue à long terme (plusieurs mois).

➤ La clairance mucociliaire

La clairance mucociliaire, qui est un processus de l'immunité innée, est assurée, dans l'arbre trachéobronchique, grâce au **mucus**, produit par les cellules sécrétrices et les glandes sous-muqueuses, et au **battement coordonné des cils** des cellules ciliées.

Le liquide de surface des voies aériennes comprend 2 phases :

- **La phase « GEL »** ou **mucus** est une couche visco-alcoolique dans laquelle s'accrochent les impuretés et les agents pathogènes de l'air inspiré. Son épaisseur varie de 7 à 70 μm , et l'extrémité des cils baigne dedans (**Figure I.9**). Le mucus est composé d'eau (à plus de 95%) et d'électrolytes comme les ions sodium et chlore (1%), permettant de maintenir l'état d'hydratation des voies aériennes ; de glycoprotéines filamenteuses riches en sucres (2%) : les **mucines** qui forment un réseau macromoléculaire ; de protéines (1%), possédant des propriétés antimicrobiennes (IgA, lysozyme, transferrine) ; de lipides et lipoprotéines (1%). Cette composition donne des propriétés viscoélastiques et antibactériennes au mucus.
- **La phase « SOL »** ou **liquide péri-ciliaire** est une fine couche aqueuse dans laquelle baignent les cils et sur laquelle repose la couche « GEL ». Son épaisseur est légèrement plus fine que la longueur des cils (à peu près 7 μm , **Figure I.9**). Sa composition comprend de l'eau et des électrolytes qui permettent de maintenir l'épaisseur nécessaire au mouvement mucociliaire puisque le mucus est traversé seulement par les pointes ciliaires lors la phase de propulsion (*Sleigh 1983*). Ainsi, une épaisseur trop importante de liquide péri-ciliaire empêcherait les cils d'atteindre le mucus, tandis qu'une trop faible épaisseur bloquerait le mouvement des cils piégés dans trop de mucus. Ce liquide contient également des anti-oxydants, comme le glutathion, la superoxyde dismutase (SOD) et la catalase, qui contribuent aux mécanismes de défense contre les agents infectieux, les xénobiotiques et les radicaux libres.

La majorité des impuretés de l'air inspiré iront se fixer sur le mucus qui sera transporté vers le larynx, à une vitesse d'environ 15 mm/min, grâce au battement des cils, puis sera expectoré ou avalé. Les cils battent à une vitesse de 100 à 1500 battements/min, mais la présence de certains toxiques peut influencer sur la vitesse de battement des cils ainsi que la production de mucus.

➤ **La clairance alvéolaire**

Si des impuretés ou des agents pathogènes arrivent jusqu'aux alvéoles pulmonaires, la clairance alvéolaire se met en place, les macrophages et les pneumocytes coordonnent leurs actions de défense pour produire des médiateurs pro-inflammatoires (notamment des cytokines et des protéines du surfactant), grâce au :

- **système immunitaire inné** où les macrophages phagocytent les impuretés et les agents pathogènes puis remontent dans l'escalator mucociliaire, ou traversent la paroi alvéolaire vers l'interstitium et le système lymphatique ;
- **système immunitaire acquis**, où les cellules épithéliales et les macrophages présentent un antigène spécifique aux lymphocytes T induisant leur prolifération et la réponse immunitaire, par la production de cytokines (interleukines, interférons, TNF) capables de stimuler l'immunité humorale et/ou cellulaire (production de lymphocytes B et anticorps).

1.2.3.ii) Phagocytose par les cellules épithéliales

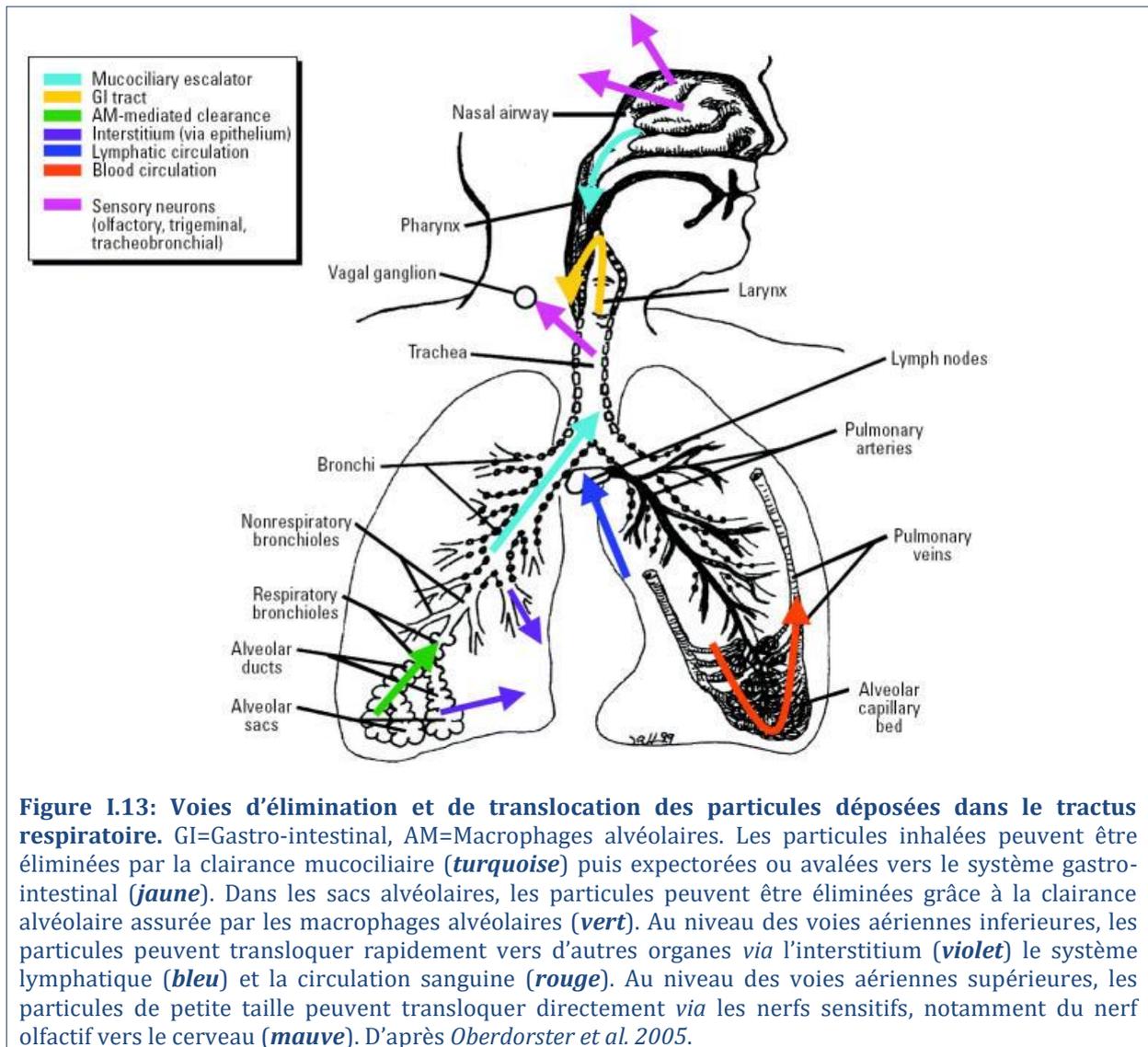
Lorsque les mécanismes de clairance sont dépassés ou que les PM passent au travers, les cellules épithéliales respiratoires peuvent elles aussi phagocyter les particules (*Churg 1996*). La phagocytose des particules par les cellules épithéliales respiratoires augmente avec la dose des PM et est observée plus fréquemment là où la clairance est faible, c'est-à-dire au niveau des bronchioles pulmonaires et des bifurcations.

Plusieurs études ont montré que la liaison des PM à la surface cellulaire et l'activation de la phagocytose est liée à la charge des particules, la liaison avec des récepteurs, la présence de protéines à la surface des PM, et l'implication du cytosquelette et des microtubules (*Churg 1996; Gehr 2010*). Les espèces réactives de l'oxygène (ERO) jouent aussi un rôle important dans l'internalisation des PM. En effet, dans des conditions normales, la faible production de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) par les cellules épithéliales a pour conséquence une activation autocrine et involontaire des mécanismes d'internalisation, le même effet est observé avec les ERO produits par les PM et les cellules de l'inflammation (*Davis et al. 1994; Gehr 2010*).

1.2.3.iii) Translocation

Une fois déposées dans le tractus respiratoire et phagocytées, les particules peuvent transloquer rapidement vers d'autres organes *via* l'interstitium puis la circulation sanguine, ou bien *via* le système lymphatique (*Oberdorster et al. 2002; Oberdorster et al. 2005; Gehr 2010, Figure I.13*). Ainsi des PM ont été retrouvées dans le foie, les reins, la rate et le cœur (*Moller et al. 2008; Furuyama et al. 2009*). Les particules plus fines peuvent aussi transloquer directement

via les neurones sensoriels, et atteindre d'autres organes, notamment le cerveau par le nerf olfactif (Oberdorster et al. 2005; Elder et al. 2006).



I.2.3.vi) Rétention

Les particules inhalées s'accumulent rapidement dans les cellules de l'appareil respiratoire. Plusieurs études réalisées chez l'Homme avec des particules marquées radioactivement ont permis de montrer que les particules déposées dans l'appareil respiratoire ne sont épurées que partiellement par les mécanismes de clairance : entre 20% et 80% de PM sont épurées suivant les études (Churg et al. 1997; Brauer et al. 2001; Moller et al. 2008). Ainsi, une étude de Churg et Brauer a permis l'observation de coupe de parenchymes pulmonaires de femmes ayant vécu à Vancouver, ville peu polluée ($14 \mu\text{g}/\text{m}^3$ de PM₁₀), ou à Mexico, ville très polluée ($66 \mu\text{g}/\text{m}^3$ de PM₁₀). Cette étude met en évidence une accumulation de PM dix fois plus grande chez les habitantes de Mexico, ainsi qu'un remodelage des parois bronchiques (Brauer et al. 2001; Churg et al. 2003, Figure I.14).

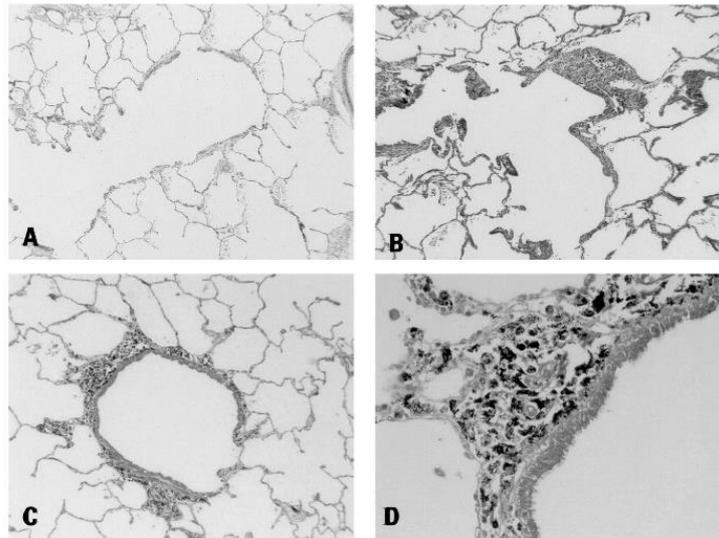


Figure I.14: Coupes de parenchymes pulmonaires de femmes ayant vécu à Vancouver (A) ou Mexico City (A, B, C). Le poumon de Vancouver a une paroi très mince, tandis que celui de Mexico City présente une paroi épaissie avec une accumulation de particules. Grossissements : x50 pour A, B et C, x200 pour D. D'après *Churg et al. 2003*.

I.3) EFFETS DES PARTICULES ATMOSPHERIQUES SUR LA SANTE HUMAINE

Les effets sanitaires de la pollution atmosphérique ont été évalués en premier lieu par les études épidémiologiques qui ont mis en évidence des liens statistiques entre l'exposition aux PM (lors d'un épisode de pollution élevée par exemple) et divers paramètres de la santé humaine (comme l'augmentation des maladies respiratoires dans une même ville). Les études épidémiologiques présentent l'avantage d'observer les individus dans leur environnement, bien que celui-ci puisse être complexe, mais apportent plusieurs facteurs confondants aux interprétations obtenues. Dans un second temps, les études toxicologiques expérimentales *in vitro* (sur des cultures de cellules) et *in vivo* (sur des animaux de laboratoire ou sur des volontaires lors de tests cliniques) permettent de confirmer les liens de causes à effets, de mieux comprendre et de décrypter les mécanismes biologiques impliqués. Le principal inconvénient réside dans l'étude d'une variable unique (présence ou absence de la molécule toxique) pouvant être responsable des effets observés. Ces deux approches scientifiques ont néanmoins clairement démontré les effets délétères de la pollution atmosphérique, en particulier la pollution particulaire, sur la santé humaine (*Boland, Sonja et al. 2001*).

I.3.1) Etudes épidémiologiques

I.3.1.i) Effets des pics de pollution

Depuis les années 1950, de nombreuses études épidémiologiques ont permis d'établir un lien évident entre la pollution particulaire et l'augmentation de la mortalité et de la morbidité (admission à l'hôpital) d'origines respiratoires et cardio-vasculaires (*Mills 1951; Mahoney 1976; Schwartz 1994*). Ainsi, à Chicago entre 1988 et 1993, le nombre d'hospitalisations a montré une corrélation entre une augmentation de 10 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ en PM₁₀ et la morbidité pour causes

cardiaques (+ 1,3%), d'obstructions pulmonaires (+ 1,4%) et de pneumonies (+ 2%) (*Schwartz 2001*). De plus, une étude sur les habitants de l'Utah a mis en évidence une augmentation de 16% de la mortalité journalière lorsqu'il y a une augmentation de 100 µg/m³ en PM₁₀ durant 5 jours d'affilée (*Pope et al. 2002*).

Le premier projet APHEA (« Air Pollution and Health: a European Approach ») a clairement montré que, pour tous les polluants étudiés (les particules en suspension, le SO₂, les oxydes d'azote et l'ozone), une élévation du polluant de 10 µg/m³ provoque une augmentation de la mortalité journalière toutes causes confondues, d'origines cardiovasculaires ou d'origines respiratoires de 0,52%, 0,76% et 0,71%, respectivement (*Katsouyanni et al. 1997*). Le second projet APHEA2, initié en 1998, a permis de corrélérer une augmentation de 10 µg/m³ du niveau journalier de PM₁₀ avec une augmentation des hospitalisations pour asthme et BPCO entre 1 et 1,2% (*Atkinson et al. 2001*). Une étude plus récente appelée APHENA (« Air Pollution and Health: a European and North American Approach ») s'est basée sur les données des projets européens APHEA1 et 2, de l'étude américaine NMMAPS (« National Morbidity, Mortality, and Air Pollution Study ») et d'une étude canadienne (*Katsouyanni et al. 2009*). Les estimations des risques en provenance d'Europe et des États-Unis étaient similaires, mais celles du Canada étaient sensiblement plus élevées. L'effet combiné des PM₁₀ sur la mortalité, toutes causes et tous âges confondus, varie de 0,2% à 0,6% pour une augmentation de 10 µg/m³.

Concernant les particules fines, une étude de 2006 a également mis en évidence une corrélation entre une hausse de la mortalité journalière de 0,6 % et une augmentation de 10 µg/m³ de la concentration en PM_{2.5} (*Ostro et al. 2006*).

I.3.1.ii) Effets de la pollution de fond

Les études à long terme explorent l'effet d'une exposition constante aux PM sur les fonctions pulmonaires, le développement de bronchites chroniques, le risque de cancer du poumon et la mortalité d'origine cardiorespiratoire. Ainsi, il a été mis en évidence que les effets de l'exposition à long terme à la pollution atmosphérique sont plus importants que ceux liés à l'exposition à court terme (*INVS Extrapol 2006*). En 2002, Pope et collaborateurs montrent pour la première fois qu'une augmentation de 10 µg/m³ en PM_{2.5}, à long terme, est liée à l'augmentation de la mortalité toutes causes confondues, d'origines cardio-pulmonaires ou d'origines respiratoires de 4%, 6% et 0,71%, respectivement. Les auteurs soulignent également que 8% de la mortalité par cancers du poumon seraient imputables aux particules fines (*Pope et al. 2002*).

Par la suite, les études épidémiologiques ont montré qu'une exposition chronique à la pollution atmosphérique augmente la prévalence des maladies respiratoires chroniques telles que l'asthme (*Rage et al. 2009*), la BPCO et les réactions allergiques (rhinites, toux, otites...) (*Lindgren et al. 2009*), ainsi que les maladies cardiovasculaires (infarctus du myocarde). En effet, une méta-analyse de 36 études épidémiologiques a montré que parmi les déclencheurs les plus fréquents d'infarctus, la pollution de l'air arrive en tête de liste, devant l'effort physique et la consommation d'alcool (*Nawrot et al. 2011*). Enfin, une étude prédictive suggère que 11% des décès par cancer du poumon serait attribuable à la pollution atmosphérique en Ile de France (*AFSSE 2005*).

Les recherches les plus récentes ont permis de démontrer clairement que ces effets sur la santé apparaissent à des concentrations modérées de polluants que l'on retrouve dans toutes les villes de l'Union Européenne et qu'il n'existerait pas de seuil décelable en deçà duquel l'ozone et les particules fines polluants sont sans effets sur la santé humaine.

I.3.2) Les pathologies respiratoires

Les pathologies respiratoires peuvent être aiguës, causées directement par un toxique ou une inflammation, comme la bronchite, la rhinite allergique et la pneumonie ; ou chroniques, causées par une inflammation persistante ou à la rétention des particules, comme l'asthme et la BPCO (Broncho-Pneumopathie Chronique Obstructive).

L'asthme et la BPCO sont deux pathologies respiratoires qui ont en commun une inflammation chronique et l'obstruction des bronches, dues à la diminution du calibre des conduits respiratoires et à l'hypersécrétion de mucus. Cependant, la BPCO est une pathologie évolutive partiellement irréversible, qui se déclare après 40 ans et touche principalement les fumeurs ; tandis que l'asthme, qui touche des personnes plus jeunes, se caractérise par des crises récurrentes et peut être contenu par un traitement adapté (**Tableau I.3**).

Tableau I.3 : Comparatif entre l'asthme et la BPCO. D'après *Swissweb santé publique* .

	ASTHME	BPCO
Population touchée	Les non-fumeurs sont touchés. La fumée est le plus souvent mal tolérée.	Frappe en général les grands fumeurs.
Symptômes	Les symptômes commencent souvent pendant l'enfance.	Les symptômes se déclarent à partir de 40 ans.
	Les symptômes surviennent par crises.	Les symptômes augmentent sournoisement.
	Plus de la moitié des patients souffre d'allergies.	Elle n'est pas liée à des allergies.
	Toux, surtout nocturnes, plutôt sèches.	Toux, en particulier le matin, souvent avec expectoration.
	Difficulté respiratoire au repos, surtout le matin et la nuit.	Difficulté respiratoire seulement à l'effort.
Caractéristiques physiopathologiques :		
Epithélium	Fragile	Métaplasique
RBM	Epaissie	Non épaissie
Fibroses	Possible	Présent
Vaisseaux sanguins	Angiogenèse	Angiogenèse possible
Muscles lisses bronchiques	Epaissi	Epaissi
Glandes sous-muqueuses	Hypertrophiées	Hypertrophiées
Emphysème	Observée seulement chez les fumeurs	Caractéristique de la BPCO sévère

RBM= membrane basale épithéliale réticulaire ; Emphysème : destruction des parois alvéolaires.

La BPCO : Elle touche 5% à 19% de la population adulte de plus de 40 ans. Sa prévalence a augmenté de plus de 41% depuis 1982, et son taux de mortalité a augmenté de plus de 100% entre 1970 et 2002 (*Ling et al. 2009*). 80 à 90% des BPCO sont dues au tabagisme, actif ou passif, mais la pollution de l'air ainsi que les infections des voies respiratoires sont aussi des facteurs de

risques importants (OMS 2012). De récentes études associent plus précisément la pollution particulaire (notamment les PM10) à l'exacerbation de la BPCO (Gan et al. 2013).

L'asthme : Les causes de cette maladie sont un complexe mélange entre des prédispositions génétiques et des *stimuli* environnementaux. Cette complexité se traduit au niveau clinique par différents types d'asthmes : allergique, intrinsèque, d'effort, etc. (Di Giampaolo et al. 2011). L'inhalation de substances allergènes, de fumée de tabac et de produits chimiques irritants sont autant des facteurs déclencheurs de crises, que des facteurs de risque pour le développement de l'asthme (OMS 2013). Ainsi, de nombreuses études épidémiologiques ont montré qu'il existe un lien entre l'exposition à la pollution atmosphérique particulaire et le développement de l'asthme (principalement l'exposition pendant l'enfance, Jacquemin et al. 2012) ainsi que la survenue des crises (Schwartz et al. 1993; Di Giampaolo et al. 2011; To et al. 2013).

Le remodelage bronchique : L'asthme et la BPCO sont caractérisées par : l'inflammation, le remodelage bronchique et l'hypersécrétion de mucus (réversibles pour l'asthme et irréversibles pour la BPCO). Ces trois caractéristiques sont étroitement liées : une inflammation chronique ou répétée peut conduire à un remodelage bronchique, qui lui-même peut conduire à l'inflammation chronique et l'hypersécrétion de mucus (Enomoto et al. 2009; Girodet et al. 2011). Le remodelage bronchique joue un rôle important dans ces deux maladies. Il est défini comme l'épaississement de la paroi bronchique due à une variété de changements structurels tels que des lésions épithéliales, une fibrose de l'épithélium, l'augmentation des dépôts de protéines de la matrice extracellulaire, l'angiogenèse, l'hypertrophie des cellules à mucus et des glandes sous-muqueuses et l'augmentation de la masse musculaire lisse des voies aériennes (ASM) (Girodet et al. 2011). Néanmoins, il existe des différences entre ces deux maladies : le processus de remodelage, le type de cellules inflammatoires et de cytokines impliquées, ainsi que les localisations anatomiques prédominantes où ces changements se produisent (Tableau I.3, Figure I.15, Jeffery 2001).

Les allergies : La réaction allergique est une réaction anormale, inadaptée et excessive de l'organisme lors d'un contact avec une substance étrangère (allergène). Elle se manifeste par différents symptômes : asthme, rhinite, eczéma, urticaire, conjonctivite, etc., qui peuvent être présents de façon isolée, coexister, devenir chroniques, ou se succéder au fil du temps (Kim, B.J. et al. 2012; Lee et al. 2013). Généralement, l'allergie survient chez des individus génétiquement prédisposés bien que des facteurs environnementaux jouent également un rôle important dans le développement des allergies. Des études chez l'animal ont montré qu'une large gamme de particules en suspension, y compris la fumée de cigarette, les particules Diesel, des métaux, des composés organiques et des produits de combustion peut interférer avec les processus normaux de défense du poumon et contribuer à la sensibilité aux infections respiratoires ou aggraver des maladies allergiques (Gilmour et al. 2001). Les études épidémiologiques ont largement démontré le rôle de la pollution atmosphérique particulaire, liée principalement au trafic automobile (Polosa et al. 1999), dans le développement des allergies et la sensibilité aux allergènes (Heinrich et al. 2004; Di Giampaolo et al. 2011; Higgins, T.S. et al. 2012), notamment chez les enfants

(Schwartz 2004; Morgenstern et al. 2008; Kim, B.J. et al. 2012). Les mécanismes impliqués dans ces réactions sont : l'inflammation, le stress oxydant et les modifications épigénétiques (Kim, B.J. et al. 2012; Lee et al. 2013).

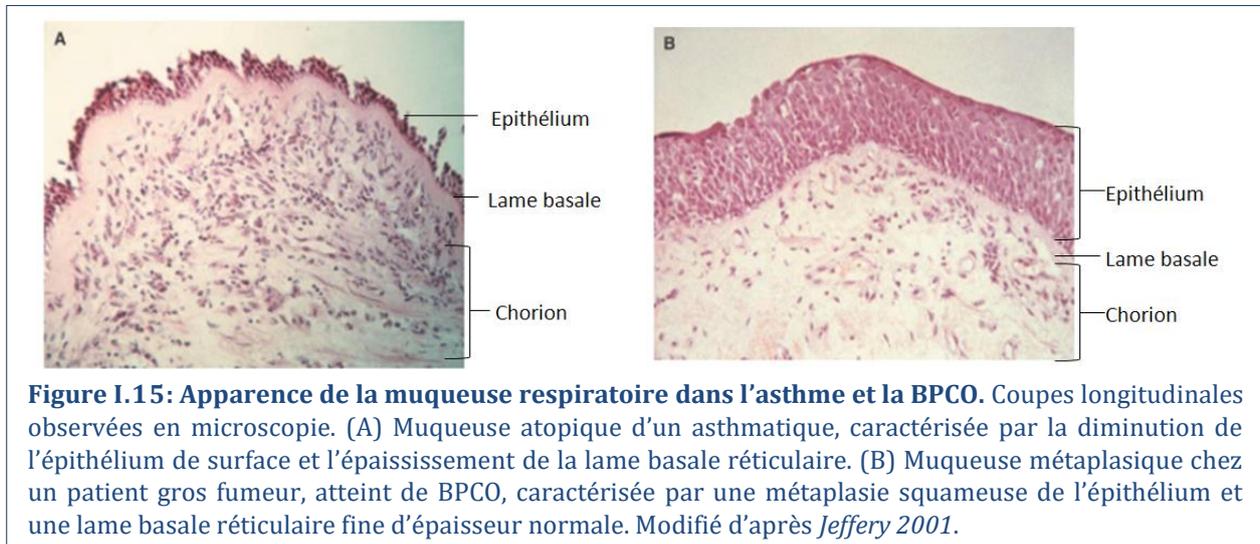


Figure I.15: Apparence de la muqueuse respiratoire dans l'asthme et la BPCO. Coupes longitudinales observées en microscopie. (A) Muqueuse atopique d'un asthmatique, caractérisée par la diminution de l'épithélium de surface et l'épaississement de la lame basale réticulaire. (B) Muqueuse métaplasique chez un patient gros fumeur, atteinte de BPCO, caractérisée par une métaplasie squameuse de l'épithélium et une lame basale réticulaire fine d'épaisseur normale. Modifié d'après Jeffery 2001.

I.3.3) Les pathologies cancéreuses

Parmi les pathologies cancéreuses liées à la pollution atmosphérique, les cancers pulmonaires sont les plus courants. Parmi eux, sont distingués le mésothéliome (cancer primitif de la plèvre) et les cancers broncho-pulmonaires (CBP) qui représentent la première cause de décès par cancer chez l'homme en France et dans le monde (*Registre des Cancers-Observatoire régional de la santé Poitou-Charentes 2013*). L'incidence des CBP reste en augmentation, notamment chez les femmes, en relation directe avec une augmentation du tabagisme, première cause étiologique (*Société française de pathologie 2012*).

I.3.3.i) Classification des cancers broncho-pulmonaires

Sur le plan histologique, les CBP se divisent en deux grands groupes, le carcinome à petites cellules (CPC, 17% des CBP primitifs) et les carcinomes non à petites cellules (CNPC, 83% des CBP primitifs). Cette dernière catégorie comprend, selon la classification de l'OMS 2004 toujours en vigueur, les carcinomes à cellules squameuses ou épidermoïdes, les adénocarcinomes, les carcinomes à grandes cellules, les carcinomes sarcomatoïdes, les tumeurs carcinoïdes et les tumeurs des glandes salivaires (**Tableau I.4, Figure I.16**). Les tumeurs primaires du poumon font des métastases préférentiellement vers les glandes surrénales, le foie, le cerveau et les os (*INC 2011; Travis et al. 2013*).

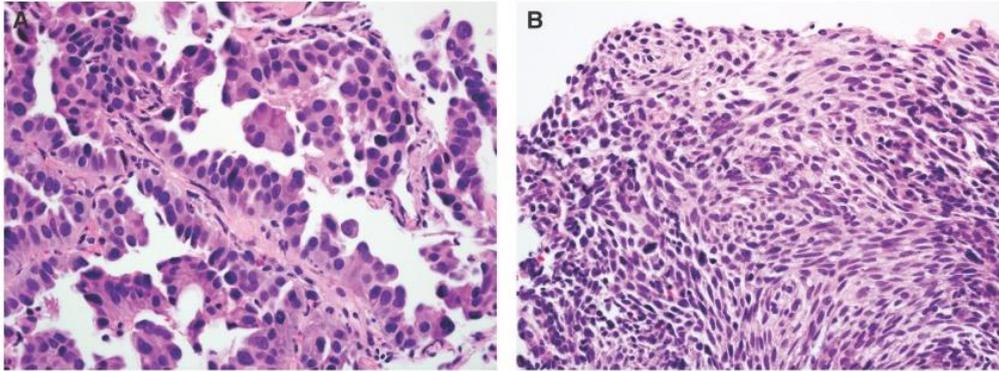


Figure I.16 : Coupes histologiques de tumeurs broncho-pulmonaires de type adénocarcinome (A) et carcinome à cellule squameuse (B). Coloration Hématoxyline et éosine (Travis et al. 2013).

Tableau I.4 : Classification histologique selon l'OMS (2004) des carcinomes broncho-pulmonaires. D'après INC 2011; Travis et al. 2013.

Carcinomes Pulmonaires à Petites Cellules (SCLC, 17%)	<ul style="list-style-type: none"> • Carcinome à petites cellules composite
Carcinomes Pulmonaires NON à Petites Cellules (NSCLC, 83%)	<ul style="list-style-type: none"> • Carcinomes à cellules squameuses (ou épidermoïdes, SCC) <ul style="list-style-type: none"> ○ papillaire ○ à cellules claires ○ basaloïde • Adénocarcinomes <ul style="list-style-type: none"> ○ de type mixte ○ acineux ○ papillaire ○ solide avec production de mucine • Carcinomes Broncho-alvéolaire <ul style="list-style-type: none"> ○ non-mucineux ○ mucineux ○ mixte non mucineux et mucineux ou intermédiaire • Carcinomes à grandes cellules <ul style="list-style-type: none"> ○ neuroendocrine à grandes cellules ○ neuroendocrine à grandes cellules composites ○ basaloïde ○ lympho-épithélioma-like ○ à cellules claires ○ à grandes cellules rhabdoïdes • Carcinomes adénosquameux • Carcinomes sarcomatoïdes <ul style="list-style-type: none"> ○ Carcinome pléiomorphe ○ Carcinome à cellules géantes ○ Carcinome à cellules fusiformes ○ Carcinosarcome ○ Blastome pulmonaire • Carcinoïdes <ul style="list-style-type: none"> ○ typique ○ atypique • Tumeurs de Type glandes salivaires <ul style="list-style-type: none"> ○ Carcinome muco-épidermoïde ○ Carcinome adénoïde kystique ○ Carcinome épithélial-myoépithélial • Lésions pré-invasives <ul style="list-style-type: none"> ○ Dysplasie et carcinome <i>in situ</i> ○ Hyperplasie alvéolaire atypique ○ Hyperplasie neuroendocrine diffuse idiopathique

Les carcinomes pulmonaires dérivent du tissu épithélial respiratoire sain qui va subir plusieurs lésions pré-néoplasiques de sévérité croissante. Ces différentes étapes de la cancérogénèse des CBP se traduisent par des évolutions histologiques associées à une augmentation de l'épaisseur du tissu épithélial, la perte de la progression de maturation des cellules, de l'anisocytose et du pléomorphisme (changement de taille et de forme des cellules) (*Kerr 2001*).

I.3.4.ii) Effet des particules atmosphériques

De nombreuses études épidémiologiques, réalisées depuis les années 1950 jusqu'à aujourd'hui, établissent un lien certain entre la pollution particulaire et les CBP (*Greenburg et al. 1967; Higgins, I.T. 1976; Yanagi et al. 2012*). Ainsi, une étude épidémiologique à grande échelle, nommée ESCAPE (« European Study of Cohorts for Air Pollution Effects »), a permis de déterminer une augmentation du risque de CBP en Europe avec un odds ratio (OR) de 1,22 suite à l'élévation de 10 µg/m³ en PM₁₀, et avec un OR de 1,18 suite à l'élévation de 5 µg/m³ en PM_{2.5} (*Raaschou-Nielsen et al. 2013*). Des études chinoises calculent un OR de 2.66, 3.05, et 1,42 pour le risque de CBP liés, respectivement, à l'exposition aux fumées de charbon utilisé pour le chauffage ou la cuisson (*Zhao, Y. et al. 2006*), la fumée de cigarette, et la pollution atmosphérique (*Li, H. et al. 2013*). Enfin, des études récentes établissent également un lien avec d'autres types de cancers (foie, reins, uterus, leucémies, *Raaschou-Nielsen et al. 2011; Vinceti et al. 2012*).

Le 17 octobre 2013, les nombreuses recherches scientifiques montrant un lien de cause à effet entre la pollution atmosphérique et les CBP ont conduit l'OMS à classer la pollution de l'air extérieur comme « cancérogène certain pour l'homme » (groupe 1) selon l'IARC (*IARC 2013*). Cette notation est basée sur plus de 1000 articles au niveau mondial et porte une attention particulière aux PM_{2.5}, qui après avoir été évaluées séparément, sont elles-mêmes classées cancérogène certain pour l'Homme. En effet, on estime que l'exposition aux particules fines a contribué mondialement à 3,2 millions de décès prématurés en 2010 dont 223 000 décès par cancer du poumon.

I.4) MECANISMES D' ACTIONS BIOLOGIQUES DES PARTICULES ATMOSPHERIQUES

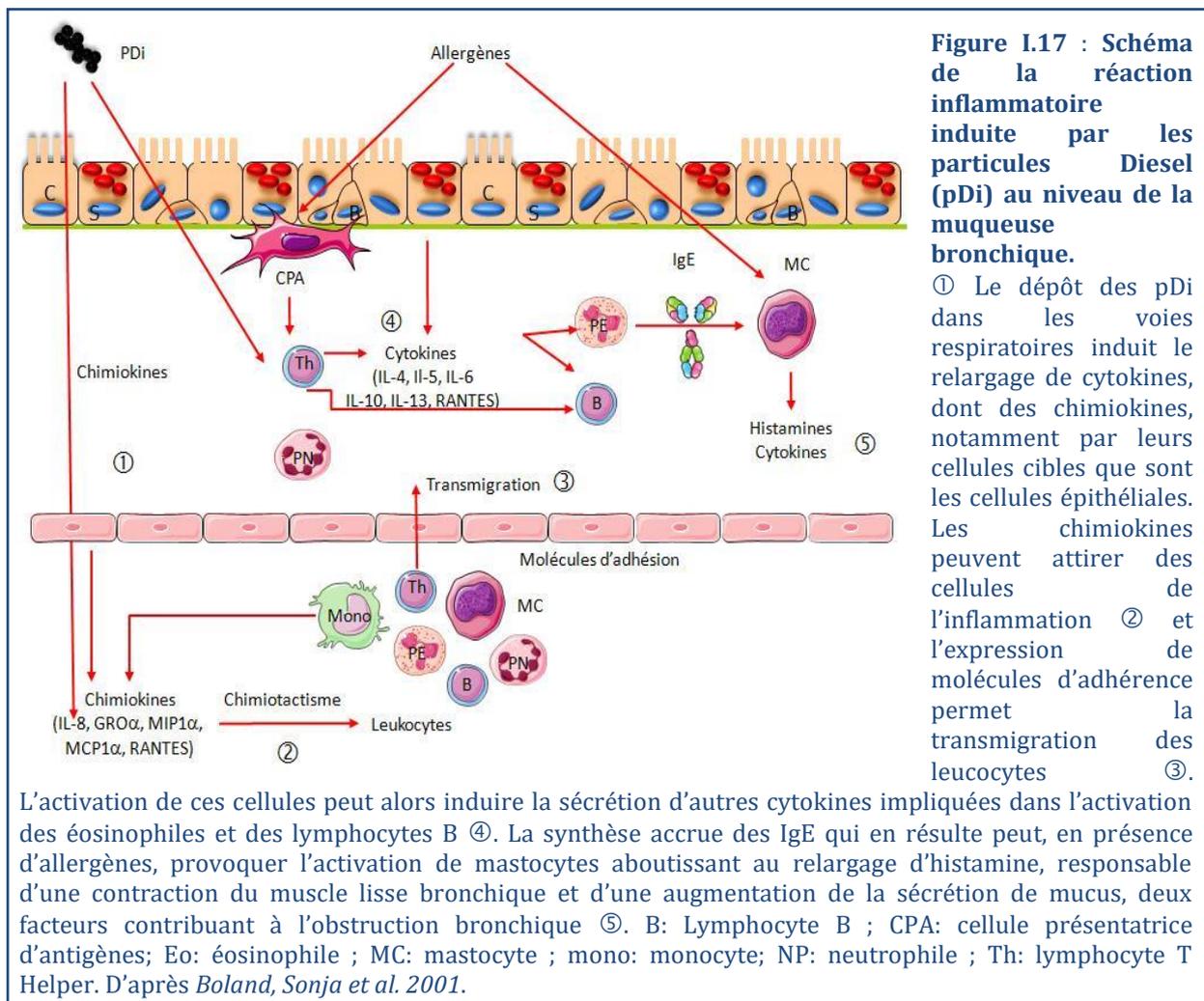
I.4.1) La réaction inflammatoire

Dans un tissu vivant et vascularisé, le processus inflammatoire est l'ensemble des phénomènes réactionnels déclenchés par une agression (agent pathogène, agent physique ou chimique, nécrose tissulaire, réponse allergique, auto-immunité, ...). L'inflammation est habituellement bénéfique : son but est d'amener les phagocytes (polynucléaires neutrophiles PN, monocytes et macrophages) sur le site de l'agression, d'éliminer l'agent pathogène et de réparer les lésions tissulaires. Cependant, elle peut être parfois néfaste du fait de l'agressivité ou de la persistance de l'agent pathogène, du lieu de l'inflammation, ou d'anomalies de régulation du processus inflammatoire.

Il existe deux types d'inflammation : aiguë et chronique. L'inflammation aiguë représente la réponse immédiate (quelques jours ou semaines), qui peut guérir spontanément ou grâce à un

traitement, mais peut aussi causer des séquelles si la destruction tissulaire est importante. L'inflammation chronique n'a aucune tendance à la guérison spontanée, elle évolue en persistant ou en s'aggravant pendant plusieurs mois ou plusieurs années. Une inflammation aiguë peut évoluer en inflammation chronique lorsque l'agent agresseur persiste dans les tissus ou lorsque le tissu subit des agressions et des inflammations répétées en entraînant à chaque épisode des destructions tissulaires de moins en moins bien réparées (*Collège Français des Pathologistes 2011*).

Les données de la littérature ont largement documenté l'impact inflammatoire des particules atmosphériques (PM₁₀, PM_{2.5} ou pDi) sur l'épithélium respiratoire. En effet, suite aux suspicions issues des études épidémiologiques, des expériences d'exposition humaine sur des volontaires sains ont montré que les pDi provoquent une augmentation des cytokines inflammatoires de type TH1 et TH2, des chimiokines et des IgE, ainsi que la présence de PN et lymphocytes dans la muqueuse respiratoire (*Diaz-Sanchez et al. 1997*). De plus, il a été montré que les pDi agissent comme un adjuvant des réactions aux allergènes environnementaux (*Li, N. et al. 2003a*). Le mécanisme de développement d'une réaction inflammatoire pulmonaire induite par les PM débute par l'internalisation des particules par les cellules épithéliales respiratoires (nasales, bronchiques et alvéolaires) ainsi que par les macrophages qui sont responsables de cette production accrue de chimiokines (**Figure I.17**, *Bayram et al. 1998; Boland, S. et al. 1999*).



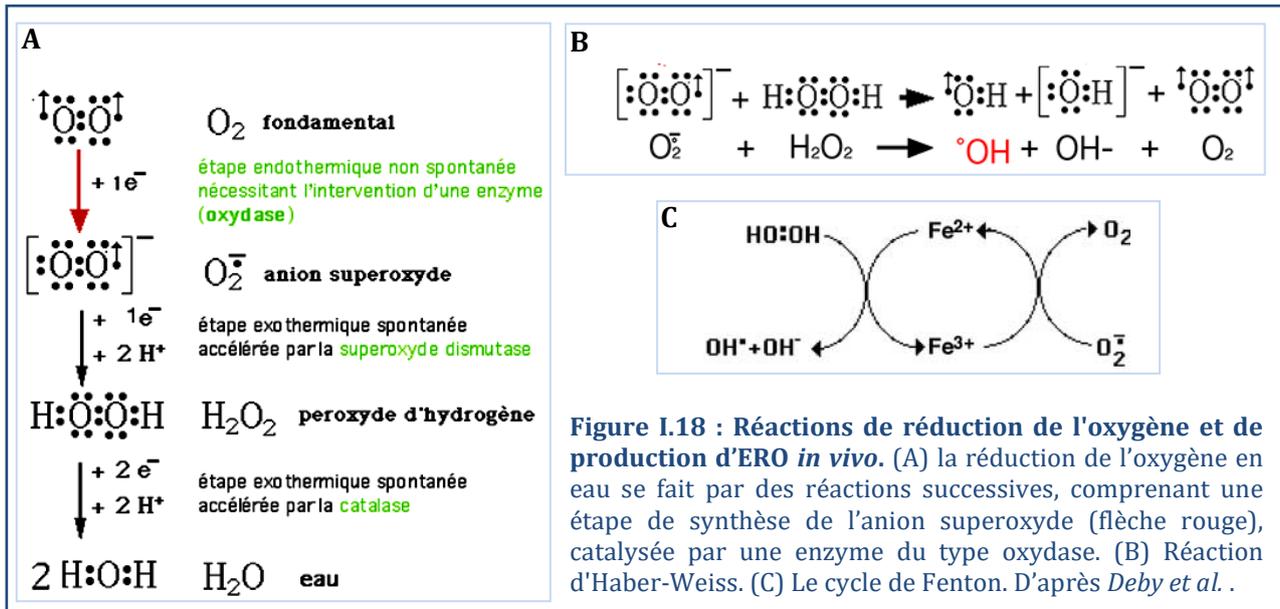
I.4.2) Le stress oxydant

Les effets pro-inflammatoires ainsi que de nombreux effets des PM sont étroitement liés au stress oxydant, causé notamment par les composés organiques et métalliques.

I.4.2.i) Définition et origines du stress oxydant

Le stress oxydant se définit comme étant le résultat d'un déséquilibre cellulaire entre les espèces réactives de l'oxygène (ERO) et les systèmes de défense anti-oxydante. Bien que considérés comme messagers de voies de signalisation et indispensables au bon fonctionnement cellulaire, les ERO présents en forte quantité peuvent être délétères pour la survie des cellules. Les ERO comprennent des radicaux libres tels que l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), le radical hydroxyle (OH^{\cdot}) et le monoxyde d'azote (NO^{\cdot}) ainsi que des dérivés oxygénés non radicalaires comme l'oxygène singlet (1O_2), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le peroxy-nitrite ($ONOO^-$).

L'origine principale des ERO réside dans la réduction de l'oxygène moléculaire (O_2), qui est une espèce bi-radicalaire possédant deux électrons libres, pour donner l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$, **Figure I.18 A**). *In vivo*, cette réaction est catalysée par les NADPH oxydases notamment au niveau mitochondrial (NADPH oxydase) où environ 2% des électrons sont perdus lors de leur transfert à partir des complexes I et III de la chaîne respiratoire mitochondriale (voir **Figure I.29 page 43**). En milieu aqueux, l' $O_2^{\cdot-}$ est un accepteur de protons d'une durée de vie très courte car il subit une réaction de dismutation, accélérée par la superoxyde dismutase (SOD), pour former du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), qui sera ensuite éliminé par la catalase (**Figure I.18 A**). L'ERO le plus réactif est le radical hydroxyle (HO^{\cdot}) qui peut être formé à partir du H_2O_2 et du $O_2^{\cdot-}$, ou *via* la décomposition du peroxy-nitrite ($ONOO^-$) qui peut être issu du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (*Rahman et al. 2006, Figure I.20*).



I.4.2.ii) Les métaux et le stress oxydant

La particularité chimique des métaux de transition est d'être incomplètement saturés en électrons, ils peuvent donc former des ions avec une grande variété d'états d'oxydation (de -3 à +8). Ceci les rend capables de réagir avec des molécules donneuses d'électrons (dont des protéines, l'oxygène, les radicaux libres ...) pour former des liaisons faibles (liaisons de coordination, notamment avec les protéines) ou pour prendre un électron (*Deby et al.*). Ces liaisons de coordination entre un métal et une protéine ou un ligand non-protéique a pour but d'assurer une fonction catalytique ou structurelle, les plus connues étant les protéines fer-soufre de la respiration mitochondriale : la NADH déshydrogénase (complexe I), la succinate déshydrogénase (complexe II), la coenzyme Q cytochrome *c* réductase (complexe III), *etc.* (voir **Figure I.29**).

Les métaux de transition (Fe^{2+} ou Cu^+) peuvent générer des ERO par la réaction d'Haber-Weiss qui a longtemps été considérée comme responsable de la génération du radical hydroxyle (OH^\bullet) à partir d' H_2O_2 et O_2^- (**Figure I.18 B**). Des arguments de cinétique chimique et de thermodynamique ont depuis contredit cette réaction, qui est en réalité un bilan de deux réactions dues aux métaux de transition, formant le cycle de Fenton (**Figure I.18 C**). La réaction de Fenton est une réaction de réduction d' H_2O_2 par le fer ferreux (Fe^{2+}) complexé grâce à des liaisons de coordination, aboutissant à la formation d' OH^\bullet et de fer ferrique (Fe^{3+}), ensuite réduit en Fe^{2+} par l'anion superoxyde, et le cycle continue (**Figure I.18 C**, *Deby et al.*). Ce cycle réactionnel peut aussi être réalisé par d'autres métaux de transition tels que le cuivre, l'aluminium, *etc.*

De plus, les liaisons de coordination, peuvent induire un remaniement électronique du complexe formé et favoriser le transfert d'électrons du métal vers l'oxygène pour former des molécules très instables telles que l'ion oxoferryle ($2(\text{FeIV}=\text{O})^{2+}$) qui peut former le radical hydroxyle, en présence de proton, par une réaction très rapide (**Figure I.19**, *Deby et al.*)

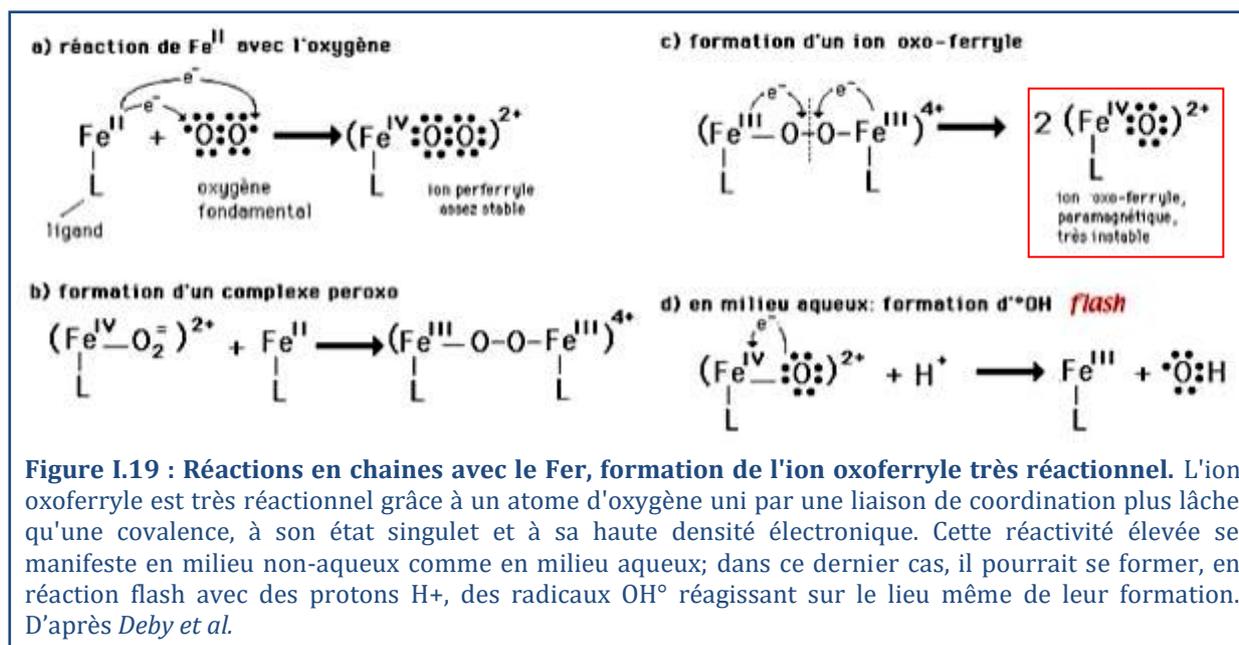


Figure I.19 : Réactions en chaînes avec le Fer, formation de l'ion oxoferryle très réactionnel. L'ion oxoferryle est très réactionnel grâce à un atome d'oxygène uni par une liaison de coordination plus lâche qu'une covalence, à son état singulet et à sa haute densité électronique. Cette réactivité élevée se manifeste en milieu non-aqueux comme en milieu aqueux; dans ce dernier cas, il pourrait se former, en réaction flash avec des protons H^+ , des radicaux OH^\bullet réagissant sur le lieu même de leur formation. D'après *Deby et al.*

I.4.2.iii) Les systèmes de défense anti-oxydante

Les ERO peuvent interagir avec tous les composants cellulaires (protéines, lipides, ADN) et causer des dommages tels que : des pertes ou modifications de fonction des protéines, des dommages à l'ADN (cassures simple brin, mutations, adduits, oxydations telles que la 8-hydroxy-déoxyguanosine (8-OhdG), pontages, modifications de structure...), la peroxydation lipidique (mécanisme de dégradation des lipides formant des radicaux hydroperoxydes ROOH), l'augmentation du calcium intracellulaire, des modifications du cytosquelette, *etc.* (Rahman *et al.* 2006). Pour pallier à ces effets délétères, des systèmes de défense anti-oxydante existent, ce sont des systèmes enzymatiques et non-enzymatiques qui ont pour but de diminuer la quantité d'EAO présente dans la cellule.

Les systèmes de défense non-enzymatiques comprennent des molécules de petite taille qui agissent principalement en séquestrant les ERO, comme des vitamines (A, C, E, B12), des caroténoïdes, des ubiquinones et le glutathion ; des protéines (transferrine, ferritine, céruléoplasmine) qui maintiennent les métaux de transition dans un état inactif pour la production d'ERO ; et certains oligo-éléments comme le fer, le cuivre, le zinc et le sélénium, co-facteurs indispensables pour l'activité des enzymes anti-oxydantes (CuZn-SOD, MnSOD, SeGPx, métallothionéines) (Pincemail *et al.* 2002). Cependant, les oligo-éléments étant aussi des métaux de transition, peuvent aussi être pro-oxydant *via* des réactions de type Fenton (réactions d'Haber-Weiss) (Figure I.18).

Les enzymes anti-oxydantes ont pour fonction de transformer les ERO en espèces moins réactives et/ou augmenter la quantité d'anti-oxydants dans la cellule. Les principales sont la superoxyde dismutase (SOD), la catalase, la glutathion peroxydase (GPx) et la glutathion réductase (GR), qui agissent ensemble pour réduire les ERO en eau (Figure I.20). Il existe d'autres enzymes qui prennent part au système anti-oxydant, dont l'hème-oxygénase 1 (HO-1), la NADPH quinone oxydase 1 (NQO-1), une enzyme de détoxification (voir §I.4.3), et la glutamate cystéine ligase (GCL), qui participe à la synthèse du glutathion.

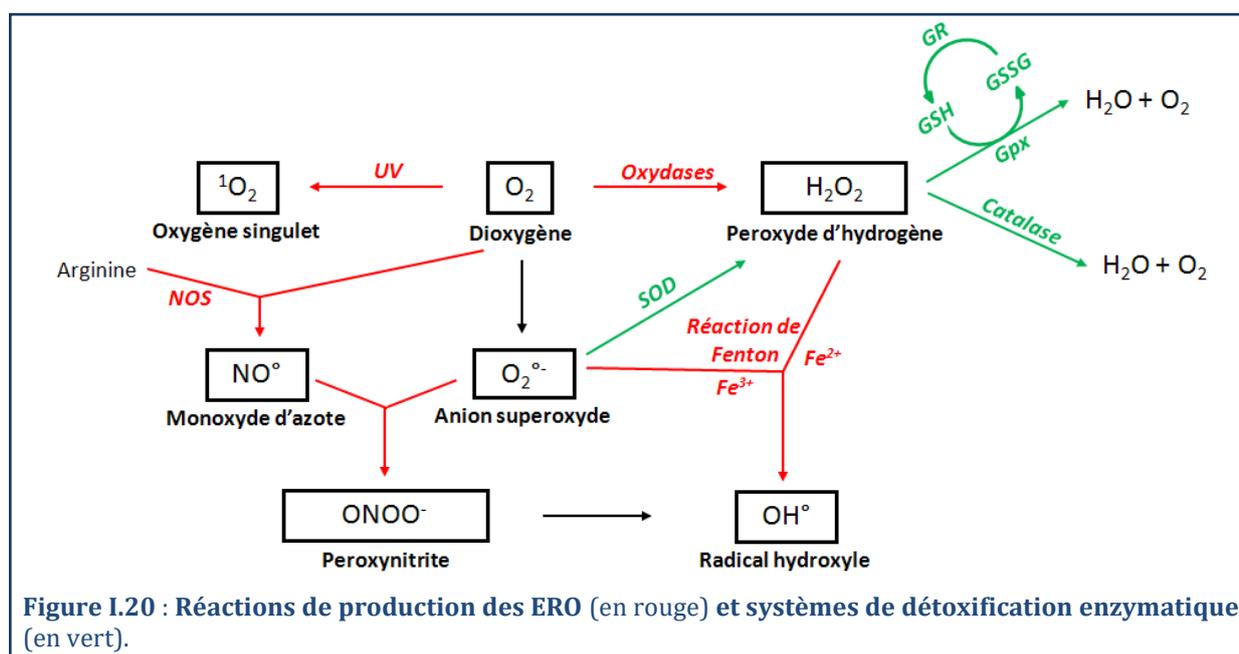


Figure I.20 : Réactions de production des ERO (en rouge) et systèmes de détoxification enzymatique (en vert).

La superoxyde dismutase (SOD) est une métalloprotéine catalysant la dismutation de l'anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$ en peroxyde d'hydrogène H_2O_2 (**Figure I.18 A et I.20**). La SOD existe sous trois isoformes nécessitant des cofacteurs métalliques:

- la Cu-Zn-SOD, ou SOD1 est localisée dans le cytoplasme et le noyau. Elle est exprimée principalement de manière constitutive, mais peut aussi être induite dans les cellules épithéliales bronchiques et alvéolaires, les pneumocytes de type II, les fibroblastes, les macrophages alvéolaires, et les cellules endothéliales des capillaires pulmonaires (*Rahman et al. 2006*).
- la Mn-SOD ou SOD2 est située dans la mitochondrie. Elle est inductible par de nombreux facteurs retrouvés notamment dans l'air, elle est donc très abondante dans les cellules épithéliales bronchiques, les macrophages alvéolaires et les pneumocytes de type II (*Rahman et al. 2006*). Cette enzyme joue un rôle important dans la survie cellulaire puisque l'extinction de ce gène induit l'apoptose (*Comhair et al. 2005*). De plus, des modifications de la SOD2 par oxydation et nitration ont été identifiées dans des poumons d'asthmatiques (*Comhair et al. 2005*).
- la Cu-Zn-SOD ou SOD3 est extracellulaire. Elle est présente dans les fluides et les espaces interstitiels des poumons, dans les vaisseaux sanguins et autour des alvéoles et des capillaires sanguins. Elle est exprimée et sécrétée par les macrophages alvéolaires, les cellules épithéliales bronchiques, les cellules endothéliales vasculaires, les pneumocytes de type II et la matrice extracellulaire (*Rahman et al. 2006*). Une étude récente a montré que l'expression de la SOD3 est réduite dans les cancers du poumon, ce qui peut participer à l'invasion tumorale régulée par le statut redox (*Rahman et al. 2006*).

Les SOD sont largement répandues dans l'appareil respiratoire. Les SOD1 et 2 sont les formes les plus abondantes dans les cellules.

La catalase (CAT) est un homotétramère qui décompose le H_2O_2 en $H_2O + O_2$ (**Figure I.20**). Elle est abondante dans les globules rouges et les cellules hépatiques mais est aussi présente dans les peroxysomes et le cytoplasme des cellules pulmonaires notamment les pneumocytes de type II et les macrophages. Certaines études ont montré que sa transcription peut être induite par l'hypoxie et les oxydants, mais d'autres le contredisent (*Rahman et al. 2006*).

La glutathion peroxydase (GPx) et le glutathion réduit (GSH) : La GPx a pour fonction d'éliminer le H_2O_2 en le transformant en $H_2O + O_2$ grâce au glutathion réduit GSH qui est oxydé en glutathion disulfure GSSG. Le glutathion oxydé est à nouveau réduit par la glutathion réductase (GR, **Figure I.20**) afin de rétablir le pool de glutathion. Le glutathion a aussi pour fonction de séquestrer les xénobiotiques dont les métaux lourds pour qu'ils soient excrétés sans dommages. Ainsi le dosage de pool de glutathion ou du rapport GSH/GSSG est assez représentatif du stress oxydant cellulaire. Il existe de nombreuses formes de GPx dont plusieurs formes nécessitent un cofacteur métallique (sélénium). Ces enzymes sont présentes de manière ubiquitaire dans le cytoplasme de la plupart des cellules. D'autres types de GPx ont été décrits dont la GPx4 (« Phospholipid-hydroperoxide glutathionne peroxidase ») qui réduit la

peroxydation lipidique, une GPx3 extracellulaire présente dans les fluides pulmonaires, et une GPx1 mitochondriale (*Rahman et al. 2006*).

L'hème oxygénase (HO) catalyse la dégradation de l'hème en biliverdine par une réaction qui génère du monoxyde carbone et du fer, la biliverdine et le monoxyde carbone générés ayant des propriétés anti-oxydantes et anti-inflammatoires. Il existe trois isoformes d'hème oxygénase (1, 2, et 3) dont seule HO1 (anciennement connue sous le nom de HSP32) est inductible. HO1 est exprimée dans l'épithélium de l'appareil respiratoire, les macrophages alvéolaires, et les cellules inflammatoires, son expression est induite par de nombreux *stimuli* dont le stress oxydant, l'hypoxie et la déplétion de GSH. Enfin, cette enzyme semble jouer un rôle dans la survie cellulaire puisqu'il a été décrit qu'elle empêche l'apoptose induite par le TNF α (« Tumor Necrosis Factor α ») dans les fibroblastes (*Rahman et al. 2006*).

1.4.2.iv) Les particules atmosphériques et le stress oxydant

Associé à l'exacerbation de certaines pathologies, la formation d'un stress oxydant induit par les particules a été largement décrite dans la littérature. En effet, il a été démontré que les PM_{2.5} peuvent générer des ERO (HO $^\circ$, O₂ $^\circ-$ et H₂O₂) ainsi que l'expression de gènes de l'inflammation tels que l'AR, le GM-CSF et l'IL-6 (*Baulig et al. 2009; DiStefano et al. 2009; Danielsen et al. 2011; Diabate et al. 2011; Dergham et al. 2012*). Les dommages causés par ces ERO sont la peroxydation lipidique des membranes ainsi que des lésions ou des adduits à l'ADN (*Tao et al. 2003; Valavanidis et al. 2008*).

La composition des particules est déterminante pour la production de stress oxydant par les PM. Les composés organiques (notamment les quinones et les HAP) et métalliques (notamment les métaux de transition) des particules sont de forts producteurs d'ERO (*Valavanidis et al. 2008*). En effet, les métaux de transition tels que le fer, le cuivre et le vanadium peuvent produire le radical hydroxyle (HO $^\circ$) *via* la réaction d'Haber-Weiss (**Figure I.18**). Une étude de Ball et collaborateurs en 2000, a prouvé que les métaux présents sur les particules sont biodisponibles et peuvent se solubiliser dans l'eau et générer des ERO (*Ball et al. 2000*). Des études réalisées avec l'extrait organique des particules Diesel, ont montré qu'il génère une quantité d'ERO proche de celle des particules entières dans des macrophages (*Hiura et al. 1999*) et des cellules épithéliales bronchiques humaines (*Baulig et al. 2003*). De plus, les composés organiques, lorsqu'ils sont transformés par les enzymes du métabolisme des xénobiotiques comme le CYP1A1 peuvent former des ERO si la réaction est incomplète.

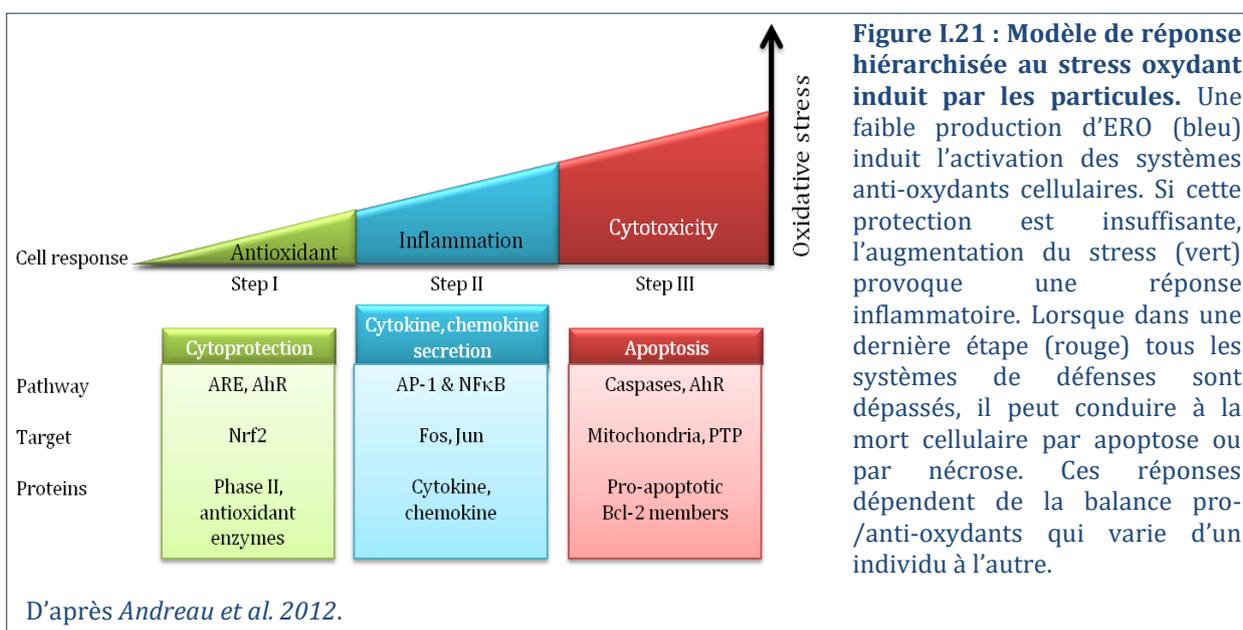
Parmi les lésions causées par composés particulaires, les oxydations et les adduits à l'ADN sont particulièrement délétères car ils peuvent induire à des mutations génétiques ou des modifications de la transcription, et conduire à la mort ou à la cancérogenèse de la cellule (voir § **I.4.4**). Notamment, les attaques oxydatives de l'ADN conduisent à des mutations de paires de bases, des délétions ou des insertions, communément observées dans les oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeurs mutés. Actuellement, plus de 100 types de lésions de l'ADN liés à l'oxydation ont été décrits, parmi lesquels la 8-hydroxydéoxyguanosine (8-OHdG) est probablement la plus connue et la plus étudiée, elle sert de biomarqueur de lésions ADN. Plusieurs particules sont connues pour induire des 8-OHdG, y compris l'amiante, la silice

cristalline, les cendres volantes de charbon, et les PM (Andre et al. 2011). Les ERO sont également bien connu pour causer des cassures de l'ADN, par oxydation du désoxyribose, ce qui entraîne la rupture des brins simples. Ces ruptures simple brin ont été montrées par divers particules dont l'amiante, le quartz, les pDi, le noir de carbone, et le TiO₂ (Donaldson et al. 2007). Les HAP ainsi que les amines aromatiques forment des adduits dits encombrants qui conduisent à une forte déformation locale de la double hélice d'ADN et au blocage la transcription et la réplication de l'ADN). Le rôle des ERO dans les effets génotoxiques des PM est important puisque de nombreuses études ont montré que des anti-oxydants ou des inhibiteurs des radicaux libres réduisent les effets mutagènes des particules (Donaldson et al. 2007).

I.4.2.v) Théorie de la réponse hiérarchisée au stress oxydant

Selon l'intensité du stress oxydant, les réponses cellulaires peuvent aller de l'activation de mécanismes de protection à l'apparition d'effets délétères pour les cellules. L'équipe de Nel A. a observé cette hiérarchie dans les effets biologiques induits par le stress oxydant lors de l'exposition des cellules aux particules Diesel. En effet, des expériences *in vitro*, sur des macrophages de rat, ont montré que les pDi induisent l'expression d'enzymes anti-oxydantes lorsque le stress oxydant est modéré, puis activent les MAP kinases et la sécrétion de cytokines lorsqu'il augmente, et enfin finissent par induire l'apoptose lorsque qu'il est trop fort (Li, N. et al. 2002). Ces résultats ainsi que les données de la littérature ont permis à Li N. et collaborateurs de décrire la théorie de la réponse hiérarchisée au stress oxydant (Li, N. et al. 2003a, Figure I.21).

Ainsi, une faible production d'ERO (Step I, Figure I.21) active les systèmes anti-oxydants et cytoprotecteurs, principalement *via* la voie de signalisation Nrf2, qui induit la transcription des enzymes anti-oxydantes et des enzymes du métabolisme des xénobiotiques. Un stress oxydant modéré (Step II, Figure I.21) provoque une inflammation *via* l'activation des voies de signalisation des MAPK, de NF-κB et d'AP-1, induisant la transcription de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires. Enfin, un stress oxydant très élevé (Step III, Figure I.21), dépassant les capacités de défense de la cellule, conduit à la mort de la cellule par apoptose *via* l'activation de protéines pro-apoptotiques.



I.4.2.vi) La voie de signalisation Nrf2/Keap1

Nrf2 (ou NFE2L2, « Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 ») est un facteur de transcription séquestré dans le cytoplasme par la protéine Keap1, qui conduit à l'ubiquitination de Nrf2 par la Cullin-3 (Itoh *et al.* 1999; Sekhar *et al.* 2010). Lorsque la protéine Nrf2 est ubiquitinée, elle est transportée vers le protéasome, où elle est dégradée. Ainsi, dans des conditions normales, Nrf2 a une demi-vie de seulement 20 minutes (Kobayashi *et al.* 2004). Keap1 est une protéine riche en cystéine dont trois (C151, C273 et C288) sont modifiées en situation de stress oxydant, ce qui mène à un changement de conformation de Keap1 et la perte de son interaction avec Nrf2, qui migre vers le noyau. Dans le noyau, Nrf2 forme un complexe avec la protéine adaptatrice Maf et se lie à l'élément de réponse anti-oxydant (ARE) pour activer la transcription de ses gènes cibles, dont les gènes des protéines anti-oxydantes et les gènes du métabolisme des xénobiotiques, tels que la NADPH quinone oxydoréductase 1 (NQO1), l'hème oxygénase 1 (HO1), le glutamate cystéine ligase (GCL) et les glutathion S-transférases (GST) (Figure I.22).

Nrf2 peut aussi activer sa propre transcription (Miao *et al.* 2005; Hayes *et al.* 2008). Par ailleurs, la voie Nrf2 semble être connectée à d'autres voies de signalisations telles que la voie AhR (« Aryl hydrocarbon Receptor »), NFκB et Notch1 (Niestroy *et al.* 2011). Notamment, Nrf2 et AhR peuvent interagir physiquement pour former un cofacteur (Wang, L. *et al.* 2013); et le benzo(a)pyrène peut réguler négativement la transcription de Keap1 et donc participer à l'activation de Nrf2 (Nguyen *et al.* 2010).

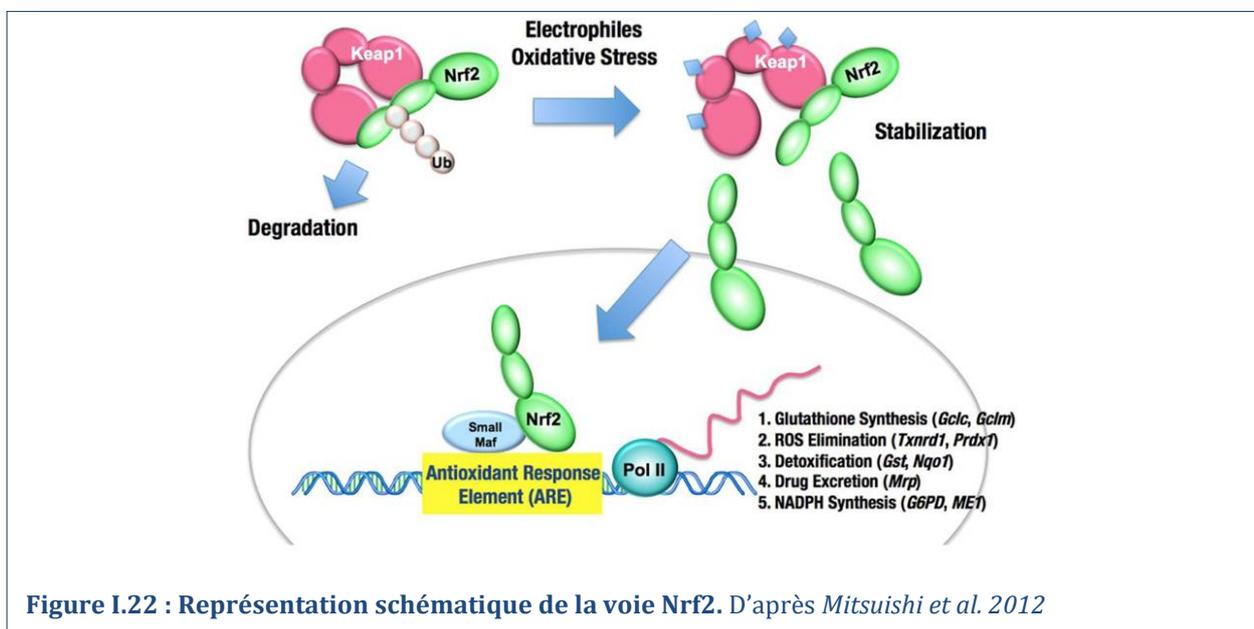


Figure I.22 : Représentation schématique de la voie Nrf2. D'après Mitsuishi *et al.* 2012

De par son rôle central dans l'homéostasie redox des cellules, en diminuant le niveau d'ERO, Nrf2 participe à la protection des cellules normales mais aussi à la formation et au maintien de cellules tumorales (Ramos-Gomez *et al.* 2001; Xu *et al.* 2006; Loignon *et al.* 2009). En effet, l'implication de la production d'ERO, ainsi que l'activation de Nrf2 dans l'initiation et le maintien de la cancérogenèse, a été démontrée, en particulier dans les cancers du poumon (Sporn *et al.* 2012; Bauer *et al.* 2013; Ganan-Gomez *et al.* 2013).

I.4.3) Le métabolisme des xénobiotiques

I.4.3.i) Les différentes phases du métabolisme des xénobiotiques

Un xénobiotique (XB) est défini comme étant une substance étrangère à la cellule. Il peut s'agir de molécules exogènes comme les drogues, les polluants ou la nourriture, ou endogènes telles que la bile, les stéroïdes et certains acides. Pour lutter contre les agressions par les XB l'organisme humain s'est doté de trois systèmes enzymatiques spécialisés et complémentaires (les enzymes du métabolisme des xénobiotiques : EMX) conduisant à la détoxification des composés entrés dans la cellule, en vue de leur élimination. Le métabolisme des XB se déroule en 3 phases définies : la fonctionnalisation (phase 1), la conjugaison (phase 2), et l'efflux (phase 3, **Figure I.23**).

Phase 0 : L'entrée des XB dans la cellule peut se faire de différentes manières : par translocation à travers la membrane, par endocytose, ou *via* les transporteurs membranaires. Une fois entré dans la cellule, le XB peut être rejeté immédiatement par des transporteurs membranaires tels que la glycoprotéine P ou être pris en charge par les EMX (**Figure I.23**).

Phase 1 : Si le XB persiste dans la cellule, il est pris en charge par les enzymes de phase 1 telles que les cytochromes P450 et les mono-oxygénases. Cette phase 1 consiste à transformer le XB en un dérivé plus polaire, en ajoutant un groupement -OH, -NH₂ ou -COOH à sa structure chimique, pour le rendre plus fonctionnel (**Figure I.23**). Les enzymes de phase 1 les plus répandues sont les cytochromes P450 (CYP), avec 57 gènes identifiés chez l'Homme. Ces enzymes catalysent des réactions de N- et O-déalkylation, hydroxylation aliphatique et aromatique, N- et S-oxydation, et déamination (*Omicinski et al. 2011*).

Cette phase, qui a pour but de fonctionnaliser le XB afin de l'éliminer, peut aussi produire des ERO (voir **Figure I.18**) ainsi que des métabolites plus toxiques que la molécule native ; c'est le cas des HAP oxydés tels que les époxydes et les cations radicalaires capables de causer des adduits à l'ADN, ou les époxyde-diols et les O-quinones, très mutagènes.

Phase 2 : La phase 2 ou phase de conjugaison, vise à neutraliser un groupement réactif (thiol, amine, aldéhyde...), déjà présent sur le XB ou résultants de sa prise en charge par les enzymes de phase 1. Les EMX de phase 2 catalysent des réactions de (*Omicinski et al. 2011*) :

- Réduction des quinones en hydroquinones (qui peuvent ensuite être glucuronidées) par la NADPH quinone oxydoréductase (NQO-1)
- Glucuronidation : le XB est conjugué avec l'acide glucuronique par l'UDP-glucuronosyltransférase (UGT);
- Sulfation : ajout d'un groupement sulfate, le donneur du groupement est l'adenosine 3'-phosphate 5'-phosphosulphate (PAPS) ;
- Acétylation : conjugaison avec l'acétyl coenzyme A par les N-acetyltransférases (NAT),
- Méthylation : la S-méthionine donne son groupement méthyl grâce aux méthyltransférases;
- Conjugaison avec le glutathion (grâce à la glutathion S-transférase (GST));
- Conjugaison avec la glutamine.

Phase 3 : Une fois conjugués par les EMX de phases 1 et 2, les XB sont ensuite expulsés de la cellule par des protéines d'efflux comme la P-gp (glycoprotéine P) et la MRP (« Multidrug Resistance Protein ») (Figure I.23).

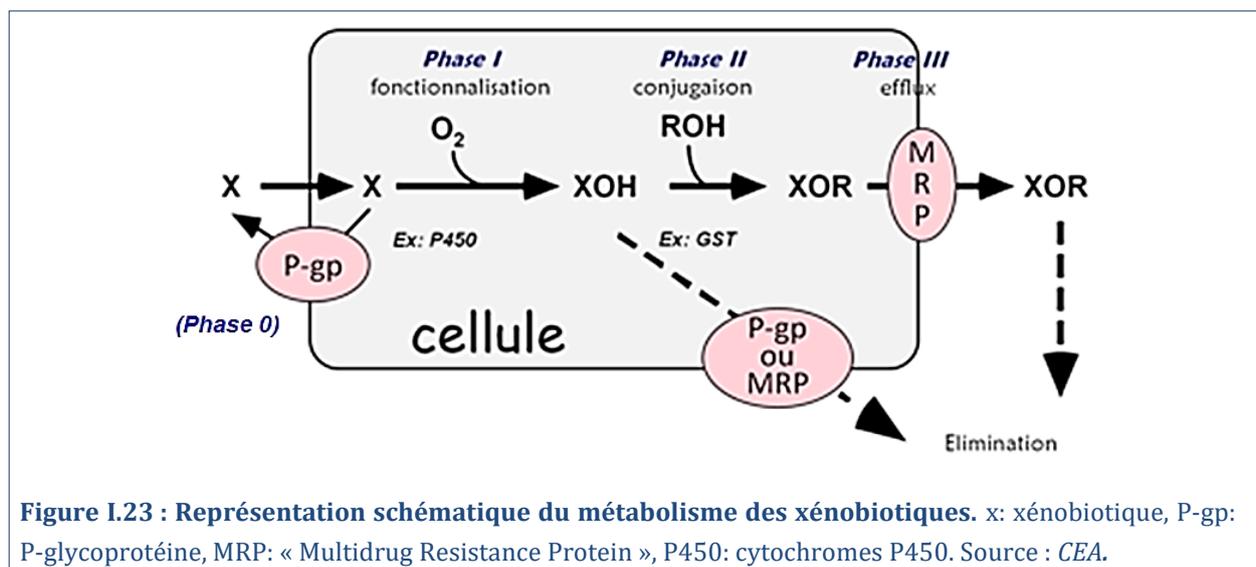


Figure I.23 : Représentation schématique du métabolisme des xénobiotiques. x: xénobiotique, P-gp: P-glycoprotéine, MRP: « Multidrug Resistance Protein », P450: cytochromes P450. Source : CEA.

I.4.3.ii) Régulation de l'expression des EMX

Les EMX sont généralement exprimées de manière constitutive mais également induites grâce à des facteurs de transcription sensibles aux XB ou aux ERO produits au cours de leur métabolisation. Ces facteurs de transcription vont se fixer à une séquence spécifique des gènes, appelée l'élément de réponse aux xénobiotiques (XRE), et activer leur transcription. Parmi eux, les particules atmosphériques sont connues pour activer le récepteur « Aryl hydrocarbon » (AhR), grâce à leurs composés organiques tels que les HAP. L'AhR est maintenu dans le cytoplasme par sa liaison avec les protéines de choc thermique HSP90, la protéine AIP (« AhR Interacting Protein »), ainsi que Src-1. Lorsque l'AhR se lie à un XB, il se détache des protéines HSP90 et AIP pour transloquer dans le noyau où il se lie à son récepteur nucléaire Arnt (« Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator ») et se fixe à la séquence XRE des gènes cibles, codants pour des enzymes de phase 1 (les CYP).

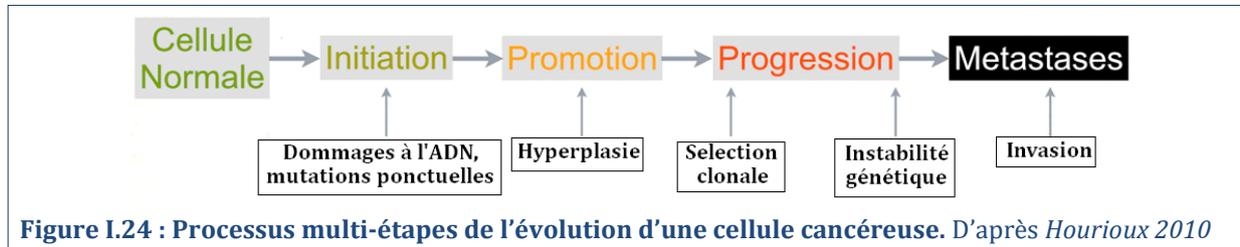
I.4.4) La cancérogénèse

Des études sur les particules telles que les DEP, le noir de carbone et les PM, ont montré que l'inflammation, le stress oxydant, ainsi que les dommages à l'ADN (adduits et oxydation) sont impliqués dans les différentes étapes de la cancérogénèse (Donaldson *et al.* 2007).

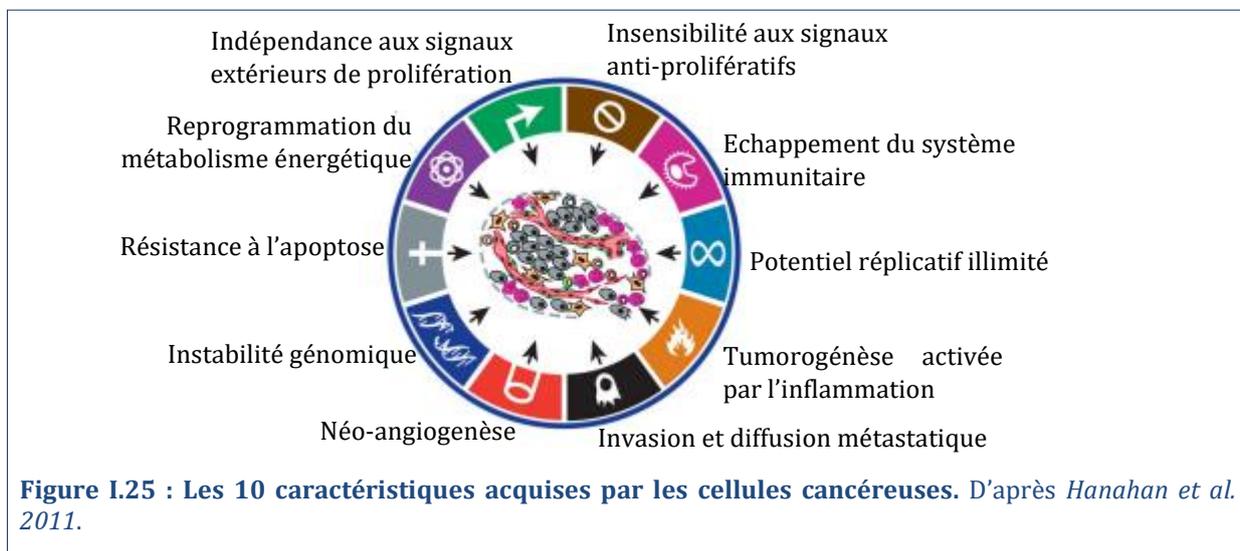
I.4.4.i) Les processus de cancérogénèse

La cancérogénèse est un processus conduisant à la transformation des cellules normales et qui comprend initialement une phase **d'initiation** puis une phase dite de **promotion**. L'initiation correspond à l'accumulation d'atteintes génétiques et épigénétiques conduisant à la perte de l'homéostasie et à l'immortalité de ces cellules qui sont alors dites initiées. S'ensuit la

phase de promotion où les cellules initiées prolifèrent de manière non contrôlée (hyperplasie). À ce stade, le cancer est infraclinique: c'est une masse de cellules qui survit dans l'organisme mais qui dépend de son microenvironnement. L'étape suivante de **progression tumorale** ou tumorigenèse correspond au développement de la tumeur primaire (dysplasie), grâce notamment au stroma environnant, et à la dissémination des métastases (**Figure I.24**).



Ainsi, les cellules cancéreuses se caractérisent par l'acquisition de 10 propriétés remarquables (**Figure I.25**, *Hanahan et al. 2000; Hanahan et al. 2011*) :



- **l'indépendance aux signaux extérieurs de prolifération**, peut être acquise par : une stimulation autocrine, la production de facteurs de croissance par des cellules normales adjacentes, l'augmentation ou l'altération structurale des récepteurs aux facteurs de croissance, l'activation constitutive des voies de signalisation situées en aval de ces récepteurs ;
- **l'insensibilité aux signaux antiprolifératifs** a lieu notamment par l'entrée des cellules en phase de quiescence G0 et l'implication de mutations des protéines Rb et p53 qui ont pour fonction de bloquer le cycle cellulaire ;
- **le potentiel réplcatif illimité** lié à une augmentation de l'expression de la télomérase ;
- **l'invasion et la diffusion métastatique** dues à la transition épithélio-mésenchymateuse ;
- **la néo-angiogenèse** assurée par les molécules angiogéniques, telles que VEGF et FGF, et activée par les médiateurs pro-inflammatoires (*Valavanidis et al. 2008*) ;
- **la résistance à l'apoptose** (voir § I.5) ;

- la tumorigenèse activée par l'inflammation ;
- l'instabilité génomique ;
- la reprogrammation du métabolisme énergétique normal vers un fort taux de glycolyse suivie d'une fermentation lactique dans le cytosol (effet Warburg) ;
- l'échappement au système immunitaire ;

A noter que les 4 dernières propriétés ont été récemment énoncées et sont encore sujettes à controverse (*Hanahan et al. 2011*). De plus, l'inflammation chronique est impliquée dans l'émergence de certaines de ces caractéristiques comme la néo-angiogenèse et l'immunosuppression qui permet aux cellules cancéreuses de se soustraire à la détection par le système immunitaire et activer la progression tumorale (*Valavanidis et al. 2008*).

L'impact des PM sur le processus de cancérogenèse, provient des impacts cellulaires causés par une exposition prolongée mais aussi aigüe. En effet, les PM peuvent agir directement sur l'épithélium respiratoire et le détériorer de manière variable ; l'altération de la muqueuse respiratoire peut ainsi aller jusqu'à la desquamation totale de l'épithélium respiratoire (**Figure I.26A**). Afin de pallier à la perte d'intégrité de l'épithélium respiratoire, un mécanisme de réparation se met en place : la métaplasie épidermoïde (**Figure I.26 B**). Ce processus correspond à la prolifération des cellules sécrétrices et basales, conduisant à une stratification et à une perte de polarité des cellules épithéliales. Quelques cellules se différencient et remplacent progressivement les foyers épidermoïdes par un épithélium mucociliaire normal. Cependant, les processus de prolifération, de différenciation, et d'apoptose, qui interviennent au cours de cette métaplasie épidermoïde, peuvent échapper à tout contrôle et conduire à l'apparition d'un carcinome épidermoïde. En effet, la perte d'hétérozygotie au niveau de certains chromosomes (ex : 3p, 9p, 17p), le raccourcissement des télomères puis la réactivation de la télomérase (*Hou et al. 2012*), les mutations d'oncogènes ou de gènes suppresseurs de tumeurs (TP53, KRAS, EGFR, P16INK4A), et des altérations épigénétiques ont directement été mis en cause dans la cancérogenèse broncho-pulmonaire (*Lantuejoul et al. 2009*).

Initialement, les altérations génétiques et épigénétiques interviendraient au sein des cellules basales de l'épithélium bronchiques, des cellules neuroendocrines pulmonaires (NEB) au niveau des bronchioles, des cellules de Clara, et des cellules souches de la jonction broncho-alvéolaire, actuellement considérées comme les populations cellulaires impliquées dans l'auto-renouvellement de l'épithélium pulmonaire. L'apparition de mutations (ex : activation d'oncogènes) dans ces cellules pourraient donner naissance aux différents types histologiques des tumeurs pulmonaires (**Figure I.27**, *Sullivan et al. 2010*).

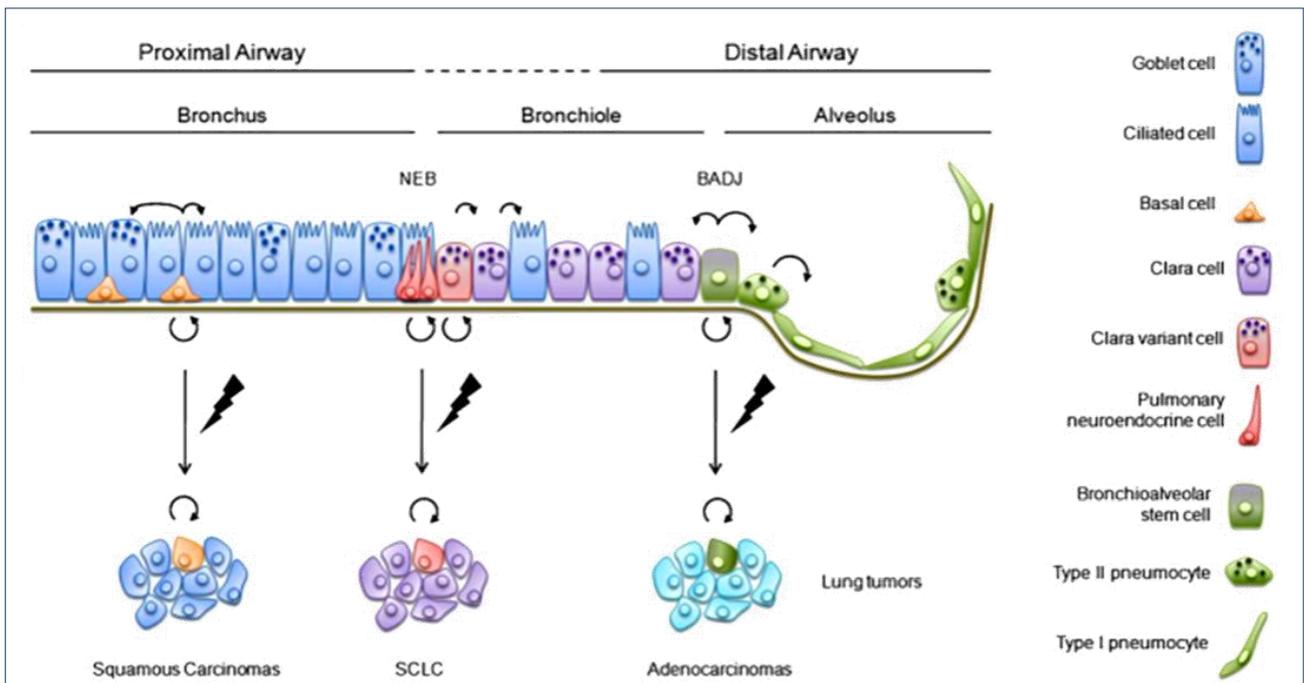
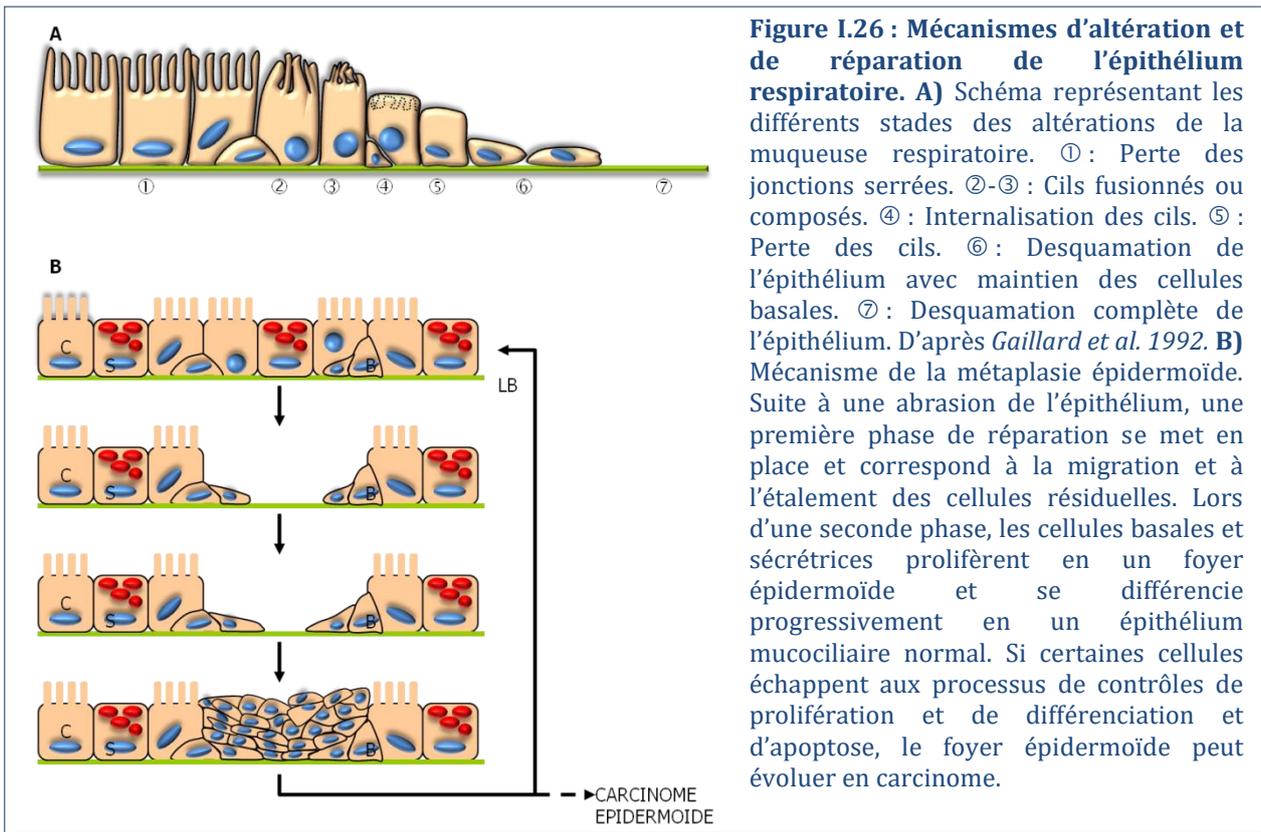


Figure I.27 : Schéma hypothétique des cellules souches de l'épithélium respiratoire responsables de l'initiation des tumeurs pulmonaires. Les cellules basales de l'épithélium bronchique, les cellules neuroendocrines pulmonaires (NEB), les cellules de Clara résistantes au naphthalène (variant), et les cellules souches de la jonction broncho-alvéolaire sont toutes proposées pour être les cellules de l'auto-renouvellement de l'épithélium pulmonaire. L'accumulation de mutations activant des oncogènes (éclairés) dans les différentes cellules souches du poumon sont suspectées de donner naissance aux différents types histologiques des tumeurs pulmonaires (SCLC : carcinomes pulmonaires à petites cellules). D'après Sullivan et al. 2010.

Au niveau cellulaire et moléculaire, l'initiation et la promotion des cancers pulmonaires par les PM10 et les PM2.5 sont liées aux voies biochimiques du stress oxydant et des dommages oxydatifs de l'ADN (voir § I.4.2), à la stimulation des macrophages, à l'instabilité des télomères (Hou et al. 2012), à la modulation de l'expression des gènes et à l'activation des facteurs de transcription ayant un rôle important dans la carcinogenèse (Valavanidis et al. 2013).

I.4.4.ii) La mutagenèse

Au cours de la phase d'initiation, l'acquisition des caractéristiques cancéreuses par les cellules est liée à l'induction d'un stress oxydant (voir § I.4.2) et à l'activation métabolique des molécules pro-cancérogènes par les EMX (voir § I.4.3); mais également à l'accumulation d'anomalies génétiques et épigénétiques qui conduisent à l'activation d'oncogènes et l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs (Tableau I.5).

Contrairement à l'activation des oncogènes, pour perdre la fonction d'un gène suppresseur de tumeur, la mutation doit se faire pour les 2 allèles selon le modèle de Knudson ; bien que la perte sur un seul allèle dit haplo-insuffisante puisse également augmenter le risque de tumeur. Dans le cas des gènes suppresseurs, les processus génétiques de délétion, perte d'un chromosome par non-disjonction lors de la mitose et la recombinaison mitotique peuvent conduire à une perte d'hétérozygotie (PdH) fréquemment décrite dans les cancers du poumon (Lantuejoul et al. 2009).

Tableau I.5 : Mécanismes génétiques et épigénétiques d'altérations des oncogènes et gènes suppresseurs de tumeurs. D'après Lantuejoul et al. 2009; Hourieux 2010.

	Activation d'oncogènes	Inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs
Mécanismes génétiques	<ul style="list-style-type: none"> • Mutation de la séquence codante → expression normale d'une protéine hyperactive • Délétion → expression d'une protéine hyperactive • Amplification génique → surexpression d'une protéine normale • Réarrangement chromosomique → surexpression d'une protéine normale sous l'influence d'un promoteur fort ou expression d'une protéine de fusion hyperactive 	<ul style="list-style-type: none"> • Mutation de la séquence codante → expression normale d'une protéine hypo-active • Délétion du gène (PdH) • Perte d'un chromosome par non-disjonction lors de la mitose (PdH) • Recombinaison mitotique (PdH)
Mécanismes épigénétiques	<ul style="list-style-type: none"> • Hypométhylation de promoteur → levée de l'inhibition de transcription • Modifications d'histones → activation de la transcription normalement inactive 	<ul style="list-style-type: none"> • Modifications d'histones → perte d'expression de la protéine • Hyperméthylation du promoteur → perte d'expression de la protéine

Ces mutations conduisent à l'activation de voies de signalisation normalement activées par des facteurs de croissance. Ainsi, 40% des mélanomes humains contiennent des mutations affectant la structure de la protéine B-Raf, résultant dans la signalisation constitutive de la voie des MAPK (« Mitogen Activated Protein Kinase ») et l'activation de la mitose. De la même manière, dans plusieurs tumeurs, des mutations dans la sous-unité catalytique de la PI3K

(« Phosphoinositide 3-Kinase ») ont été retrouvées, conduisant à l'hyperactivation de cette voie de signalisation et de son effecteur Akt/PKB, qui contrecarre l'apoptose.

D'autres mutations permettent aux cellules d'échapper aux inhibiteurs de croissance telles que l'inactivation des protéines RB et TP53. En effet, dans une cellule normale, la protéine RB a pour rôle de permettre ou de bloquer la croissance et la division cellulaire de la cellule en réponse à de nombreux *stimuli* intra- et extracellulaires variables. De même, TP53 est un facteur de transcription répondant au stress et aux anomalies des systèmes intracellulaires : le degré de dommages génétiques, le nombre de nucléotides, les niveaux de glucose et d'oxygénation... Ainsi, TP53 peut bloquer le cycle cellulaire si les facteurs favorables à la croissance sont sub-optimaux ou induire l'apoptose dans le cas où il y a de trop gros dommages des systèmes cellulaires (*Hanahan et al. 2011*).

I.5) LA MORT CELLULAIRE PAR APOPTOSE

I.5.1) Généralités

Depuis les avancées scientifiques remarquables sur la connaissance des processus de mort cellulaire, les polluants atmosphériques sont considérées comme des inducteurs possibles d'apoptose comme de nécrose (*Orrenius et al. 2011*). En effet, les impacts sur l'activation ou la répression de l'apoptose sont maintenant mieux décrits et de nombreuses études *in vitro* ont démontré la modulation de l'apoptose par les polluants atmosphériques, y compris les métaux lourds ou de transition, le monoxyde de carbone, et les PCB (« Polychlorinated biphenyl », pour revue, voir *Andreau et al. 2012*).

L'apoptose est parfois appelée, « mort cellulaire programmée ». Cependant, ce terme désigne la mort cellulaire spatio-temporelle observée au cours du développement et lors de l'embryogenèse ; hors, aujourd'hui, les études ont prouvé que cette mort cellulaire n'est pas de nature apoptotique (pour revue, voir *Kroemer et al. 2009*). L'apoptose est une mort cellulaire définie par des altérations morphologiques dont l'arrondissement des cellules, la rétraction des pseudopodes, la diminution du volume cellulaire et nucléaire (pyknosis), la fragmentation nucléaire (karyorrhexis), le bourgeonnement de la membrane (« blebbing ») qui garde son intégrité jusqu'à la fin du processus, puis la formation de corps apoptotiques qui seront phagocytés par les macrophages et les cellules voisines (**Figure I.28**). Ces altérations morphologiques tardives sont accompagnées par des modifications biologiques, telles que la modification de la perméabilité et de la composition lipidique de la membrane plasmique, ou l'activation de différentes enzymes (par exemple la phospholipase A2, la DNase II, CAD (« Caspase-Activated Dnase »), l'endonucléase G (EndoG), le facteur d'induction d'apoptose (AIF)) conduisant à la fragmentation de l'ADN (*Andreau et al. 2012*).

L'apoptose peut être subdivisée en 3 phases successives : la phase d'initiation (activée par un *stimulus* intra- ou extracellulaire), la phase effectrice (le « point de non-retour ») et la phase finale de dégradation (les modifications morphologiques). Le processus apoptotique est régulé par des protéines pro-apoptotiques et anti-apoptotiques, dont l'action est contrôlée par

des *stimuli* externes ou internes à la cellule. On distingue donc deux grand types de voies apoptotiques : extrinsèque et intrinsèque.

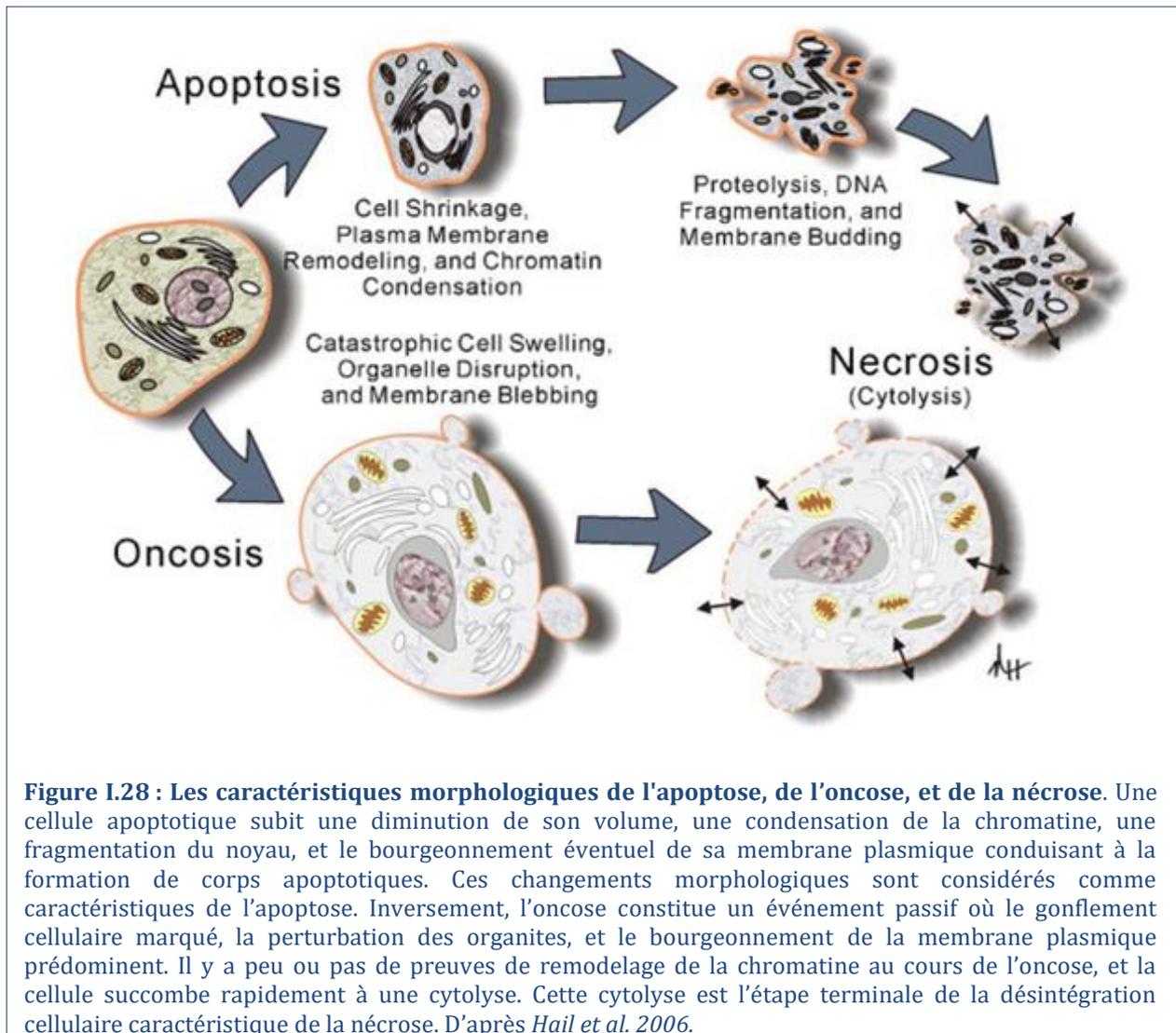


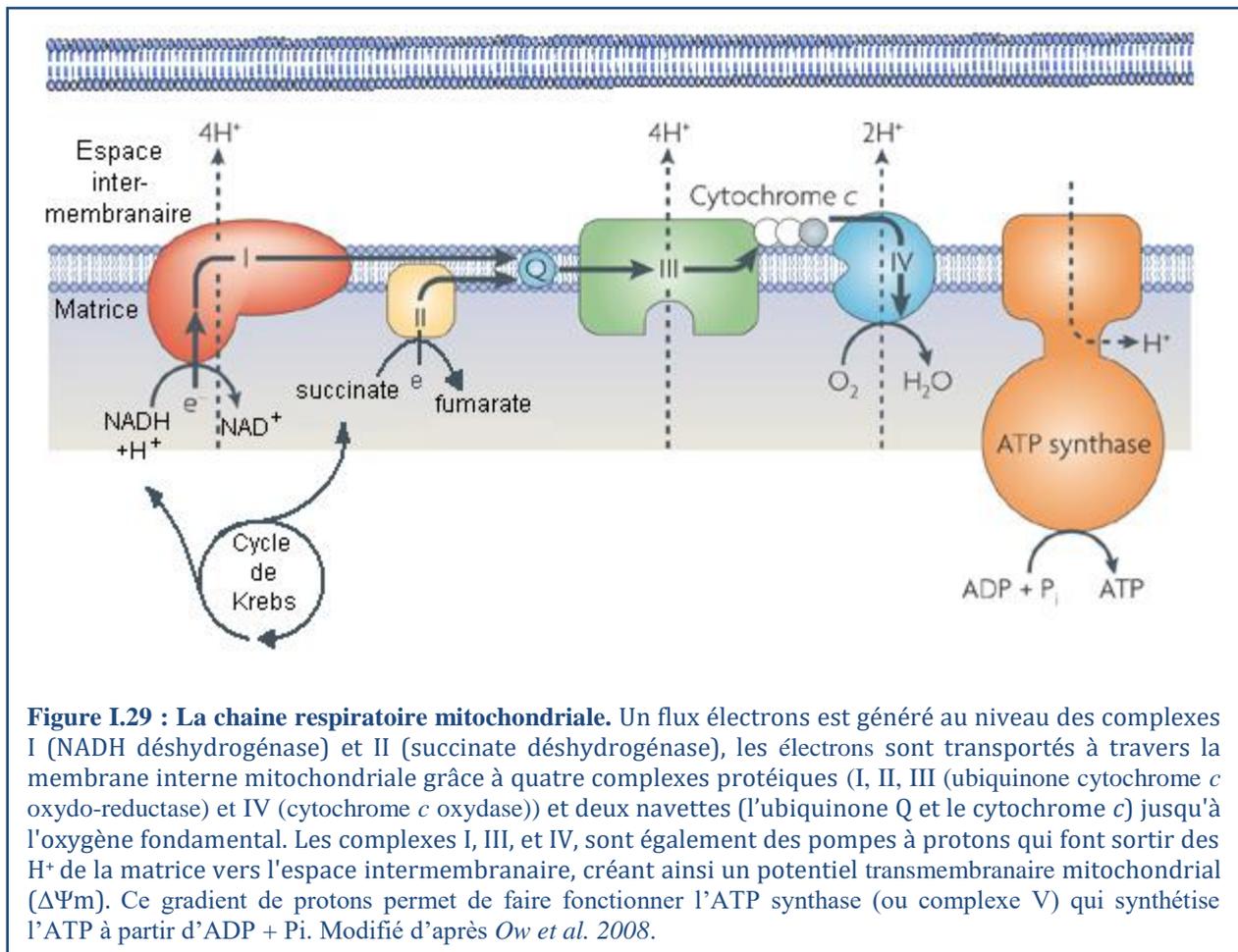
Figure I.28 : Les caractéristiques morphologiques de l'apoptose, de l'oncose, et de la nécrose. Une cellule apoptotique subit une diminution de son volume, une condensation de la chromatine, une fragmentation du noyau, et le bourgeonnement éventuel de sa membrane plasmique conduisant à la formation de corps apoptotiques. Ces changements morphologiques sont considérés comme caractéristiques de l'apoptose. Inversement, l'oncose constitue un événement passif où le gonflement cellulaire marqué, la perturbation des organites, et le bourgeonnement de la membrane plasmique prédominent. Il y a peu ou pas de preuves de remodelage de la chromatine au cours de l'oncose, et la cellule succombe rapidement à une cytolysse. Cette cytolysse est l'étape terminale de la désintégration cellulaire caractéristique de la nécrose. D'après *Hail et al. 2006*.

I.5.2) La voie intrinsèque

I.5.2.i) Rôle centrale de la mitochondrie

La voie intrinsèque, aussi appelée voie mitochondriale, peut être induite par de nombreux *stimuli* intracellulaires dont les dommages à l'ADN, le stress oxydant, une augmentation du calcium, l'excitotoxicité (liée à la sur-stimulation des récepteurs au glutamate dans le système nerveux), l'accumulation de protéines non repliées dans le réticulum endoplasmique (RE), *etc.* La voie intrinsèque repose sur la perméabilisation des membranes mitochondriales externes et internes (PMM) constituant le point de non-retour dans le processus de mort cellulaire apoptotique. Dans les cellules saines, la membrane mitochondriale interne est imperméable aux protons, afin de maintenir le gradient de H^+ et le potentiel transmembranaire mitochondrial ($\Delta\Psi_m$) nécessaires aux phosphorylations oxydatives de la respiration mitochondriale (**Figure I.29**, *Andreau et al. 2012*). Au repos, le gradient

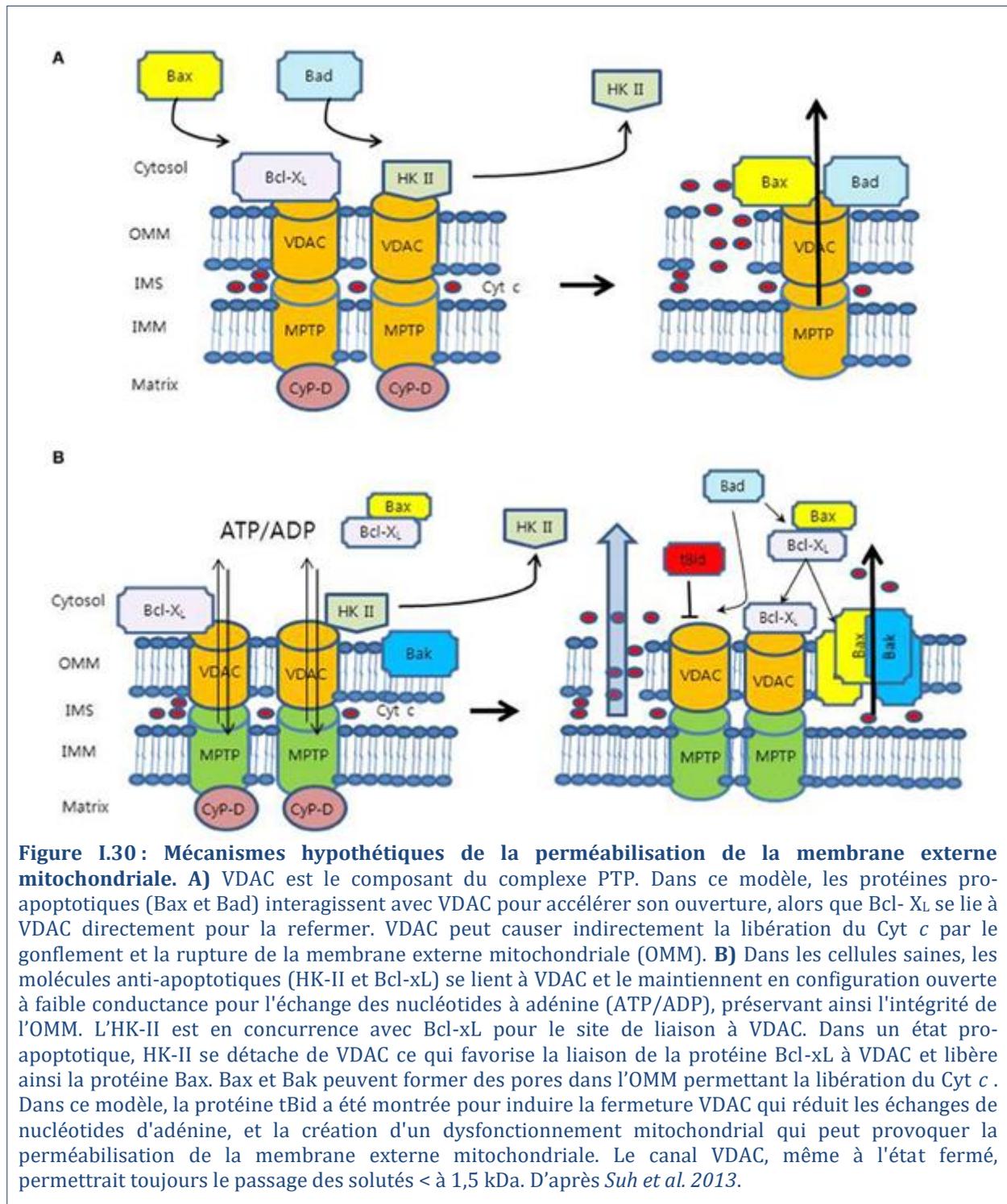
électrochimique entre le cytoplasme et l'intérieur des mitochondries est généralement compris entre -150 mV et -200 mV.



Dans les cellules mourantes, la PMM peut résulter de deux mécanismes moléculaires distincts, mais qui se chevauchent partiellement : i) les canaux formés par les protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 (par exemple BAX ou BAK, voir § I.5.2.iv) pourraient favoriser sélectivement la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale (MOMP, «Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization») ; ii) les inducteurs de mort cellulaire tels que la surcharge en Ca²⁺ et le stress oxydant augmentent la perméabilité de la membrane interne aux solutés de moins de 1,5 kDa (processus connu sous le nom de transition de perméabilité mitochondriale) en favorisant l'ouverture d'un complexe multi-protéique appelé pore de transition de perméabilité (PTP) (*Galluzzi et al. 2009*).

Malgré l'absence de consensus sur la composition exacte du PTP, une des hypothèses le décrit comme comprenant le canal anionique voltage-dépendant (VDAC) inséré dans la membrane externe mitochondriale, l'ANT (« Adénine Nucléotide Translocator ») situé dans la membrane interne et la Cyclophiline-D (Cyp-D) localisée dans la matrice mitochondriale (**Figure I.30**). Il existe quatre isoformes de l'ANT et trois isoformes de VDAC qui ont des effets antagonistes sur l'apoptose. En effet, VDAC1, ANT1, et ANT3 sont pro-apoptotiques, alors que VDAC2, ANT2 et ANT4 sont capables de protéger les cellules contre la mort.

Plusieurs régulateurs interagissent étroitement avec les protéines du PTP, dont l'Hexokinase II (HK-II) et les protéines de la famille Bcl-2, la protéine de translocation TSPO, et la créatine kinase qui interagissent avec VDAC dans le cytosol, la membrane externe, et l'espace intermembranaire, respectivement. Cependant, plusieurs études ont rapporté qu'aucun d'entre eux ne ferait partie du PTP, même si ANT et Cyp-D en sont des régulateurs (**Figure I.30**).



La PMM a pour conséquence i) la chute du $\Delta\Psi_m$ avec l'arrêt subséquent de la production d'ATP et la modification des transports intermembranaires mitochondriaux, ii) la sortie de facteurs pro-apoptotiques contenus dans l'espace intermembranaire tels que le Cytochrome *c* (Cyt *c*), considérée comme «un point de non-retour», l'AIF, l'Endo G, les protéines bloquant les inhibiteurs de caspases (IAP, « Inhibitor Apoptosis Proteins ») comme SMAC/DIABLO (« Second Mitochondria-derived Activator of Caspases ») et Htra2 (« High temperature requirement protein A2 »), iii) l'inhibition de la chaîne respiratoire mitochondriale, induisant une surproduction d'ERO et l'augmentation du signal de mort (pour revue voir [Galluzzi et al. 2012](#)).

Après sa libération dans le cytoplasme, le Cyt *c* participe à la formation d'un mégacomplexe protéique, appelé apoptosome, comprenant Apaf1 et dATP, et qui permet l'activation de la Caspase-9 puis de la Caspase-3. En parallèle l'ADN est fragmenté de manière indépendante des caspases par les enzymes pro-apoptotiques comme AIF et EndoG, et les protéines SMAC/DIABLO et HTRA2 inhibent les protéines anti-apoptotiques IAP. Htra2 exerce aussi une fonction de dégradation des protéines grâce à son activité sérine-protéase (pour revue voir [Galluzzi et al. 2012](#)).

Ainsi, deux types de signalisation, pour la voie intrinsèque de l'apoptose, peuvent être différenciés : une voie dépendante des caspases et une voie indépendante des caspases (*via* les protéines de l'espace intermembranaire mitochondrial (dont AIF, EndoG, HTRA2, et SMAC/DIABLO). De plus, des protéases autres que les caspases, participent à la signalisation apoptotique telles que les calpaïnes.

1.5.2.ii) Les caspases

Les caspases (« cysteinyl aspartate specific proteases ») sont des protéases très spécifiques qui clivent leurs substrats après des motifs térapeptidiques spécifiques (P4 - P3- P2 - P1) où P1 est un résidu Asp. Dans les cellules saines, les caspases sont exprimées sous forme de zymogènes ayant un prodomaine N-terminal de longueur variable (**Figure I.31**). La famille des caspases comprend quatorze membres identifiés chez les mammifères et ayant des fonctions dans la différenciation (Caspase-14), l'inflammation (Caspases-1, -4, -5, -11, -12 et -13) et l'apoptose (Caspases -2, -3, -6, -7, -8, -9, -10). Les caspases de l'apoptose sont dites initiatrices ou exécuteurs. Les caspases initiatrices -2, -8, -9 et -10, possèdent un prodomaine long et s'activent de manière auto-catalytique en formant une enzyme tétramérique constituée de 2 grandes (~20 kDa chacune) et 2 petites sous-unités (~10 kDa chacune) ([Taylor et al. 2008](#)) qui peuvent protéolyser et activer les caspases exécuteurs (-3, -6 et -7). Ces caspases exécuteurs clivent la grande majorité des substrats (~400 substrats identifiés) au cours de l'apoptose et modifient ainsi plusieurs fonctions cellulaires telles que la réparation de l'ADN (DNA-PK, U1-70 kDa, PARP), la condensation de la chromatine (ICAD), ou la stabilité du cytosquelette (α -fodrine, Lamin A, actine) ([Andreau et al. 2012](#)).

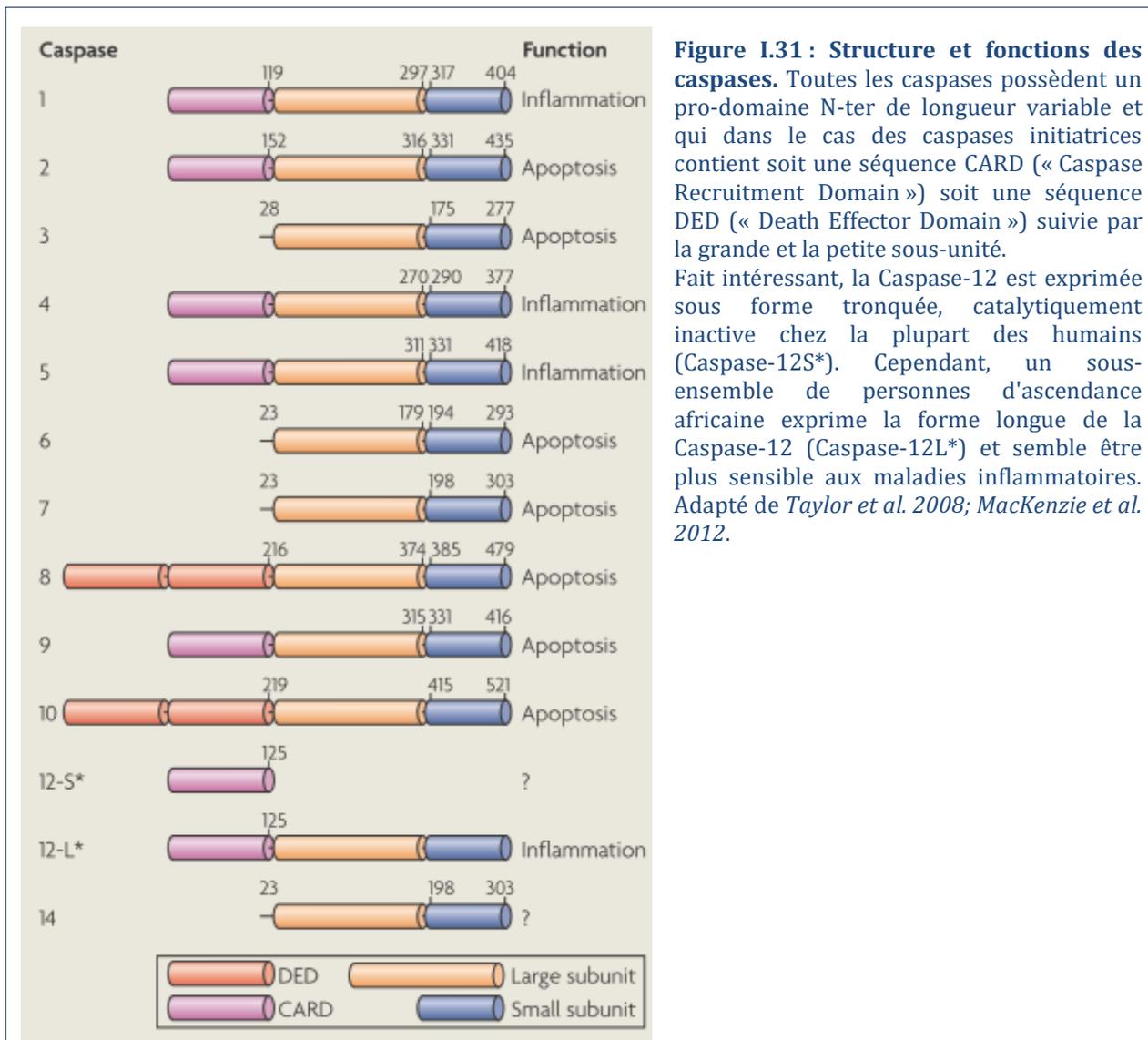


Figure I.31 : Structure et fonctions des caspases. Toutes les caspases possèdent un pro-domaine N-ter de longueur variable et qui dans le cas des caspases initiatrices contient soit une séquence CARD (« Caspase Recruitment Domain ») soit une séquence DED (« Death Effector Domain ») suivie par la grande et la petite sous-unité. Fait intéressant, la Caspase-12 est exprimée sous forme tronquée, catalytiquement inactive chez la plupart des humains (Caspase-12S*). Cependant, un sous-ensemble de personnes d'ascendance africaine exprime la forme longue de la Caspase-12 (Caspase-12L*) et semble être plus sensible aux maladies inflammatoires. Adapté de Taylor et al. 2008; MacKenzie et al. 2012.

I.5.2.iii) Les calpaïnes

Les calpaïnes sont des protéases à cystéine, non-lysosomiales, dont l'activité de type papaïne, est dépendante du calcium. La famille des calpaïnes est composée de deux isoformes majeures, I et II, structurées en hétérodimères constitués d'une grande sous-unité catalytique (80 kDa) et d'une petite sous-unité régulatrice (30 kDa) contenant une séquence de liaison au calcium. Dans les conditions normales la concentration en Ca^{2+} dans les cellules est de 50 à 100 nM, les calpaïnes I et II sont activées lorsque les concentrations en Ca^{2+} sont de l'ordre du μM et du mM, respectivement. Une fois activées, les calpaïnes dégradent des substrats membranaires, cytosoliques et nucléaires, conduisant à des modifications morphologiques, la détérioration de l'architecture cellulaire et finalement l'apoptose (pour revue voir *Momeni 2011*).

I.5.2.iv) Les protéines de la famille Bcl-2

La phase effectrice de l'apoptose peut être modulée positivement ou négativement par les protéines de la famille Bcl-2 (« B-cell lymphoma-2 »), qui agissent principalement par la régulation de la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale et la libération du Cyt

c. La famille Bcl-2 est composée de trois groupes correspondant à des protéines de survie (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1, et A1/Bfl1), des effecteurs pro-apoptotiques (Bax, Bak), et une troisième sous-famille appelée « BH3-only » (Bad, Bik, HRK, Bid, Bim, Bmf, NOXA, et Puma) qui module l'activation des deux premiers groupes (**Figure I.32**). Les facteurs pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 sont inactifs dans le cytosol, tandis que la majorité des facteurs anti-apoptotiques sont insérés dans la membrane externe mitochondriale où ils peuvent inhiber la PMM ou interagir avec Apaf-1 dans le cytosol, conduisant à une diminution de formation de l'apoptosome. Bcl-2 empêche également la production excessive d'ERO et les impacts ultérieurs sur le stress oxydant. Lors de l'initiation de l'apoptose, les protéines pro-apoptotiques sont activées et migrent à la mitochondrie, tandis que les protéines anti-apoptotiques sont inactivées. Cette activation/inactivation peut être post-traductionnelle (changement de conformation, activation des protéines pro-apoptotiques), ou bien post-transcriptionnelle (augmentation de l'expression du gène *bax* et diminution de l'expression du gène *bcl-2* par la protéine p53).

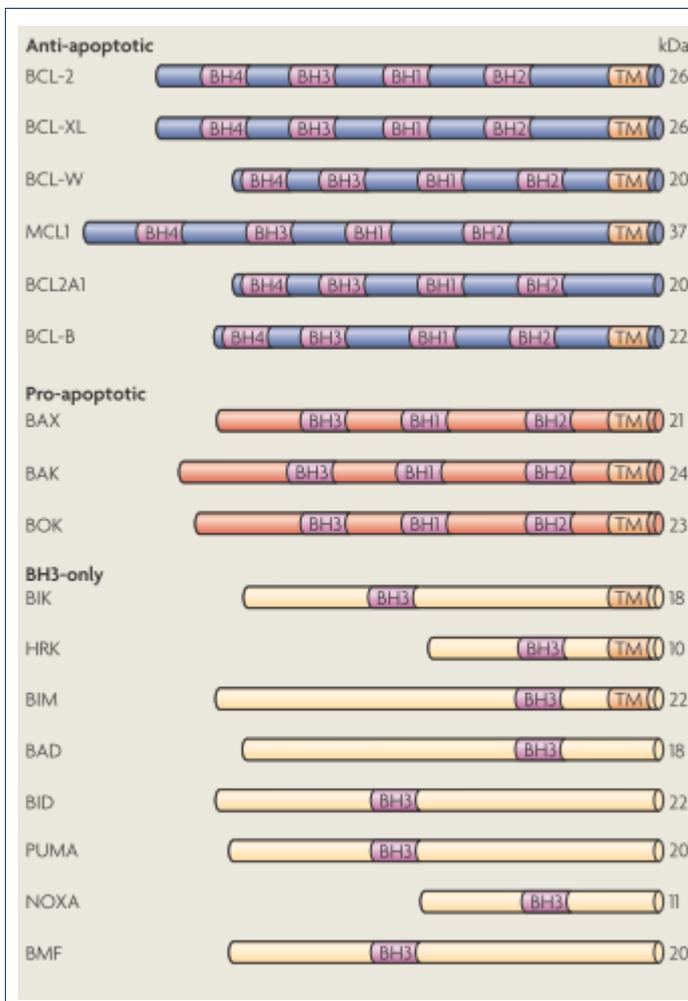


Figure I.32 : Les protéines de la famille Bcl-2. La famille Bcl-2 comprend trois sous-familles qui contiennent entre 1 et 4 domaines d'homologie (BH).

La sous-famille des protéines anti-apoptotiques comprend quatre domaines BH et un domaine transmembranaire (TM) à l'exception de Bcl-2A1.

Les protéines pro-apoptotiques de la sous-famille BAX sont dépourvues du domaine BH4 et favorisent l'apoptose par la formation de pores dans la membrane externe mitochondriale.

La sous-famille « BH3-only » est un groupe structurellement diversifié de protéines qui possèdent uniquement le domaine BH3. D'après Taylor et al. 2008.

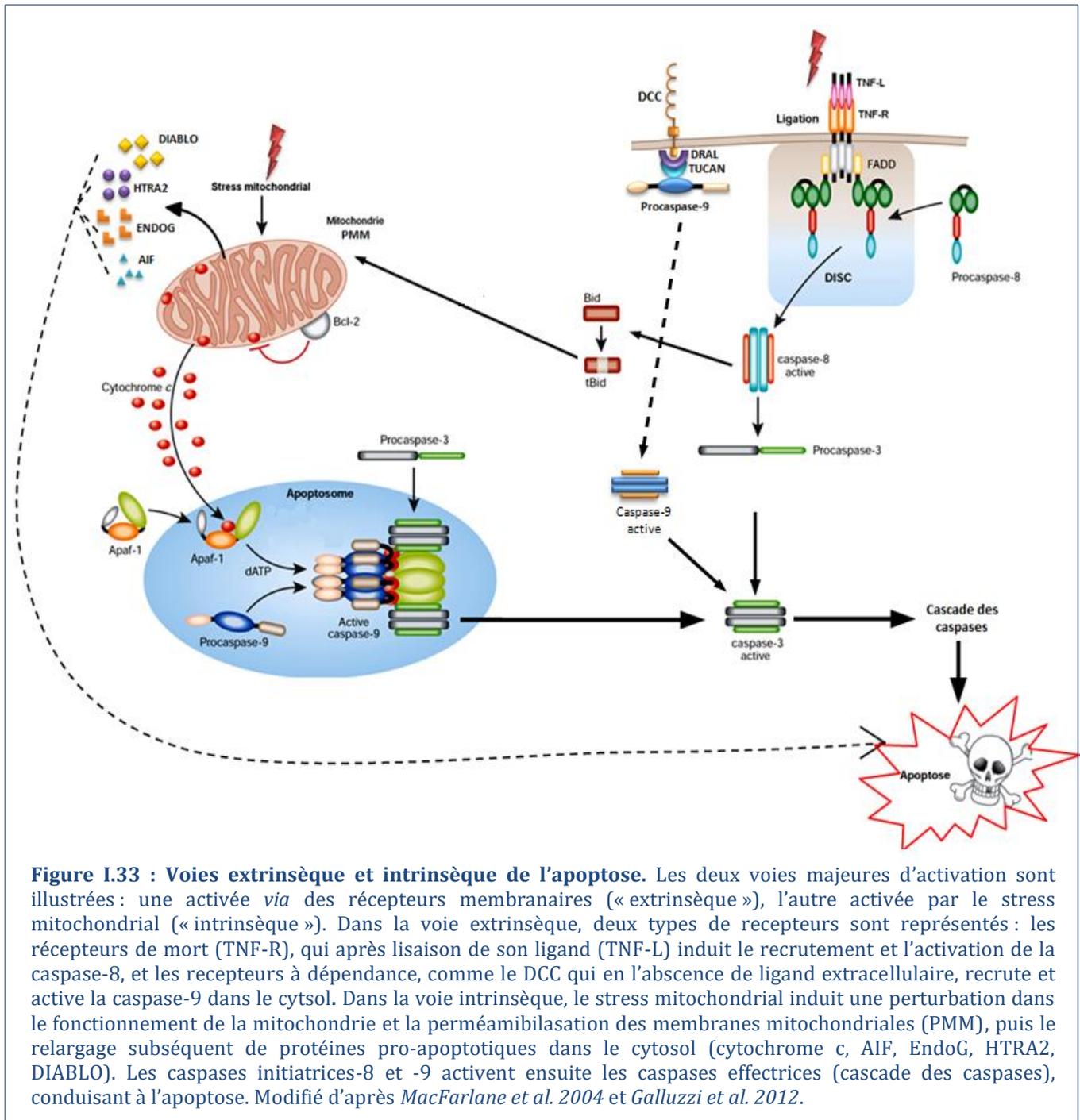
1.5.3) La voie extrinsèque

Le terme « voie extrinsèque » regroupe les cas de mort cellulaire par apoptose induite par des signaux de stress extracellulaires, détectés et propagés par des récepteurs transmembranaires spécifiques qui conduisent à l'activation des caspases. L'apoptose extrinsèque peut être activée par des **récepteurs de morts** sur lesquels se lient des ligands spécifiques tels que FAS/CD95L, le TNF α et le TRAIL (« TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand ») ; ou par des « **récepteurs à dépendance** » (comme DCC et UNC5B), qui n'exercent leurs fonctions létales que lorsque la concentration de leurs ligands spécifiques est inférieure à un niveau de seuil critique (pour revue voir *Galluzzi et al. 2012*).

Le fonctionnement des récepteurs de mort de la superfamille des TNF-R (« Tumor Necrosis Factor Receptors ») tels que Fas et TNF-R1, est bien connu : la liaison du ligand induit l'oligomérisation des récepteurs puis le recrutement d'une protéine adaptatrice FADD (« Fas-Associated Death Domain ») qui possède des domaines DD (« Death Domain ») et DED (« Death Effector Domain ») capables de se lier aux domaines DD des récepteurs et DED des caspases, respectivement. Le recrutement de la procaspase initiateur -8 ou -10, forme le complexe DISC (« Death Inducing Signaling Complex ») qui permet l'auto-activation des caspases initiateur (**Figure I.33**).

Concernant les récepteurs à dépendance, ils constituent une nouvelle classe de récepteurs capables, en absence de leur ligand, d'induire l'apoptose. Les mécanismes apoptotiques induits par les récepteurs à dépendance restent encore sujet d'investigation mais semblent nécessiter de manière consensuelle des récepteurs sous forme monomérique localisés au sein des rafts, et l'interaction avec une protéine adaptatrice pour activer certaines caspases initiateur (*Thibert et al. 2010, Galluzzi et al. 2012*).

Trois cascades de signalisation, pour la voie extrinsèque de l'apoptose, ont été décrites (**Figure I.33**, pour revue voir *Galluzzi et al. 2012*) : i) la signalisation par les récepteurs de mort, puis l'activation des caspases initiateur et exécuteur, ii) le clivage de la protéine pro-apoptotique Bid en t-Bid par la Caspase-8, qui induit la PMM et l'activation de la Caspase-9 puis des caspases exécuteur, iii) la signalisation par la privation de ligand des récepteurs à dépendance, puis l'activation directe (ou indirecte) de certaines caspases initiateur, comme la Caspase-9.



I.5.3) Rôle du calcium dans le processus apoptotique

Le calcium est un messager intracellulaire universel dans les cellules de mammifères, les voies de signalisation calcique sont nombreuses et peuvent s'interconnecter pour créer une large gamme de signaux spatiaux temporels. Le Ca^{2+} peut provenir de l'intérieur ou de l'extérieur de la cellule et réguler de nombreuses fonctions dont la viabilité. Dans la cellule, le calcium est en grande partie stocké dans le réticulum endoplasmique (RE), la mitochondrie, les lysosomes et le noyau, soit complexé à des protéines, soit sous forme libre. Bien que l'homéostasie calcique soit connue depuis longtemps pour être impliquée dans l'initiation et le déroulement de la mort

cellulaire, c'est seulement ces dernières années que le rôle du calcium dans la signalisation de l'apoptose a été étudié. L'apoptose peut être provoquée par une perte totale du contrôle de l'homéostasie calcique, mais peut aussi être finement régulée, positivement ou négativement, par des changements plus subtils en calcium dans sa concentration et sa distribution au sein des différents compartiments cellulaires. Ainsi, le calcium peut aussi bien protéger les cellules que provoquer leur mort.

1.5.3.i) Le réticulum endoplasmique

Dans la cellule, le stockage du calcium et la signalisation calcique, ainsi que le repliement, la modification et le tri des protéines nouvellement synthétisées, sont parmi les principales fonctions du RE. Des perturbations dans une de ces fonctions peuvent conduire à ce qu'on appelle le stress du RE. Ainsi, un excès autant qu'un défaut de Ca^{2+} dans le RE peut entraîner des changements dans le repliement des protéines (qui vont se replier trop ou insuffisamment) et induire un stress du RE. La réponse à ce stress est progressive (comme celle du stress oxydant) : il implique d'abord les protéines chaperons du RE pour replier correctement les protéines, puis induit la production de cytokines et interférons qui aident à l'élimination des protéines mal repliées et/ou accumulées dans le RE. Enfin un stress prolongé peut conduire à l'activation de la Caspase-12, localisée dans le RE, par une calpaïne préalablement activée par le Ca^{2+} (pour revue voir *Orrenius et al. 2003*)

1.5.3.ii) La mitochondrie

Dans les mitochondries, les entrées et sorties de calcium sont contrôlées par des canaux, localisés dans les membranes mitochondriales internes et externes. L'entrée du calcium dans la mitochondrie est régulée par le canal VDAC au niveau de la membrane externe mitochondriale et par un canal à proton appelé uniport calcique mitochondrial (MCU « Mitochondrial Calcium Uniporter ») à travers la membrane interne mitochondriale (*Hajnoczky et al. 2006*).

Le MCU est un canal calcium hautement sélectif localisé dans la membrane interne mitochondriale. Ce complexe est composé d'une sous unité MCU de 40 kDa formant le pore proprement dit ainsi que des protéines MICU1 (« Mitochondrial Calcium Uptake 1 ») et MCUR1 (« Mitochondrial Calcium Uniporter Regulator 1 », *Chaudhuri et al. 2013*). Le MCU permet l'accumulation de Ca^{2+} dans les mitochondries, ce qui, dans certaines conditions pathologiques, peut protéger les cellules contre différents stress (*Smaili et al. 2013*). Une fois accumulés, les ERO causent des dommages cellulaires par oxydation des constituants cellulaires y compris les acides gras polyinsaturés, les acides aminés, et les nucléotides, qui peuvent induire l'apoptose (*Smaili et al. 2013*).

Par ailleurs, l'élévation de Ca^{2+} dans le cytosol peut conduire à l'ouverture du PTP, induisant la PMM, la libération des facteurs apoptogènes et l'induction de la voie intrinsèque de l'apoptose. Cette PMM semble avoir lieu *via* l'activation des protéines de la famille Bcl-2. En effet, dans le cytosol, l'élévation de calcium active les calpaïnes qui peuvent cliver et activer Bid, ou encore réduire l'activité des protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-xL en les clivant dans leur partie N-terminale. L'élévation de Ca^{2+} cytosolique active aussi la Calcineurine (phosphatase

dépendante du calcium, également connue comme PP2B) qui déphosphoryle Bad et active la voie mitochondriale intrinsèque. Enfin, les membranes du RE et des mitochondries sont en contact étroit et forment des microdomaines (nommés MAM, « Mitochondrial-Associated endoplasmic reticulum Membrane »), enrichis en protéines transmembranaires permettant des échanges rapides de calcium entre ces deux compartiments (*Bonneau et al. 2013*).

I.5.4) Rôle du stress oxydant dans le processus apoptotique

Les principales sources d'ERO cellulaires sont les mitochondries de par les phosphorylations oxydatives (**Figure I.29**). Ainsi, la concentration d'anion superoxyde dans la matrice mitochondriale a été estimée être de 5 à 10 fois plus élevée que dans le cytosol. La Mn-SOD, localisée dans la matrice mitochondriale dismute rapidement $O_2^{\circ-}$ en H_2O_2 qui à son tour peut former d'autres ERO très réactifs comme le radical superoxyde HO° (voir § I.4, *Andreau et al. 2012*).

La production d'ERO mitochondriaux peut être responsable de l'activation des voies de mort par : i) l'induction de dommages à l'ADN nucléaire et mitochondrial (notamment formation de 8-OHdG) conduisant à la mort cellulaire dépendante de la protéine p53, ii) l'activation des voies de signalisation impliquant NF- κ B, JNK ou p38 MAPK, iii) la PMM liée à une augmentation de Ca^{2+} intracellulaire et l'ouverture du PTP (voir § I.5.3), et iv) la libération du Cyt *c* par oxydation des lipides membranaires mitochondriaux (cardiolipine). Néanmoins, la production d'ERO au niveau de la mitochondrie peut également participer à la protection contre l'apoptose par activation des systèmes anti-oxydants tels que le GSH, la GPx, la GST.

I.5.5) Apoptose intrinsèque induite par les particules atmosphériques

Pour revue voir **Annexe2**, (*Andreau et al. 2012*)

L'apoptose est l'une des conséquences possibles de l'exposition aiguë ou chronique aux polluants atmosphériques, qui sont capables de cibler la mitochondrie directement ou indirectement. Bien que de nombreuses études décrivent la capacité des PM à induire certaines caractéristiques de l'apoptose, seules quelques études mécanistiques détaillées ont été publiées, montrant une induction de l'apoptose associée à : un stress cellulaire, la production d'ERO, la baisse du $\Delta\Psi_m$, l'activation des caspases, et la fragmentation de l'ADN. La mort cellulaire démontrée dans des cellules épithéliales pulmonaires ou respiratoires humaines est une apoptose mitochondriale caractérisée par la réduction de l'activité des déshydrogénases mitochondriales, la libération du Cytochrome *c*, l'activation des caspases -9 et -3, en corrélation avec l'induction d'un stress oxydant (**Figure I.34**).

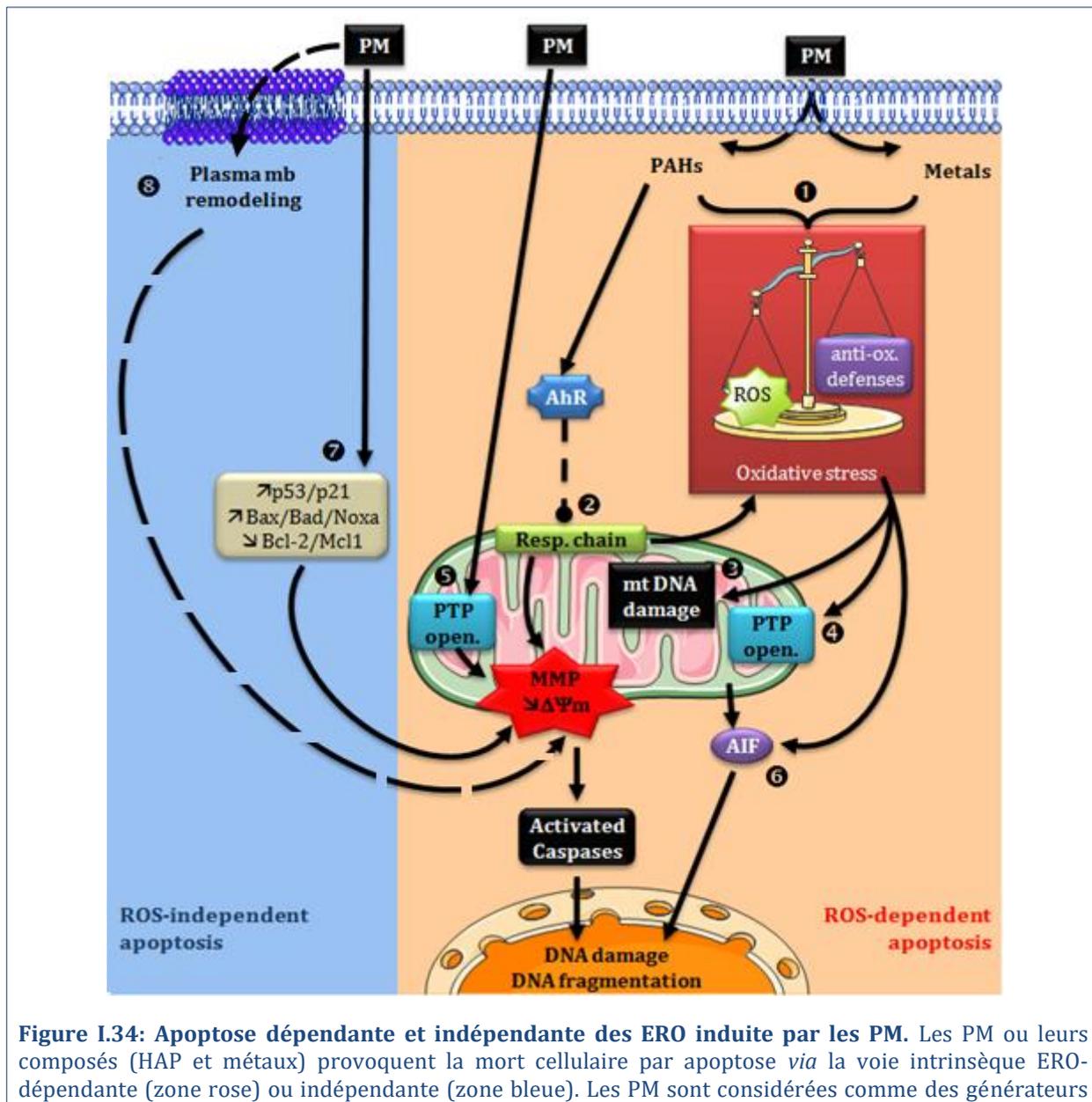


Figure I.34: Apoptose dépendante et indépendante des ERO induite par les PM. Les PM ou leurs composés (HAP et métaux) provoquent la mort cellulaire par apoptose *via* la voie intrinsèque ERO-dépendante (zone rose) ou indépendante (zone bleue). Les PM sont considérées comme des générateurs puissants d'ERO (ROS) dus à leurs composés organiques (HAP) ou métalliques ① et menant à un stress oxydant, résultat du déséquilibre entre la production de d'ERO (ROS) et l'activation des défenses anti-oxydantes. Selon *Senft et al. 2002*, l'activation du AhR pourrait réguler la fonction de la chaîne respiratoire mitochondriale et induire la production de $O_2^{\cdot-}$ et H_2O_2 à partir des mitochondries ②. Le stress oxydant a pour conséquence des lésions de l'ADN mitochondrial ③, la peroxydation des lipides membranaires mitochondriaux, et l'ouverture du PTP ④. La perméabilisation des membranes mitochondriales (MMP) et l'ouverture du PTP pourraient également être des effets directs des PM ⑤, comme démontré par les particules Diesel sur des mitochondries isolées (*Xia et al. 2004*). L'activité apoptogène d'AIF peut être induite par les PM, ou leurs dérivés oxydés ⑥. D'autres voies de signalisation indépendantes des ERO ont été identifiées comme l'augmentation des protéines pro-apoptotiques et/ou la répression des protéines de survie de la famille Bcl-2 ⑦. Enfin, de récentes publications suggèrent également un mécanisme de l'apoptose déclenché par des modifications de la composition et le remodelage de la membrane plasmique ⑧. Modifié d'après *Andreau et al. 2012*.

I.5.5.i) Rôle du stress oxydant induit par les composés organiques des PM

Les polluants particuliers sont considérés comme des oxydants puissants, et l'induction de la voie intrinsèque de l'apoptose peut être due à un stress oxydant généré par les composés organiques (tels que les HAP, les nitro-HAP et les quinones) et inorganiques (tels que les métaux) adsorbés sur la surface des particules.

Les composés organiques sont capables d'avoir le même effet apoptogène que les PM dans divers types cellulaires *via* l'activation du récepteur « Aryl hydrocarbène » (AhR). L'AhR est un facteur de transcription cytoplasmique qui, après liaison de son ligand, transloque dans le noyau en vue de fixer l'élément de réponse aux xénobiotiques (XRE, « Xenobiotic Responsive Element») au niveau des promoteurs de ses gènes cibles, conduisant à l'activation de la transcription des enzymes de phase I et II du métabolisme des xénobiotiques. Ces enzymes de phase I telles que le cytochrome P450 1A1 produisent du H₂O₂ en métabolisant par exemple le benzo(a)pyrène (BaP) en un intermédiaire réactif BPDE (anti-7,8-dihydrodiol-9,10-époxy-benzo(a)pyrène) connu pour déclencher des dommages de l'ADN et la carcinogenèse (voir § I.4.2.iv et I.4.3).

Parmi les dioxines et dioxines-like, la TCDD (2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine) est l'une des plus réactives. Des études *in vivo* chez des souris exposées à la TCDD ont montré une réponse oxydative importante en corrélation avec la haute affinité de la liaison TCDD-AhR, ce qui suggère un lien étroit entre le stress oxydant et l'AhR. Notamment, l'exposition de souris à la TCDD (15 mg/kg) pendant trois jours consécutifs induit la production d'ERO mitochondrial (O₂^{•-} et de H₂O₂) en présence de succinate, la déplétion d'ATP, ainsi que l'activation de la GPx et de la Glutathion Reductase. A l'inverse, l'extinction du gène AhR par Knock-Out, protège de ces effets, ce qui suggère que la source majeure de stress oxydant induit par l'AhR a pour origine la respiration mitochondriale (Senft *et al.* 2002).

En conséquence d'un stress oxydant, les mitochondries sont souvent endommagées, conduisant à la PMM. Des expériences réalisées sur des cellules HepG2 (lignée cellulaire de carcinome hépatique humain) ont clairement montré que l'anion superoxyde O₂^{•-} peut à lui seul induire l'apoptose suite à la sortie rapide et importante du Cyt *c* dans le cytosol indépendamment de l'ouverture du PTP mais plutôt par une perméabilisation VDAC-dépendante de la membrane externe mitochondriale (Madesh *et al.* 2001). L'induction de la PMM par les particules semble au contraire être dépendante de l'ouverture du PTP puisqu'une étude réalisée sur des mitochondries isolées de foies de souris a montré que la fraction aromatique des particules Diesel induit le gonflement (« swelling ») de la mitochondrie et la dépolarisation des membranes mitochondriales, qui sont contrecarrés par l'utilisation d'un inhibiteur du PTP, la cyclosporine A (CsA), suggérant que les composés organiques peuvent directement induire la PMM *via* l'ouverture du PTP (Xia *et al.* 2004).

En outre, d'autres dommages mitochondriaux peuvent avoir lieu en conséquence du stress oxydant comme l'oxydation de la cardiolipine qui peut être un événement crucial de la mort cellulaire déclenchée par les XB. En effet, l'accumulation d'hydroperoxydes de cardiolipine et leurs dérivés hydroxylés ont été mis en évidence dans des conditions de stress oxydant,

d'inflammation, et lors de l'apoptose. Outre la peroxydation des lipides mitochondriaux, l'O₂[°]- et le H₂O₂ peuvent endommager les protéines ainsi que l'ADN mitochondrial. L'ADN mitochondrial (ADNmt) est l'une des principales cibles des ERO en raison de la proximité du site de production et l'absence d'histones protecteurs. Notamment, la TCDD à faibles doses induit préférentiellement une génotoxicité au niveau mitochondrial plutôt que nucléaire, induisant la formation de 8-OHdG, la réduction du nombre de copies d'ADNmt, et des mutations par délétion dans l'ADNmt (*Andreau et al. 2012*).

I.5.5.ii) Rôle du stress oxydant induit par les composés métalliques des PM

En plus des composés organiques, des métaux lourds et de transition (tels que le vanadium, le cadmium, le mercure, le plomb, l'aluminium, le titane, le chrome, le fer, le cobalt, le nickel, le cuivre et le zinc) sont souvent trouvés dans les polluants atmosphériques et font partie des composés inorganiques adsorbés sur les PM, principalement F et UF. Certains métaux ont un double rôle en tant qu'inducteurs importants d'ERO et en tant que cofacteurs essentiels pour certaines enzymes anti-oxydantes. Les métaux de transition peuvent promouvoir l'apoptose par la génération d'ERO, l'altération des mitochondries, l'activation des MAP Kinases, de p53, et des caspases, ou la régulation de protéines de la famille Bcl-2.

Les métaux et la fraction soluble des PM sont également connus pour causer l'inflammation et la carcinogénèse principalement en raison de dommages à l'ADN suite à la production d'ERO par la réaction de Fenton (voir § I.4.2.ii et iii). En effet, les métaux carcinogènes (tels que l'arsenic, le cadmium, le chrome, le nickel, *etc.*) induisent des modifications des bases, des cassures et des réarrangements de l'ADN pouvant conduire à l'apoptose ou à la cancérogenèse (voir § I.4.4). L'arsenic induit l'apoptose *via* la génération d'ERO, la diminution de GSH intracellulaire, l'accumulation de Ca²⁺, la chute du ΔΨ_m, l'augmentation de la Caspase-3, la régulation négative de la protéine Bcl-2, et l'inhibition de la protéine p53. Dans le cas du cadmium, l'expression de la métallothionéine détermine le type de mort cellulaire induite (entre l'apoptose et la nécrose), l'apoptose est induite suite à l'inhibition des enzymes anti-oxydantes, des altérations mitochondriales et l'ouverture du PTP, probablement par le biais de son interaction avec les groupes thiols de l'ANT. Enfin, la génération d'ERO et l'activation de p53 contribuent à l'apoptose provoquée par le chrome et le sélénium. Néanmoins, les PM contenant des niveaux élevés de métaux non cancérogènes (tels que le cobalt, le plomb, le fer et le zinc) ont aussi été associés à la génération d'ERO (notamment l'H₂O₂) conduisant à l'apoptose par la voie mitochondriale. Lors de l'apoptose, le zinc est également capable d'augmenter l'expression et la fonctionnalité de p53, probablement en stabilisant cette protéine qui contient un atome de zinc nécessaire à son activité de liaison à l'ADN.

De plus les ERO peuvent induire une autre voie d'apoptose *via* l'activité de la protéine apoptogène AIF. AIF est une flavoprotéine située dans membrane interne de la mitochondrie, elle est bi-fonctionnelle : essentielle pour le métabolisme énergétique et pour l'induction de l'apoptose indépendante des caspases. AIF est impliquée dans l'induction de l'apoptose en provoquant la fragmentation de l'ADN, la condensation de la chromatine, et la PMM. AIF peut

aussi avoir une fonction oxydoréductase sous sa forme réduite et dimérisée (formant un complexe avec FADH₂-NAD (Sevrioukova 2009). Les monomères oxydés ont une plus grande affinité avec l'ADN que les dimères réduits, ainsi, les ERO participent à l'oxydation d'AIF et à l'activation subséquente de l'apoptose indépendante des caspases. De plus, une récente étude a démontré que l'AIF a une activité réductase qui est environ mille fois inférieure à celle du cytochrome P450 ou de la NADPH quinone oxydoréductase (NQO1) impliqués dans les phases I et II du processus de détoxification des XB (voir § I.4). Ceci suggère que l'interaction d'AIF avec les XB ou leurs dérivés pourrait promouvoir sa forme oxydée et renforcer son activité apoptogène. En ce sens, l'apoptose induite par les PM ou les extraits de fumée de bois dans les macrophages alvéolaires humains et les cellules endothéliales de l'artère pulmonaire a été associée à la régulation positive d'AIF et sa translocation au noyau (Liu, P.L. et al. 2005).

I.5.5.iii) Autres voies impliquées dans l'apoptose induite par les PM

Grâce à tous les exemples cités précédemment, il est clair que la cytotoxicité des polluants atmosphériques (PM, HAP, métaux, ou herbicides), dans divers types cellulaires, incrimine principalement à la production excessive d'ERO capables de cibler les mitochondries par différents mécanismes (Figure I.34). D'autre part, les PM sont capables d'activer d'autres voies de signalisation d'apoptose indépendantes du stress oxydant. Ainsi, différentes PM peuvent activer l'expression de régulateurs puissants comme p53, p21, Noxa, Bax, Bad, Bim et en parallèle la répression de Bcl-2 et Mcl-1. En outre, de récentes études soulignent l'important rôle des modifications membranaires (fluidité membranaire, raft lipidiques, ...) dans les mécanismes de mort cellulaires et de cancérogenèse. En effet, plusieurs études ont démontré un lien entre l'apoptose induite par certains HAP, tels que le B(a)P et le Phénanthrène, et une augmentation de la fluidité ainsi que des changements de composition lipidiques de la membrane plasmique (Tekpli et al. 2013). Ainsi, il a été décrit un nouveau mécanisme de l'apoptose, déclenchée par le 1-nitropyrene et le BaP, via l'accumulation de lipides, des modifications de microstructures de la membrane plasmique, notamment la modulation de l'échangeur Na⁺/H⁺, l'inhibition des jonctions gap communicatives, la modification de la composition des radeaux lipidiques, et le stress oxydant. Ces résultats intéressants soulignent le lien possible entre les altérations de la membrane plasmique et la mort cellulaire. Les impacts sur le remodelage de la membrane plasmique pourraient fournir des explications mécanistiques supplémentaires sur la façon dont certains produits chimiques exercent leur effet cancérogène (Tekpli et al. 2011).

I.5.5.iv) Rôle de la taille des PM

En plus de la composition, la taille est aussi un caractère déterminant dans la cytotoxicité des PM. Le potentiel oxydant des particules F et UF est plus important que celui des particules G du fait de leur plus grande surface et de leur composition souvent riche en HAP et métaux (Churg et al. 1997; Baulig et al. 2004; Rumelhard et al. 2007b; Pietrodangelo et al. 2013). Une fois internalisées les petites particules sont plus à même d'induire un stress oxydant intracellulaire et des dommages, directs ou indirects, sur les membranes et les organites de la cellule. Des particules UF ont notamment été retrouvées dans les mitochondries (Li, N. et al. 2003b) et les

lysosomes (Yue et al. 2010). La toxicité des PM_{2.5} est liée aux peroxydations lipidiques, l'altération de l'activité des SOD et la diminution du taux de glutathion, conduisant à la mort cellulaire (Kouassi et al. 2010). De plus, l'apoptose induite par les particules PM_{2.5}, contrairement aux PM₁₀, a été associée aux dommages à l'ADN, l'arrêt du cycle cellulaire et l'altération morphologique des mitochondries (Gualtieri et al. 2011). Les PM₁₀ quant à elles sont principalement éliminées par la clairance alvéolaire, néanmoins, elle peuvent induire des effets pro-inflammatoires, pouvant aussi conduire à l'apoptose des cellules (voir § I.4.1, Wegesser et al. 2008). Enfin, une étude récente, réalisée sur des mitochondrie isolées, a montrée que les PM₁₀ sont aussi capables d'altérer la chaîne respiratoire mitochondriale (Delgado-Buenrostro et al. 2013).

I.5.6) Effets cytoprotecteurs des PM et de leurs composants

Lors d'une exposition chronique à des polluants atmosphériques, l'acquisition de la résistance à l'apoptose pourrait être une étape importante des mécanismes moléculaires impliqués dans l'initiation et la promotion des tumeurs (voir § I.4.4). Malheureusement, trop peu d'études s'intéressent à ce phénomène de résistance à l'apoptose éventuellement induite par les polluants atmosphériques et aux mécanismes moléculaires sous-jacents.

Dans le but de comprendre les mécanismes conduisant aux cancers pulmonaires, induits par l'exposition aux fumées de cuisson, Hung et collaborateurs, ont montré que le 2,4-DDE (aldéhyde 2,4-décadiénal, le principal composant de ce type de pollution) est capable d'induire la survie et la prolifération de cellules alvéolaires (A549) via l'expression des IAP-1 et -2, de la Survivine, et de la Cyclin D1 conduisant à la diminution des niveaux de XIAP, Caspase-3, et p21 (Hung et al. 2007). Plusieurs études ont rapporté les effets cytoprotecteurs des PM et de leurs composés organiques ou leurs métabolites, tels que les HAP, la TCDD, les PCB, et les pDi. Les mécanismes exacts de l'inhibition de l'apoptose ne sont pas entièrement compris, mais des études *in vitro* ont démontré la nécessité de la synthèse des protéines, la régulation de p53, et l'activation du AhR (Ferecatu et al. 2010, **Annexe 1**). La nécessité de synthèse protéique et d'activation du AhR pourrait être liée à sa fonction de facteur de transcription qui pourrait induire ou inhiber l'expression des gènes anti- ou pro-apoptotiques. Ainsi, certaines études ont montré qu'AhR active l'expression des gènes anti-apoptotiques tels que *bcl-2*, *bcl-xL*, *mcl-1*, ou *vdac2* ; et peut interagir directement avec E2F1 conduisant à la réduction de l'expression des gènes pro-apoptotiques normalement induits par E2F1 tel que Apaf-1 (Andreau et al. 2012).

D'autres voies de signalisation de ont été identifiées comme impliquées dans la cytoprotection conférée par les particules atmosphérique, en particulier les protéines kinases (telles que Akt, ERK, JNK, PKA), ou le facteur de transcription Nrf2. Les voies PI3K/Akt et AhR semblent être interconnectées, puisque la présence d'AhR est nécessaire pour la fonction cytoprotectrice d'Akt. Ainsi, l'effet anti-apoptotique des pDi et de BPDE (un métabolite du BaP) semble lié à la phosphorylation et l'activation d'Akt. En outre, Akt favorise la phosphorylation et la liaison à la membrane mitochondriale externe de l'Hexokinase II (HK-II) menant à la stabilisation du complexe PTP en conformation fermée et l'inhibition de la sortie du Cyt *c* dans le cytosol. Enfin, l'activation de NF- κ B et AP-1 par l'exposition aux PM ou à la fumée de cigarette est bien documentée et reconnue comme faisant partie de la réponse inflammatoire et

proliférative, mais leur rôle dans la modulation de la mort cellulaire par apoptose reste mal connu.

I.5.6.ii) Rôle des composés métalliques des PM

Parmi tous les composés hydrosolubles des PM, un candidat probablement responsable de l'effet cytoprotecteur est le zinc (Zn) puisqu'il est déjà connu pour minimiser le stress oxydant (par exemple la peroxydation lipidique) et inhiber l'apoptose. En effet, Zn peut protéger les cellules directement en stabilisant les lipides et les protéines des membranes cellulaires et des organites ; ou indirectement en maintenant les niveaux de glutathion, en réduisant la fragmentation de l'ADN, en empêchant l'activation de la procaspase-3 et/ou en activant des voies de signalisations cytoprotectrices (dont Akt et ERK). En outre, certains métaux de transition divalents (Mg^{2+} , Sr^{2+} , Mn^{2+} , ...) peuvent inhiber de façon compétitive l'ouverture du PTP dépendante du calcium par un mécanisme encore inconnu, suggérant un possible effet de protection par les composés métalliques, directement au niveau des mitochondries.

I.5.6.iii) Rôle de la voie de signalisation Nrf2 et des enzymes anti-oxydantes

Les polluants atmosphériques sont également des inducteurs de Nrf2, qui régule l'expression des enzymes de phase II de détoxification et des anti-oxydants (voir § I.4.2vi). En effet, de nombreuses études ont signalé l'activation de Nrf2 après exposition aux PM et leurs composés (notamment les pDi, HAP et particules UF) dans des cellules épithéliales bronchiques humaines ou des macrophages de souris. Parmi les protéines cibles anti-apoptotiques de Nrf2, deux enzymes anti-oxydantes ont un intérêt particulier en raison de leur emplacement et de leur action sur les mitochondries: l'hème oxygénase 1 (HO-1) et la glutathion-S-transférase (GST) (voir § I.4.2.iii).

L'expression et l'activité de la HO-1 sont considérablement augmentées dans les mitochondries des cellules alvéolaires et épithéliales humaines exposées à la fumée de cigarette. Cette surexpression de la HO-1 inhibe la mort des cellules et maintient les taux d'ATP (*Morse et al. 2005*). Le mécanisme cytoprotecteur de la HO-1 est lié à ses produits de réaction enzymatiques tels que la biliverdine, le monoxyde de carbone (CO) et le fer ferreux (voir § I.4.2.iii). Ainsi, en réponse à la production de Fe^{2+} , la stabilité de la ferritine est augmentée et peut protéger les cellules contre l'oxydation et l'apoptose ; et le CO limite la translocation mitochondriale des protéines de la famille de Bcl-2 et la sortie du Cyt *c*. De plus, il a été démontré dans des mitochondries isolées que le CO protège du gonflement et de la dépolarisation des membranes mitochondriales associés à l'ouverture du PTP (*Queiroga et al. 2011*)

D'autre part, les GST sont impliquées dans la détoxification des métabolites endogènes toxiques, des radicaux superoxydes et des XB. Il a été démontré que les GST cytosoliques et mitochondriales (α , μ , π et θ) sont régulées positivement par de nombreux xénobiotiques et certains ligands du AhR (TCDD, β -naphthoflavone). Cependant les mécanismes d'action de la GST mitochondriale sont encore controversés : d'une part ces enzymes empêchent l'oxydation de la cardiolipine et la PMM, d'autre part, il a été démontré que la liaison de la GST mitochondriale à la membrane est activée par S-glutathionylation et contribue à la libération du Cyt *c* via l'ouverture du PTP.

Les ERO sont éventuellement impliqués dans la progression tumorale, les métastases, et plusieurs voies de signalisation induites par les xénobiotiques atmosphériques. La corrélation de l'oxydation intracellulaire due au BaP et ses dérivés (BaP-1,6-dione, BaP-3,6-dione, BaP-4,5-dihydrodiol et 2-hydroxy-BaP-1,6-dione) avec la protection contre l'apoptose induite par le retrait de sérum, a clairement suggéré qu'une certaine dose de ERO augmente la prolifération cellulaire et la survie (*Teranishi et al. 2010*). Dans les conditions physiologiques, la viabilité des cellules dépend essentiellement de la maintenance des systèmes anti-oxydants fonctionnels en particulier dans les cellules pulmonaires qui sont régulièrement exposées aux polluants atmosphériques.

Le GSH est l'un des anti-oxydants les plus abondants dans les fluides et les cellules épithéliales des voies respiratoires. Il a un rôle primordial dans la régulation de l'apoptose puisque la N-acétylcystéine (NAC, précurseur de GSH) empêche efficacement l'apoptose induite par des polluants de l'air, et que l'exposition *in vivo* à la dioxine augmente les niveaux de GSH mitochondrial dans des souris normales, CYP1A1 *-/-* et CYP1A2 *-/-*, mais pas dans les souris AhR *-/-*, démontrant aussi le rôle de la voie AhR (*Senft et al. 2002*).

I.6) OBJECTIFS DE L'ETUDE

Le but de cette thèse a été de comprendre le rôle des caractéristiques physico-chimiques des PM dans la modulation de l'apoptose des cellules épithéliales bronchiques humaines, contribuant ainsi à une meilleure compréhension des acteurs et mécanismes moléculaires impliqués dans la cancérogenèse et la cytotoxicité induite par la pollution atmosphérique.

Afin d'avoir une approche réaliste, nous avons utilisé des doses auxquelles un individu est susceptible d'être exposé dans des conditions normales de pollution pouvant être observées dans des mégacités comme Paris. Ainsi, les concentrations utilisées de 5 à 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, peuvent mimer une exposition de l'ordre de 3 à 30 jours à une pollution de 79 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (en PM_{2.5}), considérant que le dépôt de la masse de PM_{2.5} est 2,3 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/24\text{h}$ dans la région trachéo-bronchique, pour un individu légèrement asthmatique (Li, N. et al. 2003a). La concentration de référence de 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, pouvant mimer une exposition de l'ordre de 5 jours à cette pollution.

Le modèle cellulaire utilisé est la lignée 16HBE, c'est une lignée de cellules épithéliales bronchiques normales, provenant d'un enfant ayant subi une greffe, et immortalisées par l'antigène T du virus SV40. Ces cellules gardent en culture des caractéristiques épithéliales: elles sont adhérentes, elles possèdent des microvillosités ainsi que des jonctions gap et adhérentes fonctionnelles. De plus, l'endocytose des nanoparticules ainsi que l'activation du cytochrome P450 par les pDi et la réaction inflammatoire a été précédemment prouvée dans ces cellules (Bonvallot et al. 2001; Belade et al. 2012). Elles présentent l'avantage de pouvoir être cultivées pendant plusieurs semaines (par des passages successifs) et donc de pouvoir réaliser des expériences provenant d'une même décongélation afin de conserver au mieux les mêmes caractéristiques et réponses biologiques.

Deux grands axes de recherche ont été abordés :

1) Rôle de la composition physico-chimique des PM dans la modulation de l'apoptose

Cet axe de recherche peut être séparé en deux volets :

→ Etude du rôle de la taille des PM dans la modulation de l'apoptose

Pour cela nous avons utilisé des particules atmosphériques de différentes classes de tailles et de différentes sources, provenant de deux campagnes de prélèvements :

- Une réalisée en 2003 à Paris et Vitry-sur-Seine, qui a permis de collecter 4 lots de particules PM_{2.5}.
- Une réalisée en 2009 et 2010 à Paris et Ouagadougou (Burkina-Faso) dans le cadre du projet MEGATOX, qui a permis de collecter des particules de trois classes de tailles : grossières G (PM_{1,5-10 μm}), fines F (PM_{0,25-2,5 μm}), ultrafines UF (PM_{<0,25 μm}).

→ Identification des composés particulaires impliqués dans la résistance à l'apoptose

Après avoir identifié des particules induisant une résistance à l'apoptose, nous avons réalisé des tests de corrélation afin d'établir le lien possible entre les effets observés et la composition des PM. Nous avons ensuite étudié, en cytométrie en flux, l'effet des extraits organiques et aqueux de ces PM anti-apoptotiques, ainsi que, l'effet de différents métaux et HAP à la concentration contenue, soit dans les particules anti-apoptotiques, soit dans les particules non anti-apoptotiques.

2) Identification des mécanismes moléculaires impliqués dans la résistance à l'apoptose conférée par les particules

Dans un premier temps, nous avons démontré le rôle de l'activation de l'AhR par les HAP dans l'effet anti-apoptotique des particules. Dans un second temps nous nous sommes intéressés de plus près aux mécanismes moléculaires activés par les composés métalliques.

Nous nous sommes principalement focalisés sur la voie de signalisation anti-oxydante, mais nous avons également réalisé des expériences préliminaires afin de déterminer si d'autres voies seraient impliquées.

→ Etude de la voie de signalisation anti-oxydante

Sachant que les métaux sont de forts inducteurs de stress oxydant et que les ERO peuvent être des modulateurs de l'apoptose, nous nous sommes intéressés particulièrement à la réponse cellulaire anti-oxydante. En effet, basés sur ces connaissances et sur le modèle de la réponse hiérarchique au stress oxydant (*Li, N. et al. 2003a; Andreau et al. 2012*), nous avons fait l'hypothèse qu'une réponse anti-oxydante de faible intensité pourrait être impliquée dans le processus anti-apoptotique.

Pour cela, nous avons premièrement évalué la capacité oxydante intrinsèque des particules et des composés métalliques, en conditions abiotiques, en utilisant le test DTT. Nous avons étudié, par cytométrie en flux, l'effet de certains anti-oxydants sur l'inhibition de l'apoptose par les PM_{2.5} et nous avons effectué un dosage du Glutathion total (GSH+GSSG) avant et après traitement par les PM_{2.5}.

Enfin, nous nous sommes intéressés de plus près à la voie de signalisation Nrf2. En effet, Nrf2 est un facteur de transcription de nombreux gènes impliqués dans la réponse anti-oxydante et dans le métabolisme des xénobiotiques (*Rubio et al. 2010*). Après avoir mis en évidence la translocation nucléaire rapide de ce facteur de transcription, nous avons montré la surexpression de certains de ces gènes cibles (HO1, NQO1 et GPx1) par RT-qPCR après un traitement aux particules ou aux composés métalliques.

→ Etude de la prolifération des cellules en milieu gélifié

Sachant que la résistance à l'apoptose est un caractère précancéreux, nous avons regardé si les cellules exposées aux PM et à leurs composés acquièrent d'autres caractéristiques, telle que la prolifération sans adhésion. Pour cela, les cellules 16HBE ont été exposées à différents

composés particulaires avant d'être mis en culture en milieu DMEM gélifié par la nitrocellulose. Les cellules 16HBE étant adhérentes, elles ne peuvent pas pousser autrement que lorsqu'elles adhèrent à une matrice de fibronectine et collagène, sauf si des mutations leurs ont permis d'obtenir cette propriété.

→ Etude de la voie de signalisation calcique

Les particules anti-apoptotiques conduisent à une résistance à l'apoptose induite par certains inducteurs dont l'A23187. L'A23187 est un ionophore calcique qui induit l'apoptose en augmentant le taux calcium intracellulaire, nous avons donc regardé si les particules pouvaient empêcher cette augmentation de calcium, en lien avec leur effet anti-apoptotique. Pour cela nous avons utilisé un fluorochrome marquant spécifiquement le calcium intracellulaire et mesuré le flux calcique intracellulaire en cinétique, en présence et en absence de particules.

→ Etude des modifications du cytosquelette

Sachant que l'augmentation du Ca^{2+} intracellulaire peut induire des réarrangements du cytosquelette, en particulier le réseau d'actine (*Saneyoshi et al. 2012*), et que les évènements précoces de l'apoptose s'accompagnent d'une stabilisation du réseau de microtubules (*Aslan et al. 2009*), il nous a semblé intéressant d'initier des expériences sur l'effet des PM anti-apoptotiques sur l'organisation des microtubules et des filaments fins d'actine. Pour cela nous avons marqué en fluorescence l'actine et la tubuline après traitement par des inducteurs d'apoptose ou par des particules.

II. MATÉRIEL ET MÉTHODES

II.1) Mise en culture et traitement des cellules	64
II.1.1) Culture cellulaire.....	64
II.1.2) Traitements des cellules.....	64
II.2) Particules et composés métalliques	66
II.2.1) Les méthodes de prélèvement des PM	66
II.2.2) Particules de Paris 2003	67
II.2.3) Particules de Paris et Ouagadougou 2009	68
II.2.4) Composés métalliques.....	70
II.2.5) Extraits organiques et aqueux des PM-AW	70
II.3) Evaluation de la cytotoxicité des particules par cytométrie en flux.....	71
II.4) Etude de la voie de signalisation anti-oxydante	73
II.4.1) Mesure de la production d'espèces réactives de l'oxygène par les PM: test DTT.....	73
II.4.2) Etude de l'effet des anti-oxydants par cytométrie en flux.....	73
II.4.3) Dosage du Glutathion.....	74
II.4.4) Quantification des ARN messagers par PCR quantitative en temps réel (rt- qPCR)	74
II.4.5) Immunomarquage de Nrf2.....	76
II.5) Etude de la voie de signalisation calcique.....	77
II.5.1) Mesure du calcium intracellulaire par FlexStation.....	77
II.5.2) Mesure du calcium intracellulaire par cytométrie en flux.....	78
II.6) Etude des altérations morphologiques	78
II.6.1) Observation de l'actine en Microscopie électronique à fluorescence.....	78
II.6.2) Microscopie électronique à balayage (MEB)	78
II.6.3) Culture des cellules en milieu gélifié (METHOCEL™)	79
II.7) Analyse statistique.....	79

II.1) MISE EN CULTURE ET TRAITEMENT DES CELLULES

II.1.1) Culture cellulaire

Le modèle cellulaire utilisé a été la lignée de cellules épithéliales bronchiques humaines 16HBE14o-, fournie par le Dr Gruenert (Colchester, Vermont University), et nommée par la suite 16HBE. Ces cellules proviennent d'un garçon d'un an ayant subi une greffe cœur-poumon, elles ont été immortalisées par transfection avec l'antigène T du virus SV40. Les cellules 16HBE n'ont pas d'inhibition de contact, ne produisent pas de cils en culture mais gardent des marqueurs épithéliaux tels que la présence de microvillosités, de jonctions gap fonctionnelles et de jonctions adhérentes (desmosomes et hémidesmosomes, avec des intégrines et des E-cadhérines). L'endocytose des nanoparticules par ces cellules épithéliales a déjà été prouvée (*Belade et al. 2012*). Par ailleurs l'activation du cytochrome P450 a été observée sur ce même modèle par des particules Diesel, cette activation induisant une réaction inflammatoire (*Bonvallot et al. 2001*).

Les 16HBE sont des cellules adhérentes et afin de mimer au mieux leur environnement naturel elles ont été cultivées sur une matrice, contenant 2.9% de collagène type I bovin (Purecol Natucan 0,5 mg/cm², DB Laboratories®), 1% de fibronectine humaine (1mg/ml, Sigma®) et 10% de sérum albumine bovin (BSA, Sigma) dilués dans du milieu LHC (Gibco®). Le milieu de culture utilisé est le DMEM/F12 (Life Technologies, Gibco®) supplémenté avec 2% d'Ultrosor G (UG, substitut de sérum, Biosepta), 1% de GlutaMAX™ (Glx, Gibco®), 1% de Pénicilline-Streptozotocine (PS, Gibco®) et 0,5% de Fongizone (FZ, Sigma-Aldrich®). Les cellules sont cultivées à 37°C en présence de 5% de CO₂ sous atmosphère humide et le milieu est changé tous les 2 à 3 jours. La confluence est maintenue à une densité inférieure à 60 000 cellules/cm² par un entretien une fois par semaine. Pour cela, les cellules sont rincées au PBS 1X (Phosphate Buffered Saline, Gibco®) puis décollées avec de la trypsine-EDTA (0,05%, Gibco®) pendant 3 à 5 min à 37°C. L'activité enzymatique de la trypsine est inhibée par l'ajout de 10% de SVF (Sérum Veau Foetal, Gibco®). Elles sont ensuite centrifugées 4 min à 12 000 rpm, et le culot de cellules est repris dans du milieu complet. Le nombre de cellules vivantes est déterminé par comptage sur une cellule de Mallassez, en présence de bleu Trypan qui discrimine les cellules mortes.

II.1.2) Traitements des cellules

Les traitements réalisés sont résumés dans les **tableaux II.1 et II.2**.

Pour l'étude de l'apoptose et de la cytotoxicité, les cellules 16HBE à une confluence de 60 à 70%, sont exposées 24 heures aux différentes PM ou aux métaux dans du milieu DMEM/F12 complet dépourvu d'UG et de sérum, afin d'éviter l'agrégation des PM sur le sérum ou l'UG. Avant chaque traitement, les particules sont soniquées 3 fois 20 secondes (70 W) puis vortexées afin d'éviter au maximum leur agrégation entre elles.

Pour l'étude de l'effet anti-apoptotique l'exposition aux PM se fait par un prétraitement de 4 heures (à la concentration de 10 µg/cm²) avant l'ajout de l'inducteur d'apoptose pendant 20 h supplémentaires (soit une exposition de 24 h aux particules au total). De la même façon, afin d'étudier le rôle des composés métalliques, un prétraitement a été réalisé avec des métaux

aux concentrations trouvées dans 10 µg/cm² de PM, avec ou sans chélateurs de métaux, puis l'apoptose est induite par l'ajout d'A23187 pendant 20 h supplémentaires.

Pour l'étude de la signalisation anti-oxydante, des anti-oxydants ont été ajoutés au même moment que le traitement par les particules ou les métaux.

Tableau II.1: Traitements des cellules 16HBE.

PM ou métaux	Anti-oxydants	Chélateur	Inducteur d'apoptose	Mesure	ETUDES
+/-	-	-	-	Mesure	▪ Etude de la cytotoxicité: Cytométrie en flux
+/-	-	-	+/-	Mesure	▪ Etude de l'effet anti-apoptotique: Cytométrie en flux
+/-	-	+/-	+/-		Cytométrie en flux
+/-	+/-	-	+/-	Mesure	▪ Etude de la signalisation anti-oxydante: Cytométrie en flux
+/-	-	-	Mesure		} Dosage du glutathion
+/-	-	-	+/-	Mesure	
+/-	Mesures →				} Quantification des ARNm par RT-qPCR (traitements à différents temps)
+/-	-	-	+/-	Mesures →	
+/-	-	-	Mesure		Immunofluorescence Nrf2
+/-	-	-	+/-	Mesure	▪ Etude de la signalisation calcique: FlexStation: fluorescence en cinétique
+/-	-	-	Mesure		▪ Etude de l'interaction PM/membrane cellulaire: Microscopie Electronique à Balayage Microscopie à fluorescence (actine et tubuline)
+/-	-	-	-		▪ Etude de la prolifération en milieu semi-liquide METHOCEL™

Tableau II.2: Protocole et modes d'actions des traitements.

Composé	Mode d'action	Traitement	Concentration
Inducteurs d'apoptose			
A23187 (ou Calcimycine)	<ul style="list-style-type: none"> • Ionophore calcique : Induit l'entrée de Ca²⁺ dans la cellule ^[1] • Découple les phosphorylations oxydatives ^[1] • Inhibe l'ATPase mitochondriale ^[1] 	4h après les PM ou métaux, ou sur des cellules non traitées aux PM, pour 20h maximum.	3 µM
Peroxyde d'hydrogène (H₂O₂)	<ul style="list-style-type: none"> • Induit un stress oxydant 		10 µM à 1 mM
Staurosporine (STS)	<ul style="list-style-type: none"> • Inhibiteur des protéines kinases Ca²⁺ dépendantes (PKC) ^[2] 		1 µM
Ionomycine (Iono)	<ul style="list-style-type: none"> • Ionophore calcique : Induit l'entrée de Ca²⁺ dans la cellule ^[3] 		1 µM
Anti-oxydants			
MnTBAP	<ul style="list-style-type: none"> • Bloque le peroxy-nitrite (ONOO⁻) et l'anion superoxyde (O₂^{•-}) ^[4] • Mime la SOD 	En même temps que les PM ou métaux.	100 µM
Catalase	<ul style="list-style-type: none"> • Peroxydase : Catalyse la transformation du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) en eau et oxygène (2H₂O + O₂) ^[5] 		1 000 U/ml
Glutathion réduit (GSH)	<ul style="list-style-type: none"> • Catalyse la transformation de nombreuses espèces réactives de l'oxygène (ERO) parmi lesquelles H₂O₂ et ONOO⁻ 		1 à 10 mM
Glutathion oxydé (GSSG)	<ul style="list-style-type: none"> • Forme du GSH grâce à la Glutathion Réductase 		10 mM
D-Mannitol	<ul style="list-style-type: none"> • Augmente la synthèse des systèmes anti-oxydants enzymatiques et non-enzymatiques ^[6] 		50 mM
Chélateur			
Déféroxamine (DFO)	<ul style="list-style-type: none"> • Chélateur du Fer 	En même temps que les PM ou métaux.	200 µM

^[1] d'après *Reed et al. 1972*, ^[2] d'après *Okazaki et al. 1988*, ^[3] d'après *Liu, C. et al. 1978*, ^[4] d'après *Batinic-Haberle et al. 2009*, ^[5] d'après *Laser 1955*, ^[6] d'après *Teke et al. 2011*, ^[7] d'après *Teke et al. 2011*.

II.2) PARTICULES ET COMPOSES METALLIQUES

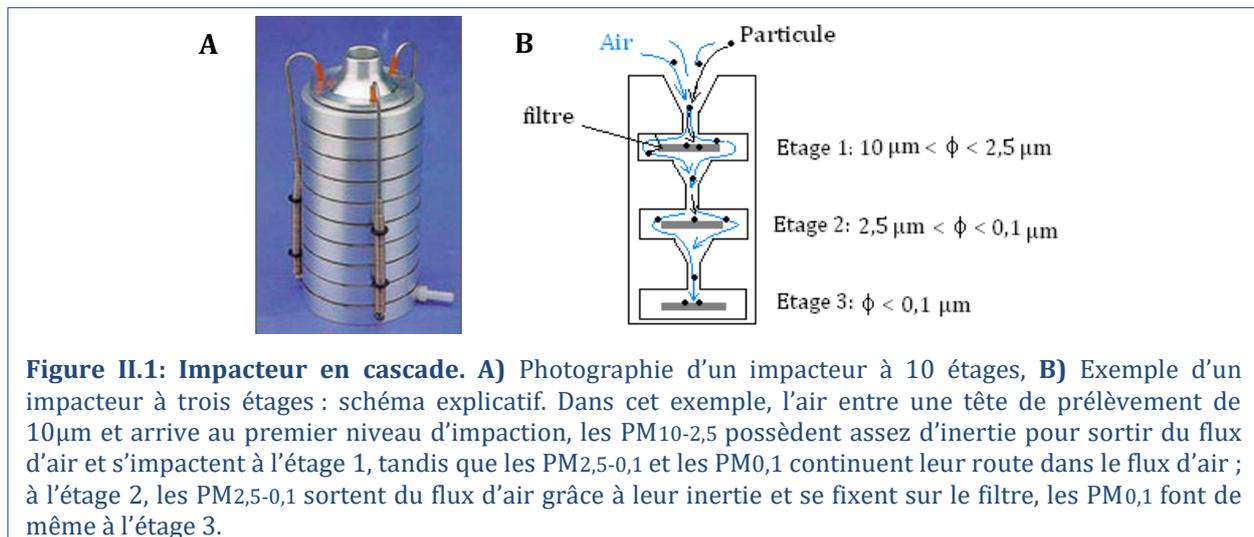
II.2.1) Les méthodes de prélèvement des PM

Les particules en suspension dans l'air sont récupérées grâce à des **préleveurs à filtration ou à impaction** qui séparent les particules en fonction de leur taille. L'air est aspiré grâce à une pompe, à travers une tête de prélèvement placée à l'entrée du préleveur et qui permet d'exclure (avec un rendement de 50%) les particules dont le diamètre aérodynamique est supérieur à une valeur définie, c'est le seuil de coupure granulométrique, les plus répandues sont les têtes de 2,5 µm et de 10 µm.

Les préleveurs à filtration permettent de collecter une fraction représentative de la quantité particulaire de l'air. Les particules sont aspirées dans l'appareil et se déposent sur un filtre (en téflon, quartz, polycarbonate...) de densité ou porosité connue. Associé à une tête de

prélèvement ce type de préleveur permet de récupérer les particules d'une fraction granulométrique donnée (PM_{2.5} ou PM₁₀).

Les préleveurs à impaction, ou impacteurs en cascade, permettent de collecter et de séparer les particules en fonction de leur taille. Le principe repose sur une succession d'étages d'impaction possédant chacun une tuyère qui projette perpendiculairement le jet d'air aspiré sur une surface plane. Sur la surface est posé un filtre où vont s'impacter les particules qui possèdent une inertie suffisante pour se dégager du flux d'air. L'inertie étant fonction de la masse du corps, les particules plus fines, ayant moins d'inertie, sont entraînées par le flux d'air, contournent la surface d'impaction, et parviennent jusqu'à l'étage suivant (**Figure II.1**). Ainsi, les particules sont séparées en fonction de leur granulométrie par les différents étages d'impaction (*Quisefit et al. 1998*). De plus, suivant la taille (et donc la masse) des particules à prélever on utilise des impacteurs à haut (de 30 à 60 m³/h) ou bas débit (environ 1m³/h).



Les particules atmosphériques étudiées pendant ma thèse proviennent de deux campagnes de prélèvements :

- Une réalisée en 2003 à Paris et Vitry-sur-Seine, qui a permis de collecter 4 lots de particules PM_{2.5} (PM-AW, PM-AS, PM-VW, PM-VS).
- Une réalisée en 2009 et 2010 à Paris et Ouagadougou (Burkina-Faso) dans le cadre du projet MEGATOX, qui a permis de collecter des particules de trois classes de tailles : grossières G (PM_{1,5-10µm}), fines F (PM_{0,25-2,5µm}), ultrafines UF (PM_{<0,25µm}).

Les descriptions des PM prélevées sont résumées dans le **tableau II.3**.

II.2.2) Particules de Paris 2003

Les PM_{2.5} de 2003 proviennent d'une campagne de prélèvement effectuée en **région parisienne en 2003**. Les deux lieux de prélèvements ont été sélectionnés pour leurs types de pollution :

- Des particules correspondant à la pollution liée au **trafic routier** ont été prélevées à proximité du périphérique parisien proche de la Porte d'Auteuil en été et en hiver 2003 et sont ainsi nommées :
PM-AW pour « *PM Auteuil Winter* »
PM-AS pour « *PM Auteuil Summer* »
- Des particules correspondant à la pollution urbaine de fond ont été prélevées à Vitry-sur-Seine en région parisienne, en été et en hiver 2003 et sont ainsi nommées :
PM-VW pour « *PM Vitry Winter* »
PM-VS pour « *PM Vitry Summer* »

Les particules de 2003 ont été collectées sur des filtres de nitrocellulose de 150 mm de diamètre (HAWP, Millipore, Saint-Quentin-en-Yvelines, France) avec un préleveur à impaction haut débit (DA-80 Digitel, Suisse, flux: 30 m³/h). Elles ont ensuite été détachées des filtres par sonication dans de l'eau distillée puis lyophilisée et conservées à -20°C (*Baulig et al. 2004*). Pour les expériences, les particules sont resuspendues dans du milieu DMEM/F12 supplémenté avec 1% de Glx, 1% de PS et 0,5% de FZ, à une concentration de 2 mg/ml et conservées à -20°C.

[II.2.3\) Particules de Paris et Ouagadougou 2009](#)

Ces particules proviennent de deux campagnes de prélèvement effectuées à **Paris et Ouagadougou (Burkina Faso) en 2009 et 2010**. Les prélèvements ont été réalisés sur le toit-terrasse de bâtiments situés à proximité du centre-ville

Les particules atmosphériques parisiennes ont été collectées en **région parisienne** sur deux sites différents à deux périodes distinctes :

- des particules correspondant à la pollution liée à la biomasse et au chauffage au bois, prélevées sur le Site Instrumental de Recherche par Télédétection Atmosphérique (SIRTA) à Massy Palaiseau situé à environ 15 km au sud de Paris, en période hivernale et nommées :
WB1 et **WB3** pour « *Wood Burning* »
- des particules correspondant au trafic parisien collectées sur le toit du Laboratoire d'Hygiène de la Ville de Paris (LHVP) dans le XIIIème arrondissement. Les prélèvements ont eu lieu durant des heures de trafic intense, en période estivale afin d'exclure tout risque de contribution des PM issues du chauffage au bois. Les échantillons sont nommés :
TR5, **TR6** et **TR7** avec TR pour « *Trafic* ».

Les particules atmosphériques de Ouagadougou ont été collectées dans une zone résidentielle sur le toit du bâtiment de météorologie nationale à 4 km au nord-est du centre-ville :

- des particules ayant comme sources identifiées les feux de cuisson et de brûlage des ordures ainsi que le trafic lié principalement aux mobylettes ont été prélevées, soit le soir (**OB3**, nommées OB pour « Ouagadougou Biomasse »), soit le matin (**OB4**).

- des prélèvements ciblant les particules modifiées par photochimie ont aussi été réalisées en pleine journée et sont nommées **OP5** et **OP6** pour « Ouagadougou Photochimie ».

La collecte des PM a été réalisée avec deux impacteurs différents, chacun dédié à la collecte de fractions granulométriques spécifiques :

- L'impacteur High Volume Sierra-Andersen® a permis de récupérer les particules grossières (PM_{1,5-10}µm) sur des filtres Nuclepore® de 0,2 µm de porosité. Les 3 premiers étages de l'impacteur ont été utilisés pour reconstituer la fraction grossière (étage 1 : 10-7,2 µm, étage 2 : 7,2-3 µm, étage 3 : 3-1,5 µm).
- L'impacteur High Volume Particle Sampler (HVPS) a été utilisé pour récupérer :
 - o les PM F (PM_{0,25-2,5}µm) par impaction sur des filtres Nuclepore® de 0,2 µm de porosité.
 - o les particules UF (PM_{<0,25}µm) par filtration sur un filtre Nuclepore® porosité de 5 µm.

Les particules ont été détachées des filtres par sonication dans du milieu DMEM/F12 supplémenté avec 1% de Glx, 1% de PS et 0,5% de FZ, et conservées à une concentration de 1 mg/ml, à -20°C. Avant le traitement des cellules, les particules sont décongelées, soniquées 3 fois 20 secondes à 70W (sonicateur Vibracel, Bioblock Scientific®) et vortexées afin d'éviter au maximum leur agrégation.

Les descriptions des PM prélevées sont résumées dans le **tableau II.3**.

Tableau II.3: Prélèvements des particules atmosphériques.

PM	Dates de prélèvements	Lieux	Heures	Sources identifiées
PM-AW	20/01 au 18/02/2003	Paris (porte d'Auteuil)	ND	– Trafic automobile
PM-AS	24/07 au 20/08/2003			
PM-VW	25/02 au 31/03/2003	Vitry-sur-Seine (banlieue parisienne)		– Pollution de fond urbain
PM-VS	18/06 au 23/07/2003			
WB1	4 au 18/02/2010	Palaiseau - SIRT (banlieue parisienne)	21h - 3h	– Pollution de fond urbain – Trafic automobiles – Biomasse (Chauffage au bois)
WB3	4 au 17/03/2010			
TR5	30/06 au 12/07/2010	Paris (toit du LHVP)	6h - 10h et 17h - 19h	– Pollution de fond urbain – Trafic automobile
TR6	12 - 29/07/2010			
TR7	25/08 au 20/09/2010			
OB3	19 au 20/11/2009	Centre-ville de Ouagadougou (Burkina-Faso)	17h - 22h	– Biomasse (Cuisson au bois) – Trafic mobyettes
OB4	24 au 26/11/2009		6h - 9h	– Biomasse (Cuisson au bois et brûlage d'ordures) – Trafic mobyettes
OP5	27 au 30/11/2009		10h - 16h	– Particules modifiées par la photochimie
OP6	1 au 2/12/2009		10h - 16h	

ND : pas de données. SIRT : Site Instrumental de Recherche par Télédétection Atmosphérique (. LVHP : Laboratoire d'Hygiène de la Ville de Paris (Paris 13°).

II.2.4) Composés métalliques

L'étude des composés métalliques a été réalisée en exposant les cellules 16HBE à différents métaux dilués à 10 mg/ml dans l'eau distillée :

- quatre métaux de transition :
 - ✓ le cuivre Cu(II) sous forme de chlorure de cuivre CuCl_2 ou de cuivre sulfate CuSO_4
 - ✓ le fer Fe(II) sous forme de sel de Morh $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ et Fe(III) sous forme de chlorure de fer FeCl_3
 - ✓ le manganèse Mn(II) sous forme de chlorure de manganèse MnCl_2
 - ✓ le zinc Zn(II) sous forme de chlorure de zinc ZnCl_2
- un métal post-transition : l'aluminium Al(III) sous forme de chlorure d'aluminium AlCl_3
- deux métaux alcalino-terreux (Ca et Mg),
 - ✓ le calcium Ca(II) sous forme de chlorure de calcium CaCl_2
 - ✓ le magnésium Mg(II) sous forme chlorure de magnésium MgCl_2
- et un métal lourd : le plomb Pb(II) sous forme chlorure de plomb PbCl_2

Pour l'exposition des cellules, ces métaux sont dilués dans du milieu complet sans UG aux concentrations retrouvées dans $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de PM2.5 (**Tableau II.4**) :

Tableau II.4: Composés métalliques des PM de 2003 et doses utilisés dans les expériences.

Métaux	Total	Cu	Fe	Mn	Zn	Al	Ca	Mg	Pb
PM-AW (mg/g) ^a	67.36	0.86	13.20	0.16	1.50	3.40	19.50	1.60	0.25
Dose utilisée dans les expériences (ng/ml) ^b		43	660	8	75	170	975	80	12.5
PM-AS (mg/g) ^c	106.68	1.23	26.3	0.37	1.7	10.5	36.2	3.6	0.42
Dose utilisée dans les expériences (ng/ml) ^b		61.5	1315	ND	85	525	ND	ND	ND
PM-VW (mg/g) ^d	120.29	0.37	13.5	0.42	1.3	10.4	59.6	4.3	0.52
Dose utilisée dans les expériences (ng/ml) ^b		18.5	675	ND	65	520	ND	ND	ND
PM-VS (mg/g) ^a	193.26	0.40	21.6	0.54	1.30	20.40	110.6	6.7	0.43
Dose utilisée dans les expériences (ng/ml) ^b		20	1080	27	65	1020	5530	335	21.5

^a D'après *Baulig et al. 2004*, ^b équivalent à $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ou $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ de PM, ^c D'après *Rumelhard et al. 2007a*,

^d D'après *Rumelhard et al. 2007b*, ND: pas de données.

II.2.5) Extraits organique et aqueux des PM-AW

• Extrait organique

L'extrait organique des PM-AW (Oex) a été obtenu après extraction par du dichlorométhane, puis séchage et dissolution dans du diméthylsulfoxyde (DMSO, Sigma®). L'Oex a été utilisé à la concentration mesurée sur les particules d'après la fraction organique soluble (SOF) déterminée pour les PM-AW (10%) (*Ferecatu et al. 2010*).

- **Extrait aqueux et particules lavées**

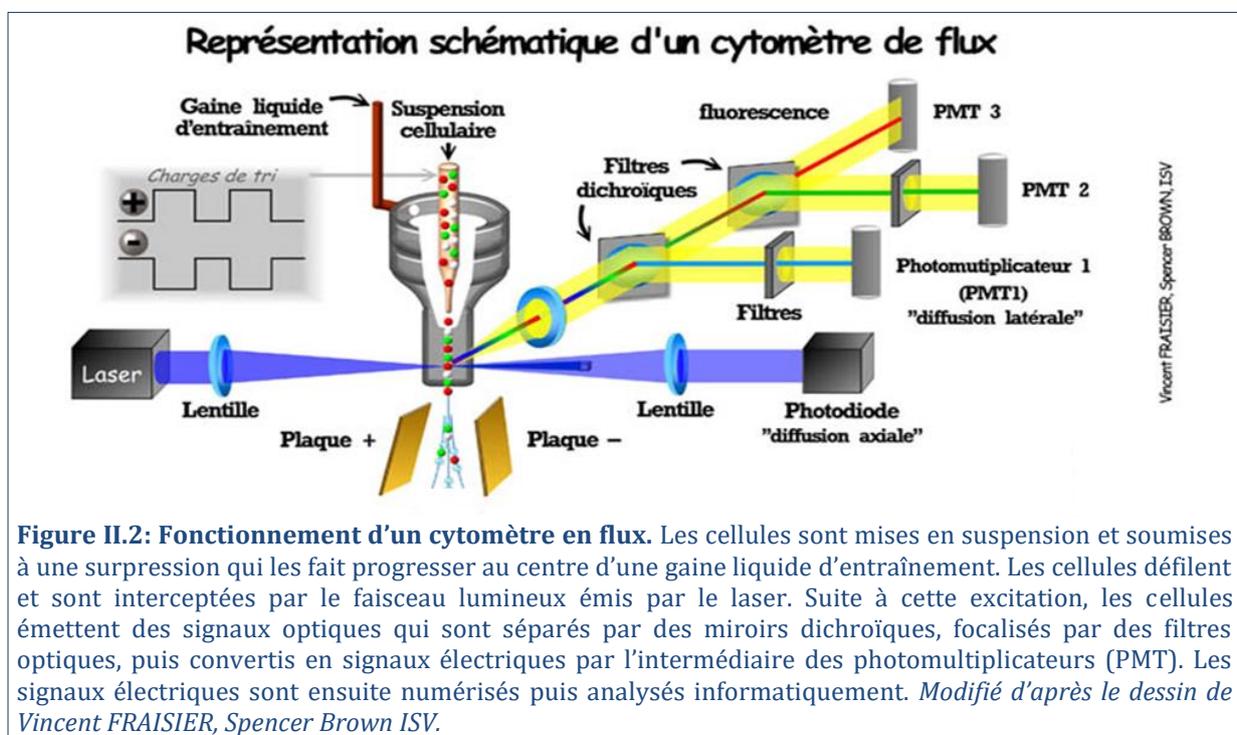
L'extrait aqueux (Aex) des PM-AW a été obtenu par une première centrifugation à 10 000 g d'une solution de particules à 2 mg/ml, suivie d'une centrifugation du surnageant puis d'une filtration du nouveau surnageant sur un filtre de 0,22 µm (filtre Durapore® de polyvinylidène difluorure, Millex® GV, Carrigtohill, Cork, Irlande). Le volume d'Aex utilisé pour le traitement des cellules est le même que le volume de suspension de particules initial (à 2 mg/ml) utilisé pour le traitement à 10 µg/cm².

Les particules centrifugées correspondent aux PM lavées et contiennent donc peu de composés aqueux (Ferecatu et al. 2010).

II.3) ÉVALUATION DE LA CYTOTOXICITÉ DES PARTICULES PAR CYTOMETRIE EN FLUX

- **Principe**

La mort cellulaire a été évaluée par cytométrie en flux (grâce au cytomètre analyseur CyAn ADP LX, de la Plateforme ImagoSeine de l'Institut Jacques Monod, et au cytomètre analyseur/trieur BD FACSAria II, de la Plateforme de l'unité de Biologie Fonctionnelle et Adaptative). Brièvement, le cytomètre en flux permet la quantification et la qualification individuelle de cellules en fonction de leur taille (la lumière diffusée aux petits angles), de leur granulosité (la lumière diffusée perpendiculairement) et de leur fluorescence (liée aux fluorochromes utilisés) en réponse à une stimulation lumineuse par un laser (Figure II.2).



- **Méthode**

Après traitement, le surnageant de culture (contenant les cellules détachées) ainsi que les cellules adhérentes (détachées par la trypsine-EDTA) ont été récupérés dans les tubes à

cytométrie qui ont été centrifugés 5 min à 1 200 rpm, à température ambiante. Les surnageants sont éliminés par retournement, puis les culots cellulaires sont repris dans 500 µl de milieu de culture contenant les différents fluorochromes. Afin de discriminer les cellules en apoptose des cellules vivantes, nous avons mesuré différents paramètres par des doubles marquages fluorescents (rouge et vert) (**Tableau II.5**):

- La **diminution de la taille** et l'**augmentation de granulosité** ont été mesurées par diffusion de la lumière.
- La **chute du potentiel transmembranaire mitochondrial** ($\Delta\Psi_m$), a été mesurée grâce au fluorochrome DiOC₆(3) (DiOC, Invitrogen) qui s'accumule dans la matrice mitochondriale et émet une fluorescence verte dont l'intensité est directement proportionnelle au $\Delta\Psi_m$ (la faible fluorescence est notée DiOC-).
- L'**exposition des phosphatidylsérines** membranaire à la surface cellulaire (conséquence de la déstructure des membranes et du « flip flop » de l'apoptose) a été mise en évidence par un marquage à l'Annexine V-FITC (AnnV, Sigma) qui interagit avec les phosphatidylsérines et fluoresce en vert (notée AnnV+).
- La **perméabilisation de la membrane plasmique** a été discriminée avec l'iodure de propidium (IP, Sigma), un agent intercalant de l'ADN qui fluoresce en rouge et pénètre dans les cellules uniquement si la membrane plasmique est perméabilisée (notée IP+).
- La **production de stress oxydant** a été quantifiée par l'hydroéthidine (HE, Sigma) qui, en présence d'anion superoxyde O₂^{•-} est oxydé en éthidium qui migre ensuite dans le noyau où il s'intercale entre les bases ADN et fluoresce en rouge (noté HE+).

Tableau II.5: Mesure de l'apoptose par cytométrie en flux.

Caractéristique	Méthode de détection	λ excitation	λ émission
Diminution de la taille	Absorption de la lumière aux petits angles (0°)		
Augmentation de la granulosité	Diffusion de la lumière aux grands angles (90°)		
Perméabilisation de la membrane plasmique	Fluorescence de l'iodure de propidium (IP+, 10 µg/ml)	488 nm	620 nm
Chute du $\Delta\Psi_m$	Fluorescence du DiOC ₆ (3) (DiOC-, 2 nM final)	488 nm	520 nm
Stress oxydant (O₂^{•-})	Fluorescence de l'hydroéthidine (HE+, 2 µM final)	488 nm	620 nm
Exposition des phosphatidylsérines	Fluorescence de l'AnnV-FITC (AnnV+, 2 µg/ml final)	488 nm	520 nm

L'analyse par cytométrie en flux est réalisée sur 10 000 cellules après une incubation d'environ 15 min à 37°C et les résultats sont exprimés en pourcentage de cellules en apoptose (DiOC- et HE+ ou DiOC- et IP+), en pourcentage d'apoptose spécifique (AS) induite par le traitement, ou en pourcentage d'inhibition d'apoptose spécifique selon les formules :

$$\% \text{ AS} = 100 \times (\% \text{ traitement} - \% \text{ témoin}) / (100 - \% \text{ témoin})$$

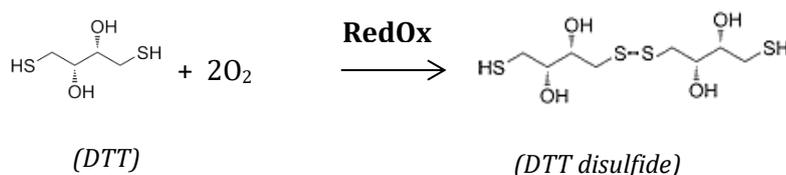
$$\% \text{ Inhibition AS} = 100 - ((100 \times \% \text{ AS traitement}) / \% \text{ AS induite par A23187})$$

II.4) ÉTUDE DE LA VOIE DE SIGNALISATION ANTI-OXYDANTE

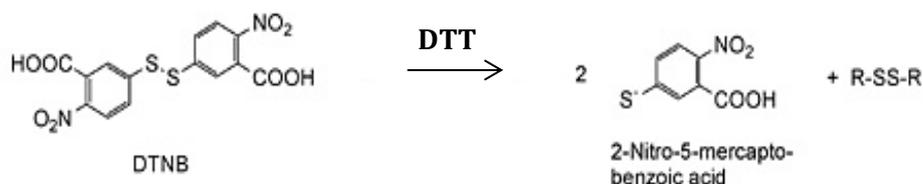
II.4.1) Mesure de la production d'espèces réactives de l'oxygène par les PM: test DTT

- **Principe**

La production inhérente d'espèces réactives de l'oxygène par les particules et les métaux a été mesurée par un test DTT. Le test DTT est un test colorimétrique, basé sur la capacité des composés redox-actif à transférer des électrons à partir du dithiothréitol non oxydé (DTT) à l'oxygène et produire de l'anion superoxyde et du DTT disulfure :



Le thiol restant est ensuite mis à réagir avec le DTNB, générant le disulfure mixte et de l'acide 5-mercapto-2-nitrobenzoïque qui est mesuré par son absorption à 405nm.



- **Méthode**

Les échantillons de particules ou de métaux ont été incubés 30 min à 37 ° C avec 200 μM de DTT (Euromedex) dans des plaques 96 puits. Après incubation, les plaques ont été centrifugées à 3000 g (15 min, 4°C) et le DTT non oxydé restant a été mesuré par sa réaction avec 2,5 mM de DTNB (acide 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoïque), Euromedex), formant l'acide-5-mercaptobenzoïque 2-nitro (TNB) qui a été quantifié en mesurant l'absorbance à 405 nm avec un lecteur de plaque.

Le milieu utilisé pour l'expérience est du DMEM/F12 sans rouge de phénol, pour éviter les interférences entre les colorations, et dont l'oxygène a été éliminé en utilisant une pompe à vide, afin de limiter l'oxydation spontanée au DTT. Toutes les mesures ont été effectuées à une exposition lumineuse réduite. Le taux d'activité d'oxydation du DTT a été calculé en utilisant une régression linéaire de la dose de DTT oxydé en fonction de la dose de PM ou de métaux, sur la base de la moyenne de 5 expériences distinctes.

II.4.2) Etude de l'effet des anti-oxydants par cytométrie en flux

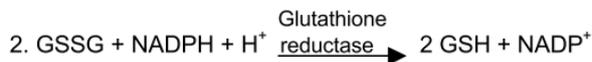
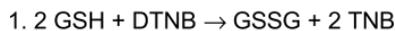
L'effet des anti-oxydants sur la modulation de l'apoptose par les particules et les métaux a été mesuré par cytométrie en flux. Les cellules ont été exposées à des anti-oxydants en même

temps que les particules (10 µg/cm²) ou les métaux (équivalent à 10 µg/cm² de PM) pendant 4 h avant l'ajout de l'inducteur d'apoptose pendant 20 h supplémentaires (**Tableaux II.1 et II.2**) et l'apoptose a été mesurée par cytométrie en flux avec le DiOC et l'HE (voir § II.3.2 et **Tableau II.5**).

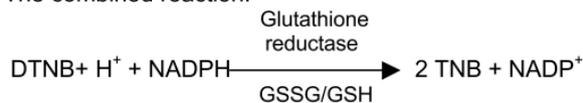
II.4.3) Dosage du Glutathion

- **Principe**

Afin d'étudier la réponse anti-oxydante des cellules suite aux traitements par les particules ou les métaux, le glutathion total (GSH et GSSG) a été dosé par un kit d'analyse de glutathion (Sigma®), suivant les recommandations du fabricant. Le glutathion est mesuré par sa réaction avec le DTNB, produisant du TNB. Le GSSG ainsi formé est recyclé par la glutathion réductase et du NADPH.



The combined reaction:



- **Méthode**

Brièvement, après exposition des cellules aux PM (10 µg/cm²) ou leurs composés métalliques (équivalent à 10 µg/cm² de PM) pendant 4 heures, les cellules ont été recueillies et remises en suspension dans du PBS 1X. Après centrifugation, le culot a été suspendu dans 5% d'acide 5-sulfosalicyclique et le lysat cellulaire a été obtenu par congélation/décongélation successives. Après une centrifugation à 10 000 g, le glutathion se trouve dans le surnageant qui est dosé.

Le H₂O₂ (1 mM) a été utilisé comme contrôle positif connu pour induire l'oxydation du GSH. En parallèle, le comptage des cellules en bleu Trypan a permis d'exprimer les résultats pour 10⁶ cellules.

II.4.4) Quantification des ARN messagers par PCR quantitative en temps réel (RT-qPCR)

- **Principe**

La RT-qPCR est basée sur la technique de PCR classique. Elle correspond à une amplification d'un fragment spécifique d'ADN, délimité par deux amorces spécifiques (sens et anti-sens). Les amorces s'hybrident à la séquence cible en présence d'un excès de nucléotides et d'une Taq polymérase (ADN polymérase thermostable) synthétisant le brin complémentaire. La mesure et la visualisation de l'amplification se font en temps réel.

Premièrement, les ARN de l'échantillon sont extraits grâce au TriReagent™, puis reverse-transcrit (RT) en ADN complémentaires (ADNc) grâce à une Reverse Transcriptase. La PCR

quantitative est alors réalisée sur les ADNc avec des amorces s'hybridant de façon spécifique sur une partie du gène étudié, en présence d'un agent intercalant fluorescent : le SYBR green. La fluorescence du SYBR green augmente lorsqu'il est lié à l'ADN double brin et est proportionnelle au nombre de transcrits cibles présents au début de la réaction.

- **Méthode**

Après traitement des cellules par les particules ou les métaux, l'ARN total des cellules a été extrait en utilisant du TriReagent™ selon les instructions du fabricant. La concentration en ARN et la qualité de l'extraction ont été évaluées en mesurant l'absorbance à 260 nm et 280 nm en utilisant un Nanodrop (ND- 2000, Thermo Scientific®). La reverse transcription de l'ARN en ADN complémentaire a été réalisée à l'aide du kit M-MLV reverse transcriptase (Promega®, Charbonnières, France), selon le protocole donné par le fournisseur. Brièvement, 2 µg de l'ARN total a été mis en présence de 500 U de M-MLV reverse-transcriptase, 20 pg/ml d'amorces oligo-dT (Roche Applied Sciences, Meylan, France), et 500 µM de nucléotides (dNTP, Roche Applied Sciences, Meylan, France), pendant 30 minutes à 42°C, les produits de RT (les ADNc) sont ensuite conservés à -20°C.

Les ADNc ont été amplifiés par PCR quantitative en temps réel à haut débit dans un appareil Light Cycler 480 (Roche®), avec le kit Master Mix Light Cycler 480SYBR Green I (Roche®), selon les recommandations du fournisseur. Pour chaque échantillon, l'ADNc a été mis en présence 0,5 µM d'amorces sens et anti-sens (**Tableau II.6**), dilués dans 1X de Master Mix Light Cycler 480SYBR Green I, contenant l'ADN polymérase (FastStart Taq DNA Polymerase) et l'agent fluorescent SYBR Green I, et ont été amplifiés.

Tableau II.6: Séquence des amorces utilisées pour la RT-qPCR.

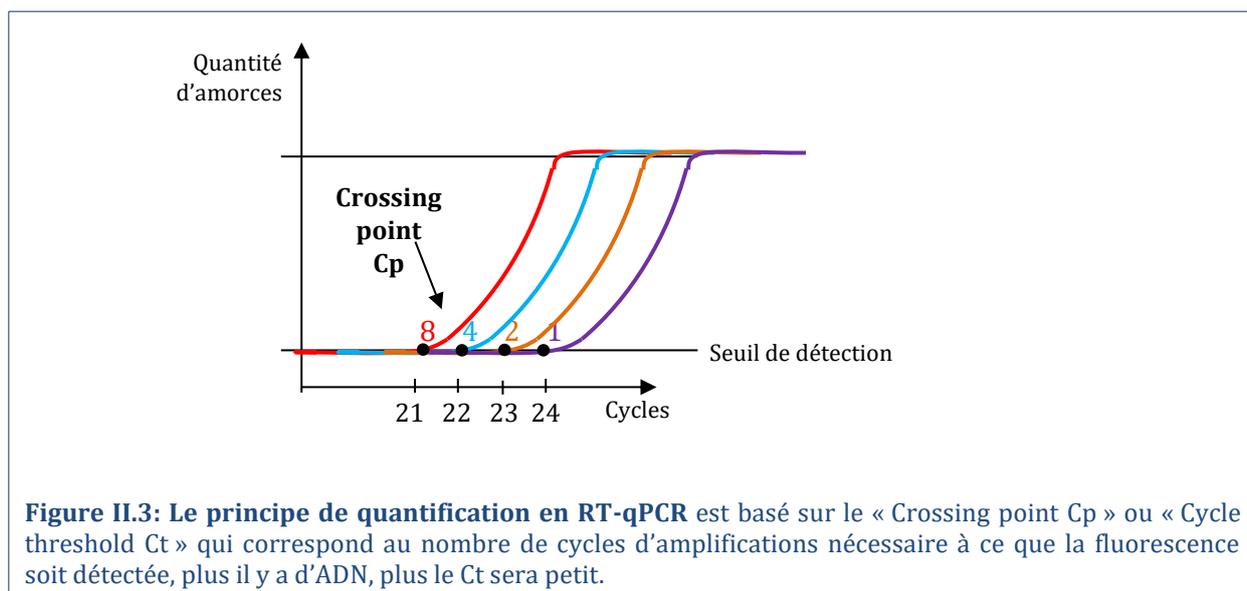
Gène	Amorce sens	Amorce anti-sens
Nrf2	5'-GAGACAGGTGAATTTCTCCCAAT-3'	5'-GGGAATGTGGGCAACCTGGG-3'
HO-1	5'-CAGGCAGAGAATGCTGATTC-3'	5'-GCTCTTCTGGGAAGTAGACAGG-3'
NQO1	5'- AAGAAAGGATGGGAGGTGGT-3'	5'-GCTTCTTTTGTTCAGCCACA-3';
SOD2	5'-TTGTCCAAATCAGGATCCAC-3'	5'- TGCAAGCCATGTATGATCTTTTCAG-3'
GSTP1	5'-CGGGCAAGGATGACTATGT-3'	5'-TCCAGCAGGTTGTAGTCAGC-3'
GPx	5'-GCGGGGCAAGGTACTACTTA-3'	5'- CTCTTCGTTCTTGGCGTTCT-3'
GAPDH	5'- CCCCTTCATTGACCTCAACTA-3'	5'-GACAAGCTTCCCGTTCTCA-3';
B2M	5'- GCTCGCGCTACTCTCTCTTT-3'	5'- GGATGAAACCCAGACACATA-3'.

L'amplification se déroule en deux étapes :

- 1- Une phase de dénaturation (Hot Start) à 95°C pendant 10 min, durant laquelle il y a séparation des deux brins d'ADN et des amorces par rupture des liaisons hydrogène, et activation de l'enzyme Taq polymérase possédant un groupement thermolabile qui bloque son activité à température ambiante.
- 2- Une phase de 45 cycles d'amplification, chaque cycle comportant lui même trois phases :

- a) une phase de dénaturation permettant la séparation des deux brins d'ADN, de 10 secondes à 90°C ;
- b) une phase d'hybridation des amorces spécifiques (10 secondes à 60°C). Le *SYBR green* va se lier au niveau des sites de fixations des amorces sur l'ADN et va alors émettre de la fluorescence ;
- c) une phase d'élongation (10 secondes à 72°C). La polymérase permet l'élongation d'un nouveau brin d'ADN à partir des amorces liées à celui-ci, se traduisant par une augmentation des sites de fixations du SYBR green et donc une augmentation de la fluorescence émise.

Pour chaque gène, l'analyse de la fluorescence émise en temps réel pendant toute la phase d'amplification conduit à la détermination du « Crossing point » ou Cp, c'est-à-dire le nombre de cycles d'amplification nécessaire afin que la fluorescence acquise sorte du seuil de détection. Le Cp est dépendant de la quantité d'ADN présent avant l'amplification, plus il y a d'ADNc, plus le Cp sera petit (**Figure II.3**).



Le calcul des Cp et de la quantité (relative) d'ADNc se fait par le logiciel LightCycler® (Roche Applied Science) grâce à une gamme étalon qui consiste en une série de dilutions du produit de la RT qui contient l'ADNc cible. La normalisation des Ct se fait grâce à des gènes de référence dont la quantité ne varie pas en fonction des traitements infligés aux cellules. Cela permet de normaliser le résultat pour le gène étudié en fonction du rendement de la RT, de l'intégrité et de la quantité des ARN, et des erreurs de pipetage et de dosage. Ce sont les gènes *β2 microglobuline* (B2M, [GenBank: 567]) et *glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase* (GAPDH, [GenBank: 2597]) qui ont servi de gènes de référence pour nos expériences.

II.4.5) Immunomarquage de Nrf2

- **Principe**

La translocation nucléaire du facteur de transcription Nrf2 a été observée par immunofluorescence, qui permet de cibler la protéine grâce à un anticorps primaire qui sera ensuite ciblé par un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome.

- **Méthode**

Les cellules 16HBE ont été cultivées sur le système Slide Lab-Tek Chamber™ (Thermo Scientific®) et exposées pendant 24h aux particules (10 µg/cm²) ou au Fe(II) (équivalent à 10 µg/cm² de PM-AW). Après traitement, les cellules ont été fixées avec 4% de paraformaldéhyde, puis perméabilisées avec 0,05% de Tween20 dilué en PBS 1X.

La protéine Nrf2 a été détectée par un anticorps primaire de chèvre anti-Nrf2 (dilué à 1/100^{ème}), qui lui-même a été ciblé par un anticorps secondaire anti-IgG de lapin conjugué au fluorochrome Alexa Fluor® 488 (dilué à 1/500^{ème}, Life Technologies). La coloration de l'actine a été réalisée en utilisant la rhodamine phalloïdine (0,8 U/ml, Life Technologies). Un marquage des noyaux a été réalisé avec du DAPI (4',6-Diamidino-phényl-2indole, dichlorhydrate, Life Technologies, 0,5 µg/ml). Les montages entre lames et lamelles ont été réalisés en utilisant du milieu de DABCO® (Sigma®).

L'immunofluorescence a été évaluée par l'observation des lames au microscope confocal laser (Zeiss LSM 710®, de la plateforme ImagoSeine de l'Institut Jaques Monod). Le microscope confocal permet d'obtenir des images de plusieurs profondeurs de champs et donc des coupes à différents niveaux de la cellule. Les images ont été compilées avec le logiciel Image J.

II.5) ÉTUDE DE LA VOIE DE SIGNALISATION CALCIQUE

II.5.1) Mesure du calcium intracellulaire par FlexStation®

- **Principe**

Le flux calcique des cellules a été mesuré grâce au kit FILPR® Calcium 5 Assay (Molecular Devices®) par le lecteur de plaque/injecteur FlexStation® 3 (Multi Detection Reader with Integrated Fluid Transfer, Molecular Devices®, Plateforme Métabolisme de l'unité de Biologie Fonctionnelle et Adaptative). La FlexStation® 3 est un lecteur de plaque avec un distributeur intégré permettant d'ajouter des produits juste avant ou pendant la lecture (en absorbance ou fluorescence). Le kit FILPR® Calcium 5 Assay contient la sonde fluorescence Fluo4 qui entre dans la cellule et fixe le calcium, ainsi qu'un « quencher » qui n'entre pas dans la cellule et permet ainsi de réduire le bruit de fond lié au calcium extracellulaire contenu dans le milieu de culture. Afin de mesurer tout le calcium intracellulaire et limiter la libération de calcium de la cellule vers l'extérieur, les canaux ioniques sont inhibés par la probénécide (Molecular Devices®).

- **Méthode**

Les cellules ont été cultivées dans des plaques 96 puits noires à fond transparent (Greiner®) puis traitées dans 100 µl de milieu DMEM/F12 sans UG ni rouge de phénol avec les particules pendant 4 h. L'expérience a ensuite été réalisée suivant le protocole du fournisseur. La sonde fluorescente Fluo4, ainsi que la probénécide (2,5 mM) ont été ajoutées pendant 45 min avant la lecture. Les inducteurs d'apoptose ont été injectés juste avant la lecture de la

fluorescence qui a lieu pendant 3 min. L'intensité de fluorescence de la sonde est proportionnelle à la concentration calcique, nous permettant de mesurer les concentrations de calcium intracellulaire en temps réel. Les résultats sont exprimés selon la formule : $(F/F_0)-1$ (avec F : Fluorescence, F₀ : Fluorescence au temps 0) qui traduit la fluorescence spécifiquement dû au traitement subi.

II.5.2) Mesure du calcium intracellulaire par cytométrie en flux

Le flux calcique des cellules a également été analysé par cytométrie en flux grâce à la sonde fluorescente Fluo4 du kit FILPR® Calcium 5 Assay (Molecular Devices®). Les cellules ont été traitées 24h par les particules et préparées pour la cytométrie sans marquage. Le fluorochrome et le « quencher » ont été ajoutés aux tubes de cytométrie (250 µl/tube) et incubés 30 min à 37°C selon les recommandations du fabricant. La fluorescence a été quantifiée de manière cinétique par cytométrie en flux (CyAn ADP LX, de la Plateforme ImagoSeine de l'Institut Jacques Monod) avant et juste après l'ajout des inducteurs d'apoptose dans les tubes.

II.6) ETUDE DES ALTERATIONS MORPHOLOGIQUES

II.6.1) Observation de l'actine en Microscopie électronique à fluorescence

Les altérations morphologiques ont pu être observées en microscopie électronique à transmission en fluorescence par un marquage de l'actine et de la tubuline. Après traitement par les inducteurs ou les PM, l'actine a été marquée à la phalloïdine-rhodamine 123 (0,8 U/ml, Life Technologies, fluoresce en rouge) et la tubuline a été immunomarkuée grâce à un anticorps secondaire couplé au fluorochrome FITC (fluoresce en vert). Après traitement par les PM, le marquage de l'actine a été réalisé selon la même méthode.

II.6.2) Microscopie électronique à balayage (MEB)

- **Principe**

Le microscope électronique à balayage permet de visualiser des objets en relief. Il utilise un fin faisceau d'électrons qui se focalise sur l'échantillon. L'interaction entre les électrons et l'échantillon provoque la formation d'électrons secondaires de plus faible énergie qui sont amplifiés puis détectés et convertis en un signal électrique. Ce processus est réalisé en chaque point de l'échantillon par un balayage du microscope. L'ensemble des signaux permet de reconstruire la typographie de l'échantillon et de fournir une image en relief.

- **Méthode**

Après traitement des cellules par les particules (4 h) et les inducteurs d'apoptose (1 h ou 3 h), elles ont été rincées au PBS 1X puis fixées par une solution de glutaraldéhyde à 25% dans du tampon cacodylate (0,1 M), 1 h à température ambiante. Après deux rinçages au PBS 1X, les cellules ont été colorées par de l'osmium 1%, 1h à température ambiante, afin d'accentuer le contraste en microscopie. Les échantillons ont ensuite été rincés à l'eau distillée puis

déshydratés par un gradient d'alcool : 3 fois 10 min à l'alcool 50%, 3 fois 15 min à l'alcool 70%, 3 fois 15 min à l'alcool 100%, puis l'observées en MEB.

II.6.3) Culture des cellules en milieu gélifié (METHOCEL™)

Le METHOCEL™ est composé de polymères de cellulose qui forme un milieu visqueux. 3 grammes de METHOCEL™ en poudre stérile ont été dissous dans 100 ml de milieu DMEM/F12, 1% PS et 0,5% FZ, mais sans UG ni Glx, chauffé à 60°C. Après 20 minutes d'agitation, 100ml du même milieu a été ajouté, puis mélangé 1 h sous agitation, et laissé pour la nuit à 4°C. Le lendemain le milieu est centrifugé 15 000 g pendant 1 h pour faire retomber les cristaux de METHOCEL™ non dissous.

Les cellules sont dans un premier temps cultivées et exposées aux composés particuliers pendant 24 h (puis rincées au PBS 1X), de manière répétée une fois par semaine pendant 5 semaines. Les cellules ont été maintenues à une confluence inférieure à 60 000 cellules/cm² par décollément à la Trypsine-EDTA et réensemencement. Après les traitements, les cellules sont décollées grâce à la Trypsine-EDTA puis réensemencées à 150 000 cellules pour 2 ml de milieu gélifié, les observations en microscopie optique ont ensuite été réalisées 3 jours après.

II.7) ANALYSE STATISTIQUE

Tous les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm SEM d'expériences indépendantes. Les données ont été analysées à l'aide d'une analyse de la variance (ANOVA). En cas de différence des variances, un test Bonferroni *ad hoc* de comparaisons multiples a été réalisé pour toutes les comparaisons par paires par rapport aux conditions contrôles ou par rapport aux différents traitements des cellules grâce au logiciel Prism5 GraphPad®. Les différences ont été considérées comme significatives si la valeur de p était au moins inférieure à 0,05.

III. RÉSULTATS : RÔLE DE LA COMPOSITION PHYSICO-CHIMIQUE DES PARTICULES DANS LA RÉGULATION DE L' APOPTOSE

III.1) Introduction.....	82
III.1.1) Contexte de l'étude.....	82
III.1.2) Rappel sur les particules étudiées.....	83
III.2) Résultats	84
III.2.1) Etude de l'induction d'apoptose.....	84
III.2.2) Etude de l'inhibition de l'apoptose.....	92
III.3) Conclusion	102

III.1) INTRODUCTION

III.1.1) Contexte de l'étude

Depuis les années 1950 jusqu'à aujourd'hui, de nombreuses études épidémiologiques, ont démontré les effets délétères de la pollution particulaire sur la santé humaine notamment au niveau respiratoire tels que les cancers broncho-pulmonaires (CBP) (*Greenburg et al. 1967; Higgins, I.T. 1976; Yanagi et al. 2012*). Le 17 octobre 2013, l'IARC a classé la pollution de l'air extérieur ainsi que les PM comme « cancérogène certain pour l'homme » (groupe 1, *IARC 2013*) sur la base des nombreuses recherches scientifiques montrant un lien de cause à effet entre la pollution atmosphérique et les CBP.

La pollution particulaire étant un mélange complexe de composés en suspension qui s'adsorbent les uns aux autres et forment des particules de différentes tailles (nommées PM pour « Particulate Matter »), les recherches s'intéressent au rôle de la taille et de la composition des PM dans la cancérogenèse. Il a notamment été montré que les particules fines sont associées à la mortalité par cancer du poumon, et la contribution annuelle de la pollution de l'air ambiant à la mortalité par CBP a été estimée à plus de 60 000 décès dans le monde (*IARC 2013*). Parmi les constituants particulaires, les HAP, dont le benzo(a)pyrène (BaP), ainsi que les métaux lourds sont reconnus comme des initiateurs et promoteurs de cancérogenèse.

L'échappement à la mort cellulaire programmée, ou apoptose, est l'une des premières caractéristiques obtenues par les cellules en voie de cancérisation (*Hanahan et al. 2011*). Dans le but d'améliorer les connaissances sur les processus de cancérogenèse provoqués par les particules nous sommes intéressés à la modulation de l'apoptose par les PM et aux mécanismes moléculaires sous-jacents.

Ce chapitre présente les résultats obtenus quant au **rôle de la taille et des composés particulaires sur la modulation de l'apoptose.**

Une partie de cette étude a été réalisée grâce à l'implication de notre laboratoire dans le projet ANR MEGATOX (« MEGacity Aerosols chemical characterization and TOXicity ») qui a eu pour but de caractériser la composition chimique et la toxicité de la pollution particulaire dans deux villes contrastées (en Europe et Afrique). Ce projet a permis de prélever les PM, de caractériser leur composition chimique et les sources de pollution, et d'étudier les effets biologiques des PM de différentes tailles à court terme et à long terme sur les cellules épithéliales et endothéliales respiratoires humaines.

J'ai donc eu accès à travers ce projet à des PM des 3 classes de taille (grossières G ; fines F et ultrafines UF) issues de sources contrastées et j'ai étudié leurs impacts sur l'induction ou l'inhibition de l'apoptose des cellules épithéliales bronchiques humaines. La concentration maximale de $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ utilisée mime une exposition de 5 jours à une pollution de $79 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (en PM_{2.5}), à laquelle nous pouvons être exposés, notamment dans des zones urbaines ou des mégacités comme Paris (considérant que le dépôt de la masse de PM_{2.5} est $2,3 \mu\text{g}/\text{cm}^2/24\text{h}$ dans la région trachéo-bronchique, pour un individu légèrement asthmatique, *Li, N. et al. 2003a*).

III.1.2) Rappel sur les particules étudiées

Les PM étudiées proviennent de deux campagnes de prélèvements :

- Une campagne réalisée en 2003 à Paris (périphérique porte d'Auteuil) et Vitry-sur-Seine, qui a permis de collecter 4 lots de PM_{2.5} (PM-AW, PM-AS, PM-VW, PM-VS), pour lesquels nous avons étudié leur cytotoxicité et leur effet anti-apoptotique.
- Une réalisée en 2009 et 2010 à Paris et Ouagadougou (Burkina-Faso) dans le cadre du projet MEGATOX, qui a permis de collecter des particules de trois classes de tailles : grossières G (PM_{1,5-10µm}), fines F (PM_{0,25-2,5µm}), ultrafines UF (PM_{<0,25µm}) et pour lesquelles a été étudiée leur cytotoxicité.

Pour une meilleure visibilité, la description des particules, leurs noms, et les détails des prélèvements sont résumés dans le tableau ci-dessous (copie du **Tableau II.3**) :

Pour rappel : **Tableau II.3: Prélèvements des particules atmosphériques.**

PM	Dates de prélèvements	Lieux	Heures	Sources identifiées
PM-AW	20/01 au 18/02/2003	Paris (porte d'Auteuil)	ND	– Trafic automobile
PM-AS	24/07 au 20/08/2003			
PM-VW	25/02 au 31/03/2003	Vitry-sur-Seine (banlieue parisienne)		– Pollution de fond urbain
PM-VS	18/06 au 23/07/2003			
WB1	4 au 18/02/2010	Palaiseau - SIRT (banlieue parisienne)	21h - 3h	– Pollution de fond urbain – Trafic automobiles – Biomasse (Chauffage au bois)
WB3	4 au 17/03/2010			
TR5	30/06 au 12/07/2010	Paris (toit du LHVP)	6h - 10h et 17h - 19h	– Pollution de fond urbain – Trafic automobile
TR6	12 - 29/07/2010			
TR7	25/08 au 20/09/2010			
OB3	19 au 20/11/2009	Centre-ville de Ouagadougou (Burkina-Faso)	17h - 22h	– Biomasse (Cuisson au bois) – Trafic mobylettes
OB4	24 au 26/11/2009		6h - 9h	– Biomasse (Cuisson au bois et brûlage d'ordures) – Trafic mobylettes
OP5	27 au 30/11/2009		10h - 16h	– Particules modifiées par la photochimie
OP6	1 au 2/12/2009		10h - 16h	

ND : pas de données. SIRT : Site Instrumental de Recherche par Télédétection Atmosphérique (. LVHP : Laboratoire d'Hygiène de la Ville de Paris (Paris 13°).

III.2) RESULTATS

III.2.1) Etude de l'induction d'apoptose

III.2.1.i) Les PM_{2.5} parisiennes de 2003

Les premières études auxquelles j'ai participé pendant mon stage de Master 2 au laboratoire ont porté sur les particules PM_{2.5} prélevées en 2003 de deux lieux et sources différents : les PM-AW et -AS prélevées à proximité d'un axe routier (périphérique de Paris, porte d'Auteuil) ainsi que les PM-VW et -VS ciblant la pollution de fond urbain (à Vitry-sur-Seine), prélevées en hiver (-W) et en été (-S) 2003 (décrites dans le § II.2.1 et le **Tableau II.3**).

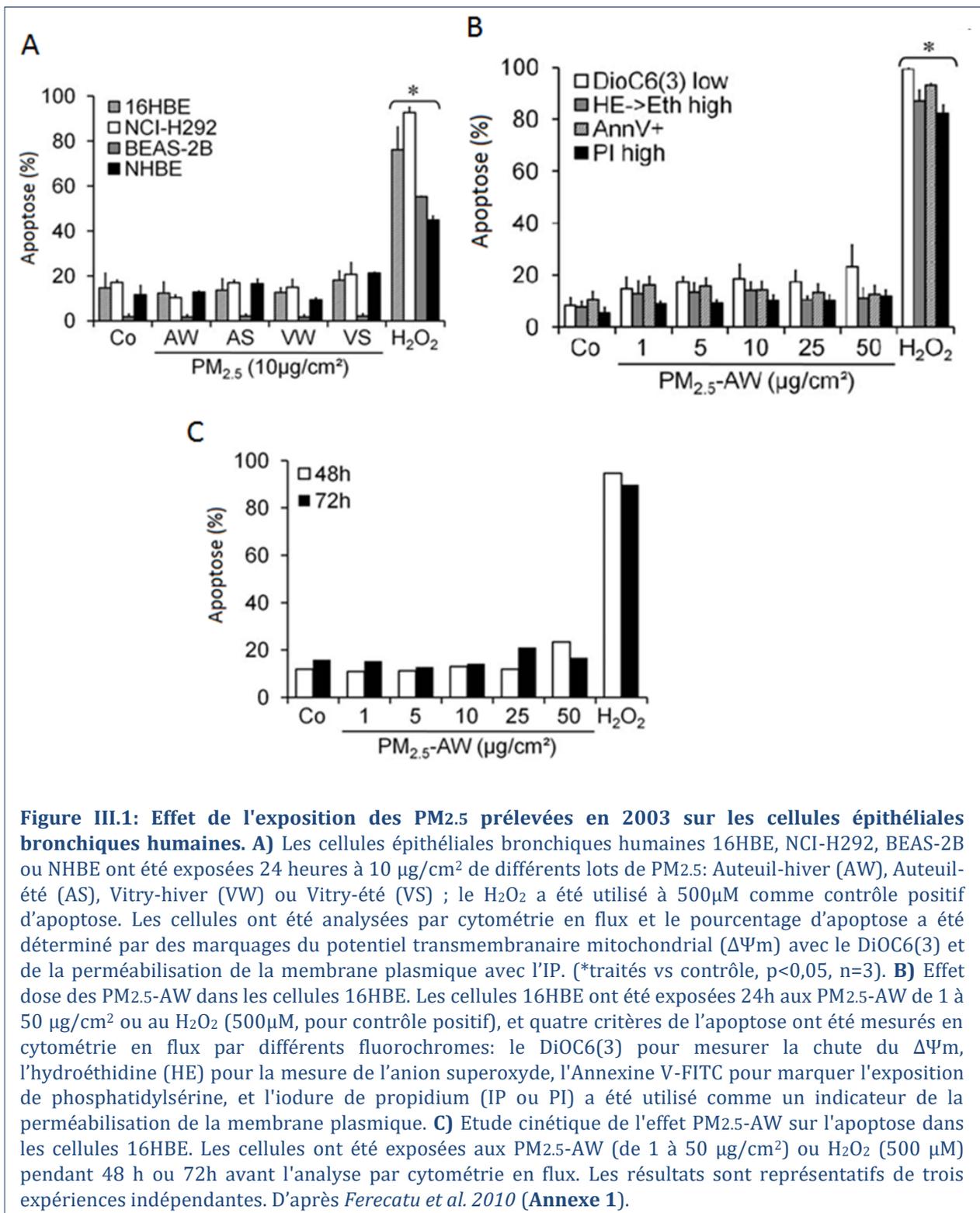
Cette étude a fait l'objet d'une publication dans *Particle and Fibre Toxicology* en 2010 (**Annexe 1**), intitulée :

"Polycyclic aromatic hydrocarbon components contribute to the mitochondria-antiapoptotic effect of fine particulate matter on human bronchial epithelial cells via the aryl hydrocarbon receptor".

Ioana Ferecatu, Marie-Caroline Borot, Camille Bossard, **Melanie Leroux**, Nicole Boggetto, Francelyne Marano, Armelle Baeza-Squiban, Karine Andreau.

Ainsi, nous avons tout d'abord montré que les quatre lots de PM_{2.5} prélevés en 2003 n'induisent pas l'apoptose de trois lignées de cellules épithéliales bronchiques humaines : 16HBE, NCI-H292 et BEAS-2B, ainsi que des cellules primaires bronchiques humaines NHBE (*Ferecatu et al. 2010*, **Figure III.1 A**). Cette innocuité des PM_{2.5}-AW a été mise en évidence vis-à-vis de quatre paramètres apoptotiques mesurés par cytométrie en flux : la chute du potentiel transmembranaire mitochondrial déterminée par le DiOC6(3), la production d'anion superoxyde quantifiée par le HE, l'exposition des phosphatidylsérines mesurée par l'AnnV, et la perméabilisation de la membrane plasmique grâce à l'IP (**Figure III.1 B**). Ainsi, l'absence de cytotoxicité des PM-AW a été observée pour des concentrations allant de 1 à 50 µg/cm² (**Figure III.1 C**) et pour des temps d'exposition de 24h, 48h et 72h (**Figure III.1 B et C**).

Ces résultats montrent donc que les PM_{2.5} parisiennes de 2003 n'induisent pas l'apoptose des cellules épithéliales bronchiques humaines.



III.2.1.ii) Les particules parisiennes Trafic (TR) G, F et UF de 2010

Les résultats précédents montrent que des PM_{2.5} parisiennes ne sont pas cytotoxiques pour les cellules épithéliales bronchiques humaines. Cela est-il lié à une taille des particules ? Des particules plus grosses ou plus petites induiraient-elles l'apoptose ?

Afin d'appréhender le paramètre de taille des PM, nous avons analysé les particules TR5, TR6 et TR7 de 2010 pour les trois classes de taille (G, F et UF). Parmi ces 3 échantillons, il s'est avéré que TR6 avait un impact différent des particules TR5 et TR7. Nous avons donc fait la moyenne des résultats obtenus pour TR5 et TR7, et les résultats de TR6 ont été analysés séparément (**Figure III.2**). Après 24h d'exposition, les particules TR5 et TR7 des 3 classes de taille n'induisent pas d'augmentation de l'apoptose des cellules 16HBE. Cependant, une augmentation modérée de l'apoptose semble apparaître lorsque les cellules sont exposées aux TR6 G et UF pour les doses de 5 et 1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, respectivement.

Ainsi, les particules TR5 et TR7 de 2010 ne semblent pas cytotoxiques pour les cellules 16HBE quelle que soit leur taille, alors que le lot TR6 pourrait induire l'apoptose en relation avec la taille et la dose des particules.

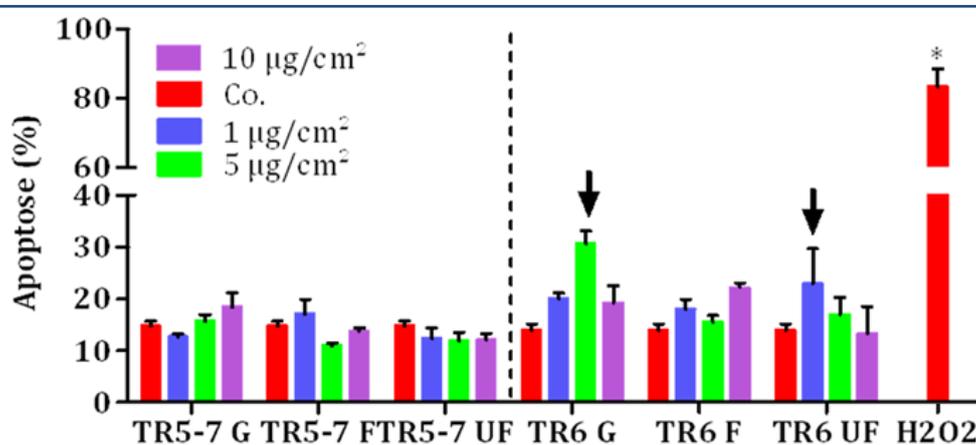


Figure III.2 : Effet de l'exposition aux particules TR sur les cellules 16HBE. Les cellules 16HBE ont été exposées 24h aux PM grossières (G), fines (F) et ultrafines (UF) aux concentrations de 1, 5 et 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ avant la quantification de l'apoptose par cytométrie en flux des cellules présentant simultanément une dépoliarisation mitochondriale (DiOC(6)3 low) et une perméabilisation de la membrane plasmique (PI high). Le H2O2 (1mM) a été utilisé comme control positif. (*traités vs contrôle, $p < 0.001$, $n = 4$ pour TR5-7 et $n = 2$ pour TR6 sans test statistique).

III.2.1.iii) Les particules parisiennes Biomasse (WB) G, F et UF de 2010

Afin de comprendre si la composition chimique des particules était un paramètre impliqué dans la cytotoxicité des PM, nous avons étudié les particules parisiennes WB dont les sources identifiées sont le chauffage au bois en plus du trafic automobile et de la pollution de fond.

Du fait des quantités très limitées en particules qui ont été prélevées ($\text{PG} = 1.8 \mu\text{g}/\text{m}^3$, $\text{PF} = 14.4 \mu\text{g}/\text{m}^3$ et $\text{PUF} = 1.8 \mu\text{g}/\text{m}^3$ en moyenne pour WB1 et WB3), nous n'avons pu faire que 2 réplicats pour chaque source et donc choisi de présenter ici la moyenne des résultats obtenus pour WB1 et WB3 (notée WB). Comme illustré sur la **figure III.3**, les différentes classes de particules provenant du site biomasse WB n'induisent pas l'apoptose des cellules 16HBE jusqu'à une concentration de 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Ceci est en accord avec les résultats précédents.

En conséquence, les particules WB de 2010 ne semblent pas cytotoxiques pour les cellules 16HBE quelle que soit leur taille.

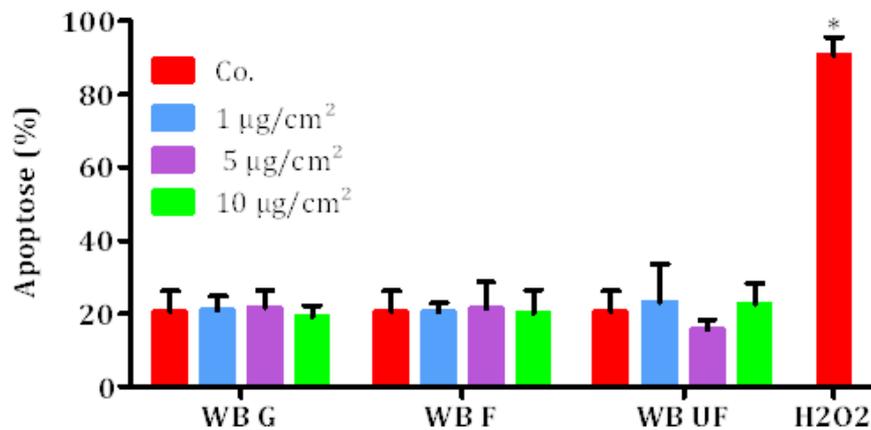


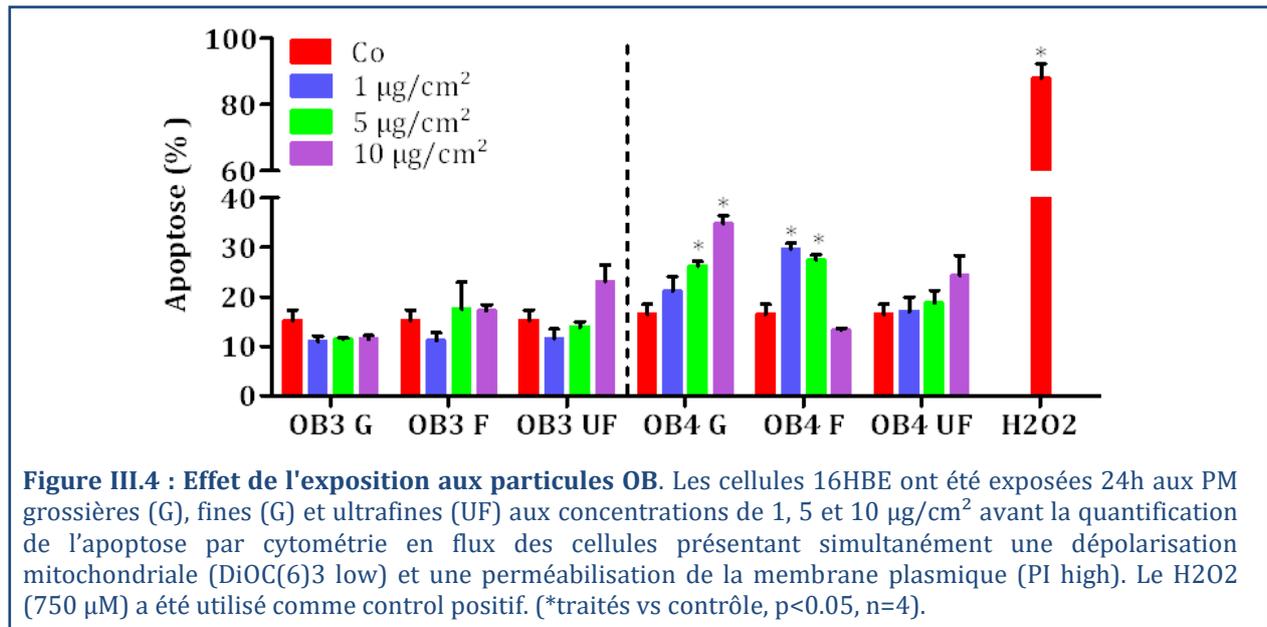
Figure III.3: Effet de l'exposition aux particules WB. Les cellules 16HBE ont été exposées 24h aux PM grossières (G), fines (G) et ultrafines (UF) aux concentrations de 1, 5 et 10 µg/cm² avant la quantification de l'apoptose par cytométrie en flux des cellules présentant simultanément une dépolarisation mitochondriale (DiOC(6)3 low) et une perméabilisation de la membrane plasmique (PI high). Le H₂O₂ (750 µM) a été utilisé comme control positif. (*traités vs contrôle, p<0.001, n=4).

III.2.1.iv) Les particules Biomasse G, F et UF de Ouagadougou (OB)

La divergence des résultats précédents obtenus avec des particules ayant des sources identifiées proches (TR6 vs. les autres lots de PM parisiennes) interroge sur le rôle exact de la composition chimique des PM dans leurs effets sur l'apoptose. Afin de mieux appréhender le rôle des composés particulaires, nous avons tiré avantage de l'accès aux PM africaines prélevées à Ouagadougou et donc issues de sources très contrastées par rapport aux PM parisiennes de 2003 et 2010. En effet, l'intérêt d'étudier cette ville africaine sub-saharienne réside dans des concentrations en particules très fortes (près de 10 fois les niveaux parisiens) avec une multitude de sources potentiellement toxiques (cuisson au bois, trafic de deux roues et parc automobile ancien, brûlage des déchets, remise en suspension des routes non goudronnées, proximité du désert, etc.).

Les résultats montrent que les particules Biomasse de Ouagadougou, prélevées le soir (OB3, **Figure III.4**) n'altèrent pas l'apoptose spontanée des cellules 16HBE quel que soit la taille des PM. A l'inverse, les particules prélevées au même endroit mais le matin (OB4) induisent une augmentation du taux apoptotique des cellules 16HBE de manière dose-dépendante pour les particules grossières et à 1 et 5 µg/cm² pour les fines. Ceci pourrait s'expliquer par le brûlage des ordures qui intervient spécifiquement le matin et différencie donc les lots OB3 et OB4.

En plus de la taille et de la concentration, la temporalité des prélèvements et donc la composition chimique des PM semble être un paramètre régulant l'induction de l'apoptose des cellules bronchiques humaines.

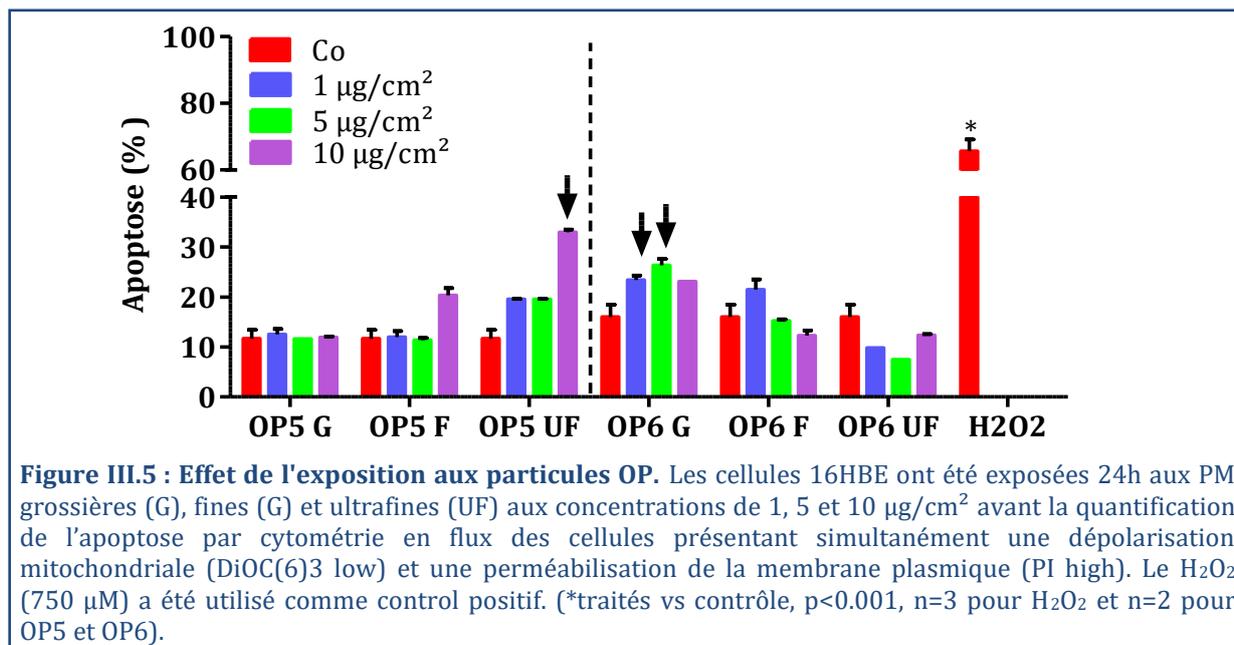


III.2.1.v) Les particules Photochimie G, F et UF de Ouagadougou (OP)

La pollution photochimique ou pollution photo-oxydante, résulte de la transformation de polluants primaires par les rayonnements ultra-violetes solaires. Cette pollution atmosphérique est riche en composés oxydés et espèces oxydantes (voir **Figure I.20**) tels que l'ozone et l'anion superoxyde (*CITEPA 2013*). Il est donc particulièrement intéressant d'étudier les propriétés des particules issues de la photochimie.

L'étude par cytométrie en flux montre que les particules UF OP5 semblent induire une faible augmentation de l'apoptose à 10 µg/cm² (**Figure III.5**). Tandis que les particules OP6 augmenteraient modérément l'apoptose des cellules 16HBE pour des concentrations plus faibles (1 et 5 µg/cm²) et pour des particules plus grosses (G).

Comme précédemment, la temporalité des prélèvements et donc la composition chimique des PM semble être un paramètre régulant l'induction de l'apoptose.

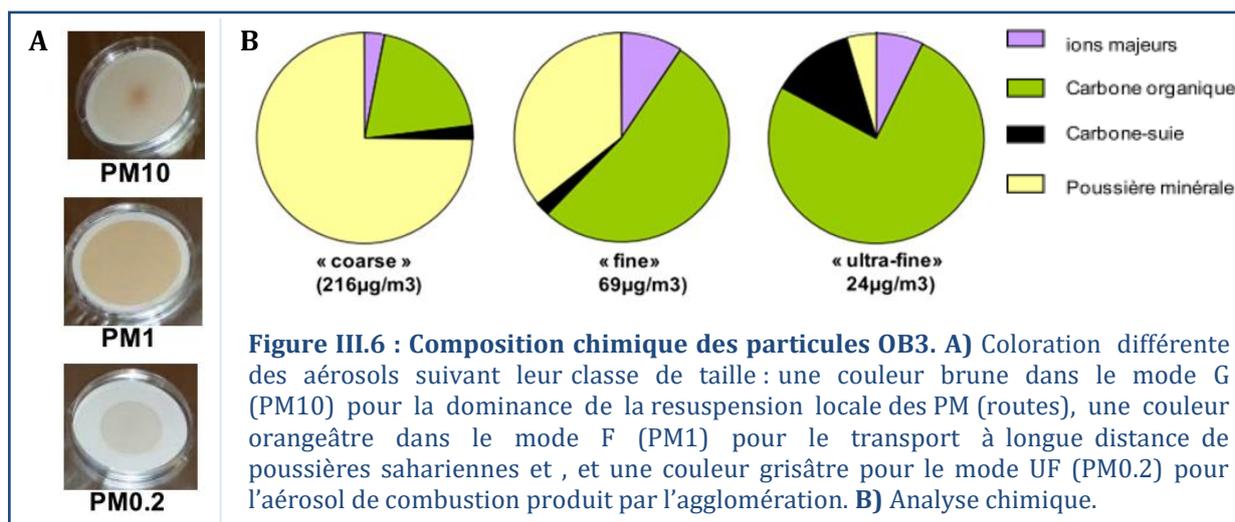


III.2.1.vi) Résultats complémentaires & Discussion

Cette partie de l'étude nous a permis de démontrer que les particules PM_{2.5} prélevées en 2003 n'induisent pas l'apoptose des cellules 16HBE (**Figure III.1**). L'étude des particules de différentes classes de tailles n'a pas permis d'établir de lien entre la taille des particules et leur cytotoxicité modérée (**Figure III.2, III.4 et III.5**), qui serait plutôt en relation avec les lieux et la temporalité des prélèvements (**Figures III.4 et III.5**) et donc avec la composition chimique des PM. En effet, des particules de même classe de taille, prélevées soit à Paris soit à Ouagadougou ont des effets différents sur l'apoptose des cellules 16HBE : TR6 vs TR5-7, OB4 vs OB3, OP5 vs OP6.

Cependant, les résultats obtenus avec les particules de Ouagadougou sont à interpréter avec prudence du fait des nombreux problèmes qui ont surgi avec ces PM aussi bien pour leur analyse chimique que biologique. En effet, lors des prélèvements, une quantité importante de poussières crustales sont venues contaminer les étages des impacteurs et ont enrichi de manière artificielle les fractions F et UF. Ceci s'est traduit visuellement par une coloration différente des aérosols suivant leur classe de taille (**Figure III.6**):

En résumé, la taille, la dose et la composition chimique des PM constituent des paramètres qui conditionnent possiblement l'induction de l'apoptose.



Afin d'avoir une meilleure interprétation des résultats obtenus, il est nécessaire de les comparer avec les autres expériences réalisées lors du projet MEGATOX.

- **Autres tests de cytotoxicité**

En parallèle, le laboratoire de toxicologie de l'Institut Pasteur de Lille (IPL) a réalisé d'autres tests de viabilité sur le même type cellulaire : un test au bleu Trypan, un colorant qui est exclu activement des cellules vivantes et permet donc de les discriminer des cellules mortes ou mourantes ; un test des halos qui utilise un gradient de solvant et une coloration au bromure d'éthidium permettant de distinguer les cellules vivantes, nécrotiques, ou apoptotiques ; ainsi qu'un test des comètes (ou Single Cell Gel Electrophoresis, SCGE) permettant de détecter et quantifier des lésions primaires de l'ADN, par électrophorèse.

Les résultats du test comète n'ont pas montré d'effets génotoxiques des particules prélevées à Paris et Ouagadougou en 2009-2010, de même que le test au bleu Trypan et le test des halos n'ont montré aucune cytotoxicité pour ces particules, excepté des phénomènes de nécrose causés par les particules OB3 UF et OB4 G à 10 µg/cm². Ces résultats sont concordants avec nos résultats obtenus par cytométrie en flux sur les paramètres de chute du potentiel transmembranaire mitochondrial et de perméabilisation de la membrane plasmique (**Figure III.4 A**).

- **Etude de l'expression des gènes pro-inflammatoires**

L'absence ou l'induction modérée d'apoptose dans les cellules 16HBE ne signifie pas que les particules étudiées ici ne modifient pas l'état des cellules bronchiques, comme l'expression des cytokines pro-inflammatoires. Depuis de nombreuses années, notre laboratoire s'intéresse à l'expression des gènes de l'inflammation et du métabolisme des xénobiotiques et il a été montré précédemment que les PM-AW, -AS, -VW et -VS induisent notamment la sécrétion de l'Amphiréguline (AR) et du GM-CSF (« Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor ») après 24 heures d'exposition (**Figure III.7**).

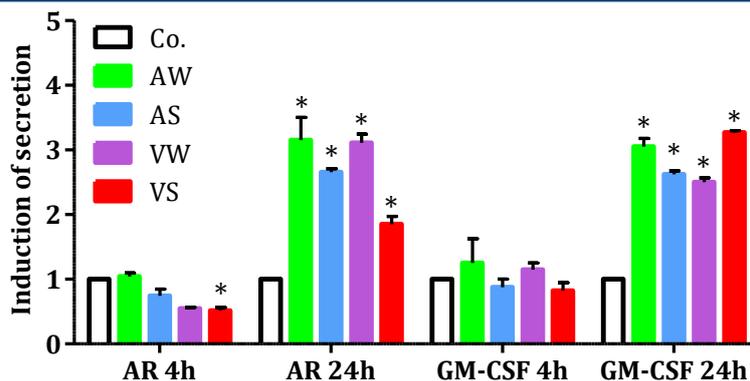


Figure III.7: Potentiel pro-inflammatoire de différents lots de PM_{2,5} (AW, AS, VW et VS). Après 4 ou 24 heures d'exposition à 10 µg/cm² de particules, la sécrétion de l'Amphiréguline (AR) et du GM-CSF a été évaluée par ELISA. (*traités vs contrôle, p<0.001, n=3). D'après *Ferecatu et al. 2010 (Annexe 1)*.

Concernant les PM de 2010, une étude approfondie de l'AR, du GM-CSF, de l'IL-6 (Interleukine 6), du CYP1A1 (cytochrome P450 1A1), de NQO-1 (NADPH Quinone Oxydoréductase 1) et HO1 (Hème Oxygénase 1) a été réalisée par le Dr Laura Boublil *via* RT-qPCR (**Figure III.8**). Après une exposition des cellules 16HBE avec 10µg/cm² de particules pendant 24h, les ARNm des gènes de l'inflammation et du métabolisme des xénobiotiques ont été quantifiés. Les représentations en radars confirment que la fraction grossière est celle ayant le moins d'effets sur l'expression génétique quel que soit le biomarqueur considéré comparativement aux PM F et UF. Par ailleurs, les fractions fines TR7 et WB1 semble être très réactives et induire une surexpression de quatre gènes étudiés (IL-6, NQO1, CYP1A et AR,). Pour la fraction UF, ce sont les PM WB3, TR6 et TR7 qui semblent les plus réactives avec une surexpression des gènes de l'IL-6, NQO-1, AR, et GM-CSF (**Figure III.7 A**).

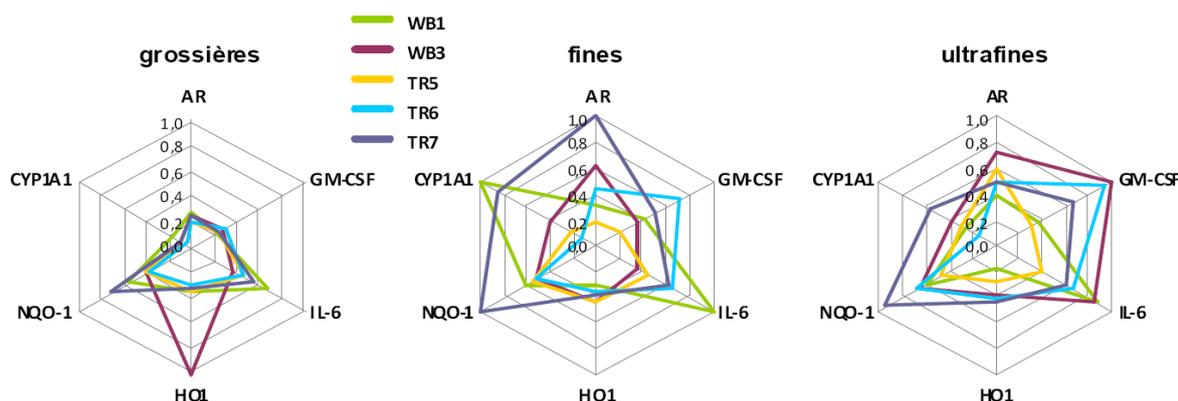


Figure III.8: Représentation, en radars, des effets des PM sur l'expression des gènes de l'inflammation. Les cellules 16HBE ont été traitées pendant 24h avec 10µg/cm² de PM prélevées à Paris en 2009-2010. L'expression des ARNm des gènes du GM-CSF (Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor), de l'IL-6 (Interleukine 6), du CYP1A1 (cytochrome P450 1A1), de l'AR (Amphiréguline), de NQO-1 (NADPH Quinone Oxydoréductase 1) et de HO1 (Hème Oxygénase 1) ont été mesurés par RT-qPCR et normalisés en affectant 1 à la plus forte induction.

Ces modifications de l'expression génétique concordent avec les résultats trouvés dans la littérature. En effet, il a été largement démontré que les particules atmosphériques induisent

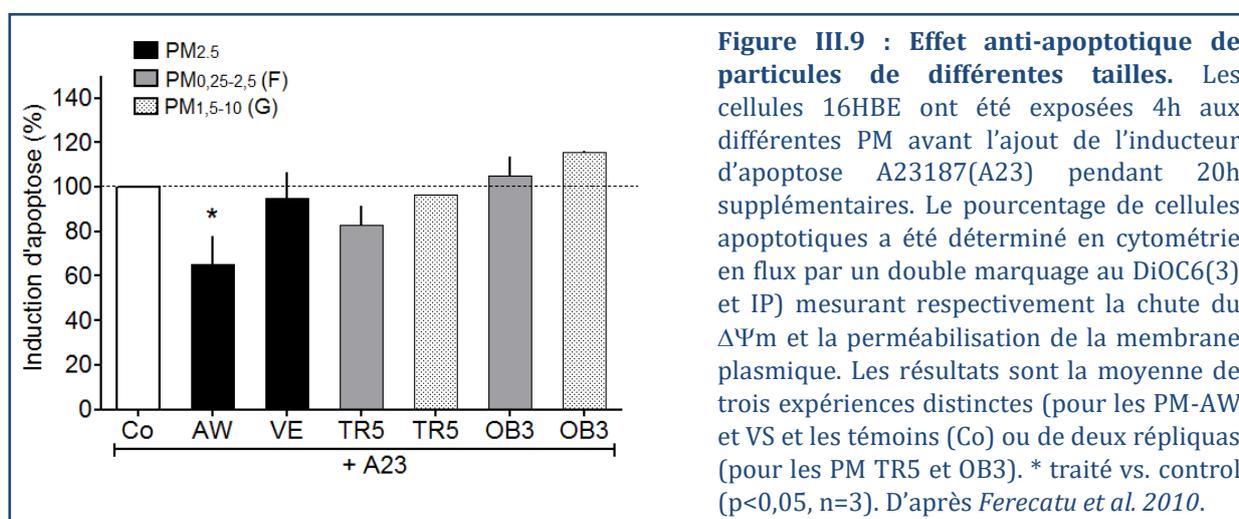
l'augmentation de l'expression des gènes du métabolisme des xénobiotiques et du stress oxydant tels que le CYP 1A1, HO1 et NQO1, ainsi que les gènes de l'inflammation tels que l'AR, le GM-CSF et l'IL-6 (Abbas *et al.* 2009; Baulig *et al.* 2009; Aung *et al.* 2011; Danielsen *et al.* 2011; Diabate *et al.* 2011; Dergham *et al.* 2012). L'expression de ces gènes traduit de la mise en place d'un mécanisme de défense physiologique et cellulaire contre ces toxiques, mais n'est pas obligatoirement lié à une cytotoxicité conduisant à l'altération ou la mort des cellules. Ainsi, ces résultats ne sont pas en désaccord mais sont complémentaires de ceux obtenus sur l'apoptose.

III.2.2) Etude de l'inhibition de l'apoptose

III.2.2.i) Rôle de la taille

L'absence de cytotoxicité des PM_{2.5} de 2003 ne veut pas dire que ces particules ne modifient pas l'état des cellules bronchiques, par exemple leur faculté à mourir par apoptose. Nous avons donc étudié la capacité des PM à réduire l'apoptose induite par diverses molécules. Pour cela, les cellules ont été exposées pendant 4h aux PM seules, puis 20h additionnelles en présence d'un inducteur d'apoptose tel que l'ionophore calcique A23187 (A23). Ainsi, les PM_{2.5}-AW semblent avoir un effet anti-apoptotique sur les cellules épithéliales bronchiques humaines alors que les PM_{2.5}-VS restent sans effet (**Figure III.9**).

Concernant les particules prélevées en 2009-2010, l'effet anti-apoptotique n'a pu être étudié que pour les PM TR5 et OB3 et uniquement pour les fractions G et F par manque de particules collectées. Néanmoins, la figure III.9 montre que les particules parisiennes (TR5) et africaines (OB3), grossières et fines, n'ont pas l'effet anti-apoptotique démontré pour les PM_{2.5}-AW (**Figure III.9**) bien que l'on puisse noter une légère diminution dans le cas de TR5 F. Sachant que les PM_{2.5} comprennent toutes les particules prélevées inférieures à 2,5 µm et que les particules fines (F) sont comprises entre 2,5 et 0,25 µm (voir § II.2.3), ils serait nécessaire d'effectuer d'autres prélèvements afin de statuer sur le rôle de la taille dans l'effet anti-apoptotique des PM.



III.2.2.ii) Rôle de la composition chimique

Afin de déterminer le rôle de la composition chimique des particules dans leur effet anti-apoptotique, les cellules 16HBE ont été exposées 4 heures aux quatre lots de particules de 2003 (PM-AW, -AS, -VW et -VS), ainsi qu'aux extraits organiques (Oex) ou aqueux (Aex) des PM-AW, aux PM-AW lavées (wash, dépourvues des composés hydrosolubles), ou à des particules de noir de carbone (CB, mimant le cœur carboné, voir **Figure I.6**). L'apoptose a ensuite été induite pendant 20h supplémentaires avec l'A23187 puis quantifiée par cytométrie en flux aux regards des paramètres de chute du $\Delta\Psi_m$ (DiOC(6)3 low) et de production de l'anion superoxyde (HE-> Eth high). La **Figure III.10** montre que parmi les quatre lots prélevés en 2003, les PM-AW, -AS et -VW réduisent d'environ 40% l'apoptose induite par l'A23187 (A23). A l'inverse, les PM-VS restent sans effet, suggérant que la composition chimique des particules, qui varie entre ces différents lots, pourrait être un paramètre déterminant.

Les résultats montrent que l'extrait organique, comme l'extrait aqueux et les PM-AW lavées, miment partiellement l'effet anti-apoptotique des PM-AW entières (**Figure III.10**) ; au contraire du CB qui n'a aucun effet anti-apoptotique.

Ainsi, la composition chimique semble être un paramètre clé impliqué dans l'effet anti-apoptotique des particules, en particulier les composés organiques et hydrosolubles.

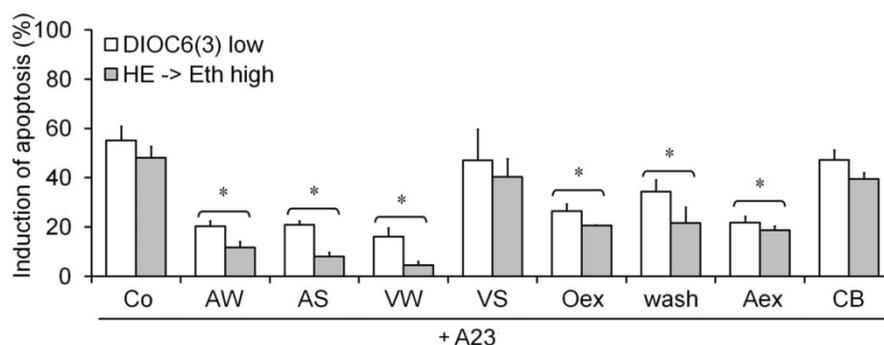


Figure III.10: Effet anti-apoptotique des différents composés particulaires. Les cellules 16HBE ont été prétraitées 4h par $10\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de PM_{2.5} (-AW, -AS, -VW, -VS), ou à la concentration équivalente d'extrait organique (Oex, $4,27\text{mg}/\text{ml}$) ou aqueux (Aex) des PM-AW, ou aux particules PM-AW lavées (wash, $10\mu\text{g}/\text{cm}^2$), ou au noir de carbone (CB, $10\mu\text{g}/\text{cm}^2$), avant une exposition de 20h supplémentaires à l'inducteur d'apoptose A23187 ($3\mu\text{M}$). Le pourcentage de cellules apoptotiques a été déterminé en cytométrie en flux par un double marquage au DiOC6(3) et HE. Co : Contrôle. * traité vs. control ($p < 0,05$, $n=3$). D'après *Ferecatu et al. 2010*, (**Annexe 1**).

III.2.2.iii) Rôle des composés organiques

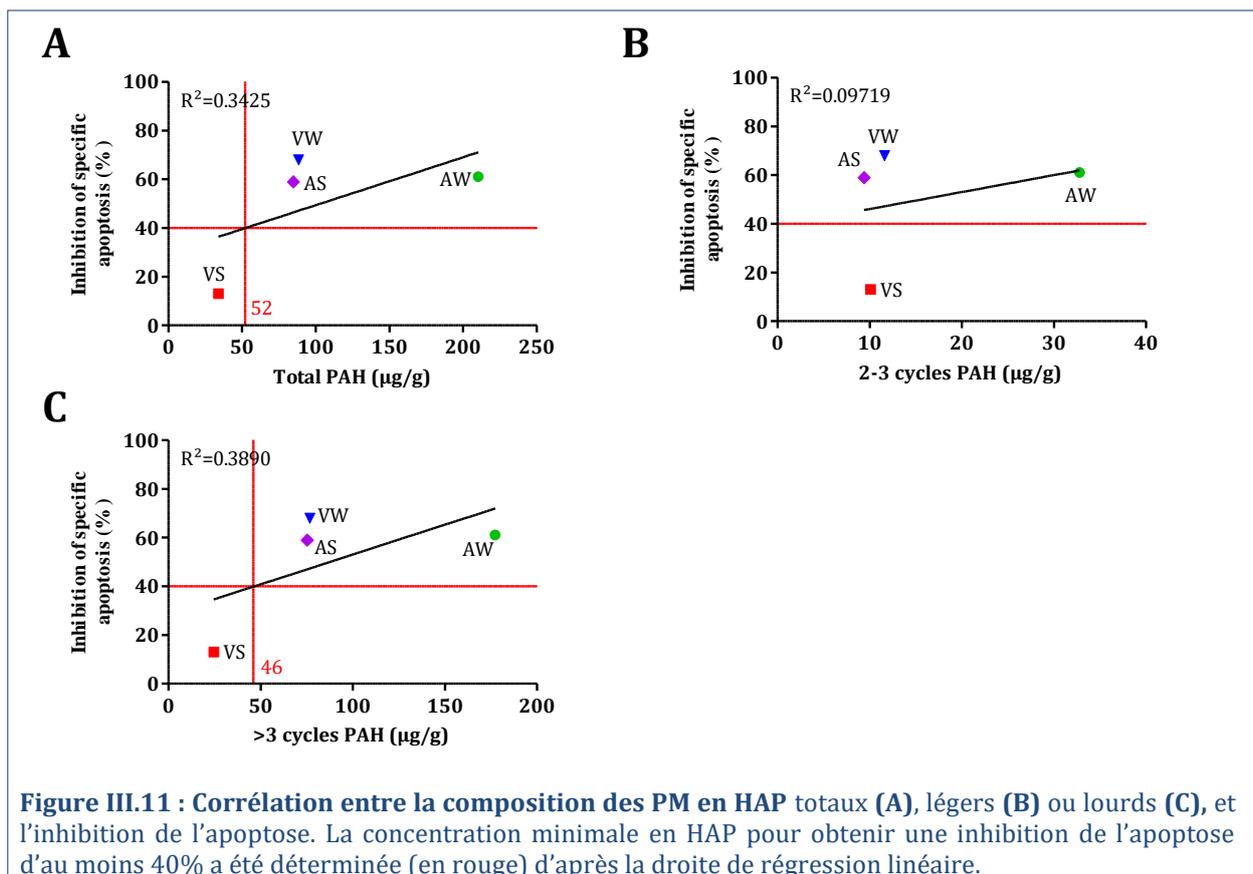
Puisque les composés organiques des PM semblent impliqués dans leur effet anti-apoptotique, nous nous sommes particulièrement intéressés aux hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) (**Tableau III.1**). L'analyse chimique des PM montre que les particules anti-apoptotiques (c'est-à-dire PM-AW, -AS et -VW) possèdent une quantité totale de HAP très

supérieure aux particules non anti-apoptotiques (PM-VS), laissant supposer que les HAP pourraient participer à l'effet anti-apoptotique. Un constat identique peut-être fait concernant les HAP de plus de 3 cycles benzéniques mais pas à propos des HAP de 2 et 3 cycles.

Tableau III.1: Composition en HAP des PM de 2003. D'après *Baulig et al. 2004*.

HAP (µg/g)	PM-AW	PM-AS	PM-VW	PM-VS
Total	210.2	84.7	88.3	34.7
HAP légers (2-3 cycles)	32.8	9.4	11.6	10.1
Phénanthrène	7.8	5.4	2.5	3.0
Fluoranthène	16.9	8.9	4.8	3.6
HAP lourds (> 3 cycles)	177.4	75.3	76.7	24.6
Benzo(b)fluoranthrène	21.4	13.4	14.6	3.4
Benzo(k)fluoranthrène	7.8	2.7	5.4	1.1
Benzo(a)pyrène	17.0	3.5	5.3	1.1
Dibenzo(a,h)anthracène	2.4	1.9	11.9	0.4
Benzo(g,h,i)pérylène	30.6	11.4	13.3	3.8
Benzo(g,h,i)pérylène	30.6	11.4	13.3	3.8
Indéno-pyrène	15.0	4.0	7.3	2.1

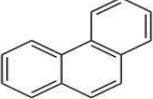
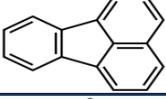
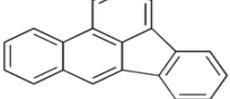
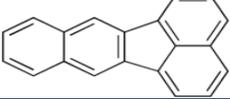
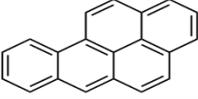
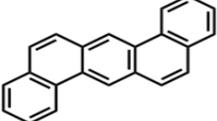
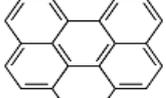
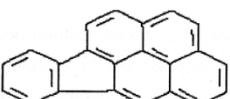
Afin de vérifier cette supposition, des essais d'association linéaire entre l'inhibition de l'apoptose (d'au moins 40%) et la composition en HAP des différents lots de particules ont été réalisés (**Figure III.11**). Les représentations graphiques obtenues confirment que, contrairement aux HAP légers, les HAP lourds (ayant plus de 3 cycles benzéniques) semblent impliqués dans l'effet anti-apoptotiques des PM. De plus, cette étude, bien que quelque peu spéculative, suggère que l'inhibition de l'apoptose pourrait requérir une concentration minimale en HAP totaux d'au moins 52 µg/g de particules.



Afin de valider l'implication des HAP lourds dans l'effet cytoprotecteur des PM, les cellules 16HBE ont été exposées pendant 4h à différents HAP (**Tableau III.2**). En accord avec les résultats précédents, nous avons montré que seuls les HAP particuliers (de cinq cycles benzéniques ou plus) ont des propriétés anti-apoptotiques (*Ferecatu et al. 2010, Annexe 1*). En particulier, le Benzo(a)pyrène (BaP) est celui qui permet la plus grande inhibition de l'apoptose induite par A23187, avec un effet proche de celui observé avec les PM-AW entières (*Andreau et al. 2012*).

Les HAP particuliers à plus de 5 noyaux benzéniques participent à l'effet anti-apoptotique des PM, en particulier le BaP, et une concentration minimale semble requise.

Tableau III.2: L'effet anti-apoptotique des différents des PM-AW est lié aux HAP ayant cinq cycles benzéniques ou plus. Les cellules 16HBE ont été prétraitées pendant 4h avec différents HAP aux concentrations équivalentes à 10 µg/cm² (50 µg/ml) de PM-AW avant l'induction de l'apoptose par A23187 (3 µM) pendant 20h supplémentaires. Les résultats sont la moyenne ± SD (n=6). La significativité a été calculée par le test de Dunnett (*traité vs solvant cyclohexane 1%, p <0,01). A noter que l'apoptose induite par A23 seul provoque une chute du ΔΨ_m (DiOC⁻) et une perméabilisation de la membrane plasmique (PI⁺) de 93.00 ± 3.31% et 96,97 ± 7,18%, respectivement. En outre, l'exposition aux PM-AW (10 µg/cm²) induit en moyenne une diminution de l'apoptose induite par A23 de 64.33 ± 9.89 % (DiOC low) et de 39.45 ± 8.50 % (PI high). D'après *Andreau et al. 2012(Annexe 2)*.

HAP	Structure	Apoptose induite par A23 (% du contrôle)	
		DiOC ⁻	PI ⁺
Phénanthrène		88.96 ± 5.00	94.43 ± 6.33
Fluoranthène		86.22 ± 7.13	87.37 ± 10.79
Benzo[b]fluoranthène		91.17 ± 3.62	99.17 ± 8.41
Benzo[k]fluoranthène		96.41 ± 6.56	104.09 ± 11.45
Benzo[a]pyrène		70.27 ± 5.60*	34.55 ± 3.68*
Dibenzo[a,h]anthracène		80.69 ± 1.26*	80.10 ± 5.37*
Benzo[g,h,i]pérylène		75.49 ± 2.94*	75.91 ± 3.31*
Indéno[1,2,3-cd]pyrène		79.38 ± 4.43*	80.24 ± 10.38*

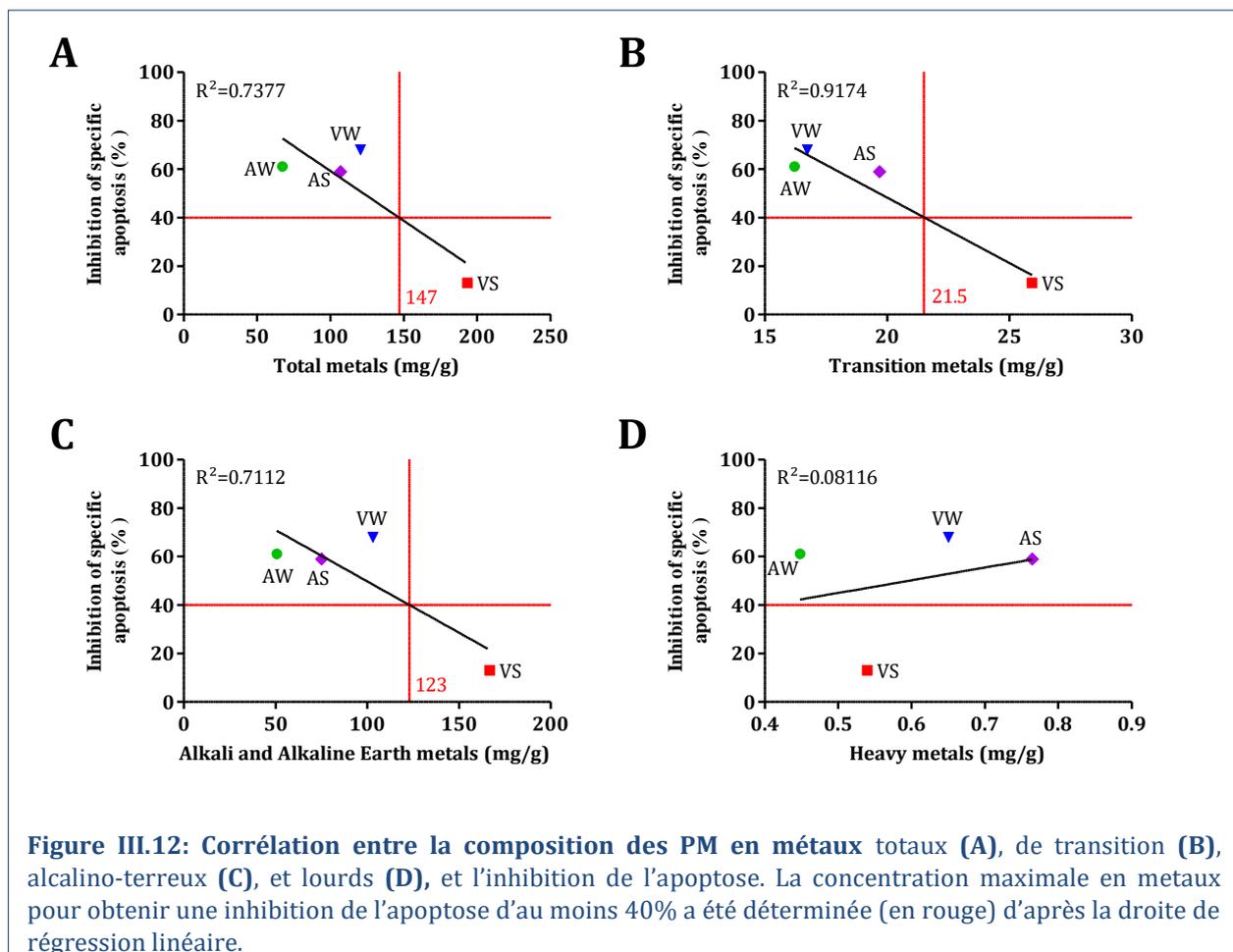
III.2.2.iv) Rôle des composés métalliques

Cette étude constitue la première partie d'une publication soumise (voir **Chapitre IV**) et ne seront rappelés ici que les principaux résultats présentés dans l'article :

"Urban fine PM and their metallic compounds protect human bronchial epithelial cells from apoptosis: Role of Nrf2"

Melanie Lovera-Leroux, Belinda Crobeddu, Nadim Kassis, Armelle Baeza-Squiban and Karine Andreau

En plus des composés organiques tels que les HAP particulaires, les résultats précédents semblent également impliquer les composés hydrosolubles dans l'effet anti-apoptotique des PM (voir **Figure III.10**). Parmi les composés hydrosolubles, nous nous sommes intéressés au rôle des composés métalliques. De manière préliminaire, des essais d'association linéaire entre l'inhibition de l'apoptose (d'au moins 40%) et la composition métallique des différents lots de particules ont été réalisés (**Figure III.12**). Les représentations graphiques obtenues suggèrent qu'une concentration maximale en métaux (<147 mg/g de PM) serait nécessaire à l'établissement de l'effet anti-apoptotique et ceci en lien avec les métaux de transition (< 21.5 mg/g), alcalins et alcalino-terreux (< 123 mg/g), mais indépendamment des métaux lourds.



Afin d'identifier les métaux de transition ou alcalino-terreux qui seraient impliqués dans l'effet cytoprotecteur des PM, les cellules 16HBE ont été exposées 4h à différents métaux sous forme ionique, à la concentration équivalente à 10 µg/cm² de PM-AW ou de PM-VS (pour rappel **Tableau II.4**, ci-dessous), puis l'apoptose a été induite avec l'A23187 pendant 20h supplémentaires. Les huit métaux testés sont : quatre métaux de transition (Cu, Fe, Mn et Zn), un métal post-transition (Al), deux métaux alcalino-terreux (Ca et Mg), et un métal lourd (Pb).

Pour rappel : **Tableau II.4 : Composés métalliques des PM de 2003 et doses utilisés dans les expériences.**

Métaux	Total	Cu	Fe	Mn	Zn	Al	Ca	Mg	Pb
PM-AW (mg/g) ^a	67.36	0.86	13.20	0.16	1.50	3.40	19.50	1.60	0.25
Dose utilisée dans les expériences (ng/ml) ^b		43	660	8	75	170	975	80	12.5
PM-AS (mg/g) ^c	106.68	1.23	26.3	0.37	1.7	10.5	36.2	3.6	0.42
Dose utilisée dans les expériences (ng/ml) ^b		61.5	1315	ND	85	525	ND	ND	ND
PM-VW (mg/g) ^d	120.29	0.37	13.5	0.42	1.3	10.4	59.6	4.3	0.52
Dose utilisée dans les expériences (ng/ml) ^b		18.5	675	ND	65	520	ND	ND	ND
PM-VS (mg/g) ^a	193.26	0.40	21.6	0.54	1.30	20.40	110.6	6.7	0.43
Dose utilisée dans les expériences (ng/ml) ^b		20	1080	27	65	1020	5530	335	21.5

^a D'après *Baulig et al. 2004*, ^b équivalent à 10 µg/cm² ou 50 µg/ml de PM, ^c D'après *Rumelhard et al. 2007a*, ^d D'après *Rumelhard et al. 2007b*, ND: pas de données.

Brièvement, les résultats montrent que sept des huit métaux testés (Cu, Fe, Mn, Al, Ca, Mg et Pb) ont un effet protecteur contre l'apoptose induite par A23187 lorsqu'ils sont utilisés à la concentration trouvée dans 10 µg/cm² des particules anti-apoptotiques PM-AW (**Figure III.13**). Inversement, ces mêmes métaux n'ont pas d'effet protecteur lorsqu'ils sont utilisés à la concentration trouvée dans 10 µg/cm² des particules non-anti-apoptotiques PM-VS, excepté dans le cas du Mg(II) et du Pb(II). Contrairement aux métaux cités précédemment, le Zn(II) n'a pas d'effet protecteur à la concentration trouvée dans 10 µg/cm² de PM-AW, ceci en relation avec la quantité similaire retrouvée adsorbée sur les PM-AW et les PM-VS (voir **Tableau II.4** ci-dessus). La concentration en métaux semble donc jouer un rôle primordial dans l'effet anti-apoptotique des PM.

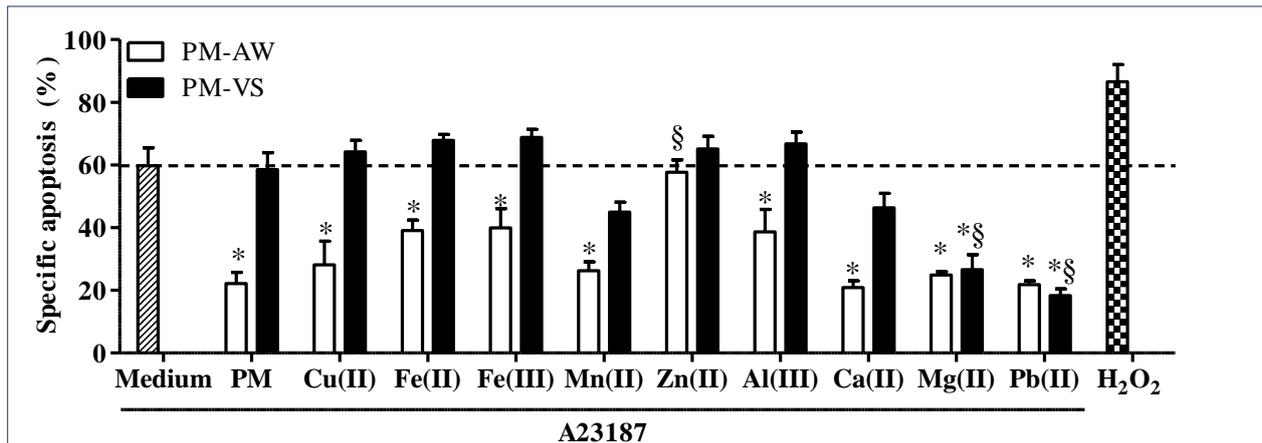


Figure III.13: Effet anti-apoptotique des composés métalliques des PM. Les cellules 16HBE ont été exposées pendant 4h aux métaux Al(III), Cu(II), Fe(II), Fe(III), Zn(II), Ca(II), Mg(II), Mn(II) et Pb(II) aux concentrations trouvées dans 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (soit 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) des particules PM-AW (anti-apoptotiques) ou PM-VS (non anti-apoptotiques), puis l'apoptose a été induite par le A23 (3 μM) pendant 20h supplémentaires. L'inhibition spécifique de l'apoptose induite par A23 a été déterminée par cytométrie en flux grâce à un double marquage : au DiOC6(3) pour la chute du potentiel transmembranaire mitochondrial et au HE pour la production d'anion superoxyde. Les résultats sont la moyenne \pm SEM de quatre expériences distinctes. * traité vs. control A23 seul ($p < 0.05$), \$ métaux vs. PM ($p < 0.001$).

L'implication du fer a été analysée grâce à l'utilisation du chélateur de fer, déféroxamine (DFO, 200 μM). Bien que ce composé augmente l'apoptose induite par A23187 d'environ 23%, il prévient l'effet anti-apoptotique conféré par les PM-AW entières ou par Fe(II) (**Figure III.14 A**). Ces résultats suggèrent que les composés ferreux contribuent activement à l'effet anti-apoptotique des PM.

Par la suite, nous avons concentré nos recherches sur le fer, pour lequel la différence de concentration entre les lots PM-AW et PM-VS est suffisamment importante (**Tableau II.4**). Nous avons réalisé un effet-dose du Fe(II) sur l'inhibition de l'apoptose induite par A23187 afin de déterminer la quantité de Fe(II) capable de mimer l'effet anti-apoptotique des particules entières (**Figure III.14 B**). Ainsi, le fer inhibe significativement l'apoptose induite par A23187 pour des concentrations comprises entre 500 et 750 ng/ml, avec un effet maximal observé pour la concentration en Fe(II) équivalente à 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de PM-AW. A contrario, la concentration en Fe(II) équivalente à 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de PM-VS n'a aucun effet protecteur ce qui confirme notre hypothèse concernant le rôle prépondérant de la concentration en composés métalliques dans l'effet anti-apoptotique des PM.

Les composés métalliques (dont le fer) sont impliqués dans l'effet anti-apoptotique des PM; et une concentration maximale semble requise.

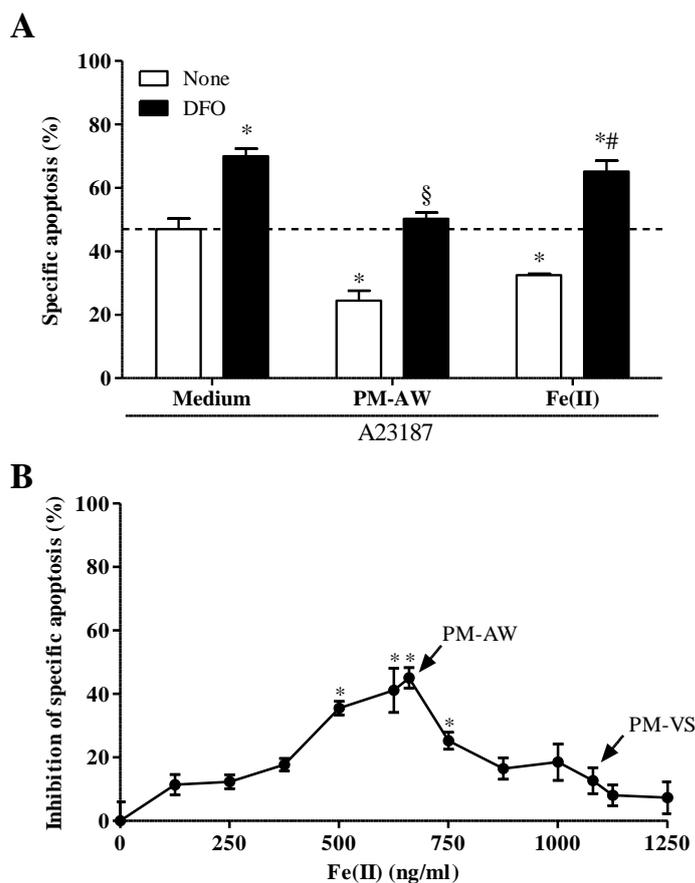


Figure III.14 : Effet anti-apoptotique des composés ferreux des PM. (A) Effet de la déféroxamine. Les cellules 16HBE ont été incubées en présence ou en absence de déféroxamine (DFO, 200 μ M) pendant 4 heures en même temps que l'exposition aux PM-AW (10 μ g/cm²) ou Fe(II) (660 ng/ml, qsp 10 μ g/cm² de PM-AW) suivie par l'induction de l'apoptose par A23187 (3 μ M) pendant 20 heures supplémentaires. L'apoptose spécifique a été déterminée par cytométrie en flux pour les paramètres de la chute du $\Delta\Psi_m$ (DiOC6(3)) et de la perméabilisation de la membrane plasmique (IP). Les résultats sont des moyennes \pm SEM (n = 4). * p<0.05 vs A23187 seul, [§] p<0.01 vs A23187+DFO et # p<0.5 vs A23187 + PM-AW+DFO. **B)** Étude effet-dose de l'effet anti-apoptotique de Fe (II). Les cellules 16HBE ont été exposées 4 heures au Fe (II) à différentes doses (0 à 1250 ng/ml) avant l'induction de l'apoptose par

A23187 (3 μ M). Les concentrations de Fe (II) absorbées sur 10 μ g/cm² de PM-AW (anti-apoptotique) et PM-VS (non-anti-apoptotique) sont mises en évidence par des flèches. L'inhibition de l'apoptose spécifique a été mesurée par cytométrie en flux par un double marquage au DiOC6(3) et à l'IP. Les données sont la moyenne \pm SEM de 3 expériences différentes * traité vs. A23187 seul, p <0.01. (voir **Article chapitre IV**)

III.2.2.v) Discussion

Bien que le rôle du paramètre de taille des PM doit encore être approfondi, nous avons montré que la composition des PM joue un rôle primordial dans leur l'effet anti-apoptotique, plus spécifiquement les HAP particulières (**Tableau III.2**) et certains métaux, tels que des métaux de transition (Cu, Fe, Mn, Fe) ou post-transition (Al), des métaux alcalino-terreux (Ca et Mg) ou un métal lourd (Pb) (**Figure III.13**).

Des tests de corrélations entre la composition chimique et l'inhibition de l'apoptose par les différentes PM, ont permis de faire l'hypothèse que l'effet anti-apoptotique des PM pourrait être conditionné par une concentration minimale en HAP lourds adsorbés sur les PM (46 μ g/g, **Figure III.11 C**) mais également par une concentration maximale en métaux de transition (21.5 mg/g, **Figure III.12 B**) et alcalins/alcalino-terreux (123 mg/g, **Figure III.12 C**). En accord avec ces analyses de corrélation, nous avons montré que 3 métaux de transition (Cu, Fe et Mn), un métal post-transition (Al) et un métal alcalino-terreux (Ca) présentent un effet cytoprotecteur en lien avec leur concentration spécifique dans les PM-AW anti-apoptotiques (**Figure III.13**).

Jusqu'à aujourd'hui, de nombreuses études ont mis en évidence la toxicité des particules atmosphériques *via* l'induction de la mort cellulaire, d'un stress oxydant, et d'une réponse pro-inflammatoire (*Upadhyay et al. 2003; Agopyan et al. 2004; Dagher et al. 2006; Zhang et al. 2007; Chuang et al. 2013*). Néanmoins, plusieurs études ont rapporté les effets cytoprotecteurs des composés organiques de PM comme les HAP (*Teranishi et al. 2010*) ou de leur métabolites (*Burdick et al. 2006; Hung et al. 2007; Teranishi et al. 2010*), la 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine (TCDD) (*Chopra et al. 2009*), des PCB non-dioxine (*Al-Anati et al. 2010*), ou les particules Diesel (*Bayram et al. 2006*). Les mécanismes exacts ne sont pas entièrement compris, mais des études *in vitro* ont montré la nécessité des synthèses protéiques (*Chopra et al. 2010*) dont l'augmentation des protéines IAP1, IAP2 et Survivine associée à la diminution de XIAP et Caspase-3 (*Hung et al. 2007*), la modulation de la protéine p53 (*Al-Anati et al. 2010; Mukherjee et al. 2011*), et l'activation du récepteur Ah (*Ferecatu et al. 2010*). De plus, nos résultats montrent que le BaP mime le plus efficacement l'effet anti-apoptotique des PM-AW en accord avec les travaux montrant que son métabolite BPDE (anti-7,8-dihydrodiol-9,10-époxy-benzo[a] pyrène) est également capable de supprimer l'apoptose des cellules épithéliales mammaires (*Burdick et al. 2006*).

De même, bien que les métaux et les HAP sont connus pour être des composés chimiques cytotoxiques (*Manzl et al. 2004; van Grevenynghe et al. 2004; Gobe et al. 2010; Orrenius et al. 2011*), quelques études suggéraient que certains métaux tels que le lithium (*Luo 2010*), le fer, le cuivre (*Wang, Q. et al. 2007; Yu, J.W. et al. 2010*) et le zinc pouvaient avoir un effet cytoprotecteur. Parmi les composés particuliers hydrosolubles, Zn est déjà connu pour inhiber l'apoptose et minimiser le stress oxydant (par exemple la peroxydation lipidique, *Carter et al. 2002; Truong-Tran et al. 2001*) par un processus qui stabilise directement les lipides et les protéines membranaires ou indirectement par le maintien des niveaux de glutathion (*Szuster-Ciesielska et al. 2008*). L'effet protecteur de Zn a également été lié à l'inhibition de l'activation des caspases -8, -9 et -3 (*Hao et al. 2013*). Cependant dans notre étude, Zn est le seul métal dénué d'effet anti-apoptotique, en opposition avec les publications montrant une protection contre l'apoptose provoquée par de nombreux inducteurs, probablement en raison de la faible concentration utilisée ici: environ 0,55 μM tandis que l'effet cytoprotecteur du zinc a été signalée au-delà de 10 μM (*An et al. 2005; Kontargiris et al. 2012*).

III.3) CONCLUSION

Dans le cadre du projet MEGATOX, cette étude nous a permis, de montrer que la cytotoxicité de certaines particules atmosphériques (TR6, OB4, OP5, OP6) pourrait être liée à la taille mais également à la concentration des PM. Il ressort que les particules fines et ultrafines sont plus réactives concernant l'induction des cytokines pro-inflammatoires. Enfin, les résultats étant très contrastés au sein des prélèvements de mêmes lieux, il est possible que la cytotoxicité soit liée à la composition des PM, mais, à ce jour, les analyses chimiques des différents lots de particules ne nous permettent pas d'établir un lien entre la composition de ces PM et leurs effets cytotoxiques.

D'autre part, nous avons montré que les particules PM_{2.5} de 2003 ne sont pas cytotoxiques mais au contraire ont un effet anti-apoptotique dans les cellules épithéliales bronchiques humaines. La composition chimique des particules semble être un caractère déterminant de leur effet anti-apoptotique puisqu'une concentration minimale en HAP lourds ainsi qu'une concentration maximale en métaux de transition et alcalins/alcalino-terreux semblent requises.

A notre connaissance, ce travail est la première étude présentant des preuves que de faibles concentrations de PM (10 µg/cm²) ont un effet anti-apoptotique sur les cellules épithéliales bronchiques humaines en lien avec leurs composants métalliques et organiques adsorbés en concentrations précises.

IV. RÉSULTATS : MÉCANISMES MOLÉCULAIRES

IMPLIQUÉS DANS L'EFFET ANTI-APOPTOTIQUE

DES PARTICULES

IV.1) Contexte de l'étude	104
IV.2) Rôle de la voie anti-oxydante Nrf2 dans le mécanisme anti-apoptotique induit par les composés particulaires métalliques	105
IV.2.1) Résumé	105
IV.2.3) Article soumis.....	106
IV.2.3) Résultat supplémentaire & Discussion	153
IV.3) Résultats supplémentaires.....	159
IV.2.1) Rôle du calcium dans l'effet anti-apoptotique.....	159
IV.2.2) Interaction particules / cytosquelette	161
IV.2.2) Discussion.....	167
IV.4) Conclusion	169

IV.1) CONTEXTE DE L'ETUDE

Les résultats précédents ont démontré que les particules fines atmosphériques parisiennes de 2003 ont un effet anti-apoptotique sur les cellules épithéliales bronchiques humaines. Cet effet cytoprotecteur est associé à la composition chimique des PM, et en particulier aux HAP particulaires de plus de 5 cycles benzéniques ainsi qu'aux composés métalliques, notamment les métaux de transition (voir **Chapitre III**).

Nous savons que certains HAP sont considérés comme des « carcinogènes certains » (par exemple le benzo(a)pyrène), « carcinogènes probables » (comme le dibenzo(a,h)anthracène) ou « carcinogènes possibles » (tel que le benzo(k)Fluoranthène) pour l'Homme. Pour mieux comprendre le rôle des HAP et des métaux dans l'effet anti-apoptotique, nous avons cherché les mécanismes impliqués dans l'acquisition de la résistance à l'apoptose provoquée par ces composés. Dans une première étude réalisée au laboratoire, nous avons démontré que les HAP agissent *via* leur récepteur spécifique le AhR (Aryl hydrocarbon Receptor) pour induire l'effet anti-apoptotique, probablement en régulant l'expression de certains gènes de régulation de l'apoptose (*Ferecatu et al. 2010, Annexe 1*).

De plus, les nombreux métaux absorbés sur les PM peuvent affecter la santé humaine, notamment lorsqu'ils entrent en compétition avec les éléments essentiels à de nombreux processus cellulaires (comme les processus enzymatiques). Ce sont également des inducteurs puissants de stress oxydant cellulaire et certains sont considérés comme carcinogènes (ex : As, Cd, Cr, Ni, pour revue voir § I.4.2, *Andreau et al. 2012*).

Dans ce chapitre, nous avons cherché à décrypter les mécanismes moléculaires anti-apoptotiques induits par les métaux, dans les cellules 16HBE, dans la perspective que leur compréhension puisse fournir des indices expliquant le développement des cancers du poumon au cours d'expositions à long terme à de faibles concentrations en particules.

Cette étude fait l'objet d'un article soumis :

"Urban fine PM and their metallic compounds protect human bronchial epithelial cells from apoptosis: Role of Nrf2"

Melanie Lovera-Leroux, Belinda Crobeddu, Nadim Kassis, Armelle Baeza-Squiban
and Karine Andreau

IV.2) RÔLE DE LA VOIE ANTI-OXYDANTE NRF2 DANS LE MÉCANISME ANTI-APOPTOTIQUE INDUIT PAR LES COMPOSÉS PARTICULAIRES MÉTALLIQUES

IV.2.1) Résumé

Cet article est structuré en trois parties :

1- Tout d'abord nous avons démontré le **rôle des composés métalliques dans l'effet anti-apoptotique des PM_{2.5}** (Article: Figures 1, 2, S1 et S3, partie résumée dans le Chapitre III de ce manuscrit).

2- Sachant que les métaux sont de forts inducteurs de stress oxydant dans la cellule (*Manzl et al. 2004; Rana 2008; Gobe et al. 2010*), et que les espèces réactives de l'oxygène (ROS) peuvent être des régulateurs de l'apoptose (*Orrenius et al. 2011; Sinha et al. 2013*), nous nous sommes intéressés à la réponse adaptative anti-oxydante des cellules. En se basant sur ces connaissances et sur le modèle de la réponse hiérarchique au stress oxydant (*Li, N. et al. 2003a; Andreau et al. 2012*), **nous avons fait l'hypothèse que des quantités précises de métaux, peuvent induire une réponse anti-oxydante de faible intensité, qui pourrait être impliquée dans le processus anti-apoptotique.**

Nous avons démontré, par la méthode du test DTT, que les particules PM_{2.5} ainsi que les métaux ont une capacité oxydante intrinsèque, en accord avec données de la littérature (*Li, N. et al. 2003b; Cho et al. 2005; Koike et al. 2006; Biswas et al. 2009; Charrier et al. 2012*). Ensuite, par cytométrie en flux et dosage du glutathion, nous avons montré qu'une augmentation du contenu cellulaire en glutathion est impliquée dans l'effet anti-apoptotique induit par les PM_{2.5} et par le Fe(II) (Article : Figure 4 et 5). Ces résultats sont en accord avec les données scientifiques démontrant que les PM ainsi que leurs composés peuvent déclencher une production de H₂O₂ (*DiStefano et al. 2009; Shen et al. 2012*) et une augmentation du contenu cellulaire en GSH (*Garcon et al. 2001; Michael et al. 2013*). Nous avons donc supposé que **les PM peuvent induire la production d'ERO, impliqués dans une signalisation redox conduisant à une réponse anti-oxydante caractérisée par l'augmentation de la synthèse du glutathion.**

3- Enfin, nous nous sommes intéressés de plus près à la voie de signalisation Nrf2 qui est connue pour être impliquée dans la transcription de nombreux gènes anti-oxydants et du métabolisme des xénobiotiques tels que Nrf2 lui-même, GPx (« Glutathion peroxydase »), HO-1 (« Heme oxygenase 1 »), GST (« Glutathion S-transférase »), NQO1 (« NADPH Quinone Oxidoreductase 1 »), MRP (« Multidrug Resistance-associated Protein »), etc. (*Rubio et al. 2010*).

Par immunofluorescence, nous avons démontré la **translocation nucléaire de Nrf2 induite par les particules PM-AW et le Fe(II), ainsi que la transcription de ses gènes cibles GPx, HO-1 et NQO1**, démontrée par RT-qPCR (Article : Figure 6). Ces résultats sont en accord avec les publications, montrant une surexpression de HO-1 et NQO1 après des expositions similaires dans la lignée cellulaire alvéolaire A549 (*Deng et al. 2013*) et dans les cellules épithéliales bronchiques humaines immortalisées BEAS-2B (*Diabate et al. 2011*).

IV.2.3) Article soumis

1 **Urban fine PM and their metallic compounds inhibit apoptosis in human bronchial**
2 **epithelial cells: Role of Nrf2**

3

4 Melanie Lovera-Leroux¹, Belinda Crobeddu¹, Nadim Kassis¹, Armelle Baeza-Squiban¹ and
5 Karine Andreau¹

6

7 ¹Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Unit of Functional and Adaptive Biology
8 (BFA) CNRS UMR 8251, Paris 75 013, France

9

10 Corresponding author: Dr Karine Andreau

11 Tel : +33 1 57 27 83 66

12 Fax : +33 1 57 27 83 29

13 e-mail : karine.andreau@univ-paris-diderot.fr

14 email-addresses:

15 MLL: melanie.leroux@paris7.jussieu.fr

16 BC: belinda.crobeddu@univ-paris-diderot.fr

17 NK: kassis@univ-paris-diderot.fr

18 ABS: baeza@univ-paris-diderot.fr

19 KA: karine.andreau@univ-paris-diderot.fr

20

21 **Short title:** Anti-apoptotic effect of PM and their metallic compounds *via* Nrf2 pathway

22 **Keywords:** Airborne particles, metals, cell death, oxidative stress, respiratory cells, A23187

23

1 **Abstract**

2 ***Background:***

3 Recent classification of outdoor air pollution as carcinogenic for humans has strengthened the
4 increasing concern about particulate matter (PM) in urban areas with high population
5 densities and industrial activities. A resistance to apoptotic cell death is a hallmark of cancer
6 and we previously demonstrated that urban fine PM exposure produces an anti-apoptotic
7 effect in cells. The current study sought to identify metallic compounds of PM contributing to
8 this anti-apoptotic activity and to decipher the involved molecular mechanisms, with an
9 emphasis on oxidative stress.

10 ***Methods:***

11 Human bronchial epithelial (16HBE) cells were exposed for 4 hours to different samples of
12 PM—i.e., with established anti-apoptotic effect (e.g., PM-AW) or not (e.g., PM-VS)—or to
13 individual metallic components (Cu, Fe, Mn, Zn, Al, Ca, Mg, and Pb compounds). Apoptosis
14 was then induced by the calcium ionophore A23187. Flow cytometry was used to assess
15 mitochondrial transmembrane potential, superoxide anion production, and plasma membrane
16 permeabilization in those cells. Immunostaining and real-time PCR were used to assess
17 protein localization and gene expression, respectively, in the Nrf2 antioxidant response.

18 ***Results:***

19 Among metallic components, iron, copper, and aluminium selectively reduced apoptosis in a
20 dose-dependent manner (amounts found in the anti-apoptotic particles PM-AW) and based on
21 their intrinsic oxidative potential assessed by the dithiothreitol oxidation method. Early
22 activation of Nrf2 followed by upregulation of itself and its target genes HO1, NQO1, and
23 GPx1 was found following PM-AW, Fe(II), and Cu(II) exposures. Glutathione levels were
24 maintained in cells exposed to anti-apoptotic particles PM-AW and Fe(II) compound.

25 ***Conclusions:***

1 These results suggest that the antioxidant cellular response contributes to the anti-apoptotic
2 effect triggered by fine PM exposure and accurate amounts of metallic components,
3 particularly Fe(II) and Cu(II), contribute to this effect. Combined with our previous
4 observations, the anti-apoptotic effect may be mediated through both Nrf2 and polycyclic
5 aromatic hydrocarbon (PAH)-aryl hydrocarbon receptor (AhR) signaling pathways. These
6 findings of the cellular and molecular impacts of atmospheric particles in inhibiting cell death
7 can provide clues for the understanding of lung cancer formation following long-term
8 exposures.

1 **Background**

2 Air pollution, especially particulate matter (PM), generates health concerns—
3 particularly in urban areas with high population densities and industrial activities—because
4 of the increased risk of cardiorespiratory mortality and morbidity [1], lung cancers [2], and
5 reduced life expectancy [3] resulting from exposure. These deleterious effects are mainly
6 related to the smallest particles, which are able to reach the bronchi and alveoli and
7 accumulate in tissue and lung cells [4], lead to respiratory and systemic inflammation through
8 increased reactive oxygen species (ROS) production [5-6]. These airborne particles, termed
9 PM₁₀, PM_{2.5}, and PM_{0.1}, have aerodynamic diameters equal to or less than 10, 2.5, and 0.1
10 microns, respectively. Recently, the large-scale European Study of Cohorts for Air Pollution
11 Effects (ESCAPE) showed a statistically significant association between PM₁₀ and PM_{2.5}
12 exposures and risk of lung cancer, in particular adenocarcinoma [7]. Similar data from more
13 than one thousand epidemiological studies conducted in Europe, North and South America,
14 and Asia, prompted the International Agency for Research on Cancer (IARC), on October 17,
15 2013, to classify outdoor air pollution and PM as human carcinogens (Group 1) [8].

16 Carcinogenesis, the multistep process that leads to cell transformation, includes
17 initiation, promotion and tumor progression. It results in the development of a primary tumor
18 with the assistance of the surrounding stroma and, eventually, the spread of cancer to
19 secondary sites through metastasis. The hallmarks of cancer comprise ten biological
20 capabilities acquired during this multistep development of human tumors, including increased
21 inflammatory response and resistance to apoptotic cell death [9-10]. Apoptosis is defined by
22 specific morphological alterations [11] as well as by exposure of phosphatidylserine (PS) and
23 permeabilization of plasma and organelle membranes [12]. These latter features arise from
24 activation of caspases, which can be elicited by two distinct mechanisms: the extrinsic
25 pathway involving transmembrane death receptors, or the intrinsic pathway that converges on

1 the permeabilization of mitochondrial membranes (MMP). MMP is the checkpoint of the
2 apoptotic process characterized by a decrease in mitochondrial transmembrane potential
3 ($\Delta\Psi_m$), mitochondrial production of ROS, and release of Cytochrome *c* [13]. Importantly,
4 these phenomena can be affected by exposure to PM. Studies of apoptosis performed *in vivo*
5 in rodents [14] or *in vitro* on human bronchial epithelial cell lines [15-17] following exposure
6 to PM or its components [18] highlighted induction of apoptosis as characterized by oxidative
7 stress, decreased $\Delta\Psi_m$, Caspase-9 activation, and DNA fragmentation [14, 16-17, 19-20].

8 The effect on apoptosis has been attributed to particular components of PM. The
9 urban aerosol contains PM_{2.5} and PM_{0.1} [21], which consist of a core of elemental carbon that
10 adsorbs some inorganic components (ammonium, chloride, sulfates, nitrates, and metals) [5]
11 and organic compounds such as alkan, alkanolic acid, aliphatic acid, quinone, polycyclic
12 aromatic hydrocarbons (PAH), and biological species. PM-induced apoptosis has often been
13 attributed to various organic components such as PAH [19] through activation of the aryl
14 hydrocarbon receptor (AhR) [21-22]. Heavy and transition metals adsorbed on PM also
15 promote apoptosis *via* ROS generation, mitochondrial dysfunction, activation of caspases, or
16 downregulation of anti-apoptotic Bcl-2 proteins [23-24].

17 Most experiments showing PM-induced apoptosis were performed with high doses of
18 particles corresponding to periods of high pollution [22]. In contrast, we considered more
19 realistic exposure levels and analyzed exposure to PM_{2.5} at low concentrations (from 5 to 50
20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$). We previously showed that exposure to PM samples collected from Paris prevents
21 apoptosis in human bronchial epithelial cells treated with three broad-spectrum apoptosis
22 inducers (A23187, staurosporine, and oligomycin) [25]. Indeed, the anti-apoptotic effect of
23 PM is related to its chemical composition: we demonstrated that exposure to certain particle
24 samples (PM-AW, PM-AS, and PM-VW) inhibits apoptosis while exposure to one
25 chemically-distinct batch (PM-VS) is does not. By relying on this observation, we found that

1 the anti-apoptotic effect of PM-AW is linked to PAH, particularly to benzo[a]pyrene (BaP),
2 *via* activation of AhR [25].

3 PAH and metallic compounds are notorious effectors of cellular exposure to PM,
4 causing oxidative stress and activation of the ROS-sensitive transcription factor Nrf2 (or
5 NFE2L2, Nuclear factor E2-related factor 2) [26-27]. Under basal conditions, Nrf2 is
6 sequestered in the cytoplasm by its interaction with two Keap1 (Kelch-like ECH-associated
7 protein 1) molecules, which facilitates its ubiquitination and proteasomal degradation. Under
8 oxidative conditions, inducers alter Keap1 cysteine residues preventing its interaction with
9 Nrf2 [28]. Nrf2 then becomes phosphorylated, translocates to the nucleus, and binds to
10 antioxidant response elements (ARE) localized in the promoter region of antioxidant, phase II
11 detoxifying enzymes and cytoprotective proteins such as heme oxygenase-1 (HO-1),
12 NAD(P)H-quinone oxidoreductase 1 (NQO1), glutathione S-transferases (GSTs), γ -
13 glutamylcysteinyl synthetase, glutathione peroxidases (GPx), and itself [29]. Given our
14 previous work in identifying the anti-apoptotic effect of PM through the PAH-AhR pathway,
15 and the activation of Nrf2 by PAH [26], here the aim of this work was to identify metallic
16 compounds present on urban fine PM that contribute to its anti-apoptotic activity and to
17 uncover molecular mechanisms exerting this effect, with particular focus on ROS production,
18 Nrf2 activation and glutathione homeostasis. We demonstrate that metallic compounds of
19 PM, particularly iron and copper, maintain GSH levels, activate Nrf2 and upregulate
20 expression of its target genes.

21

1 **Results**

2 ***Metallic compounds of PM are involved in their anti-apoptotic effect***

3 To identify metallic compounds of PM specifically involved in inhibiting apoptosis
4 induced by A23187 treatment, human 16HBE bronchial epithelial cells were exposed for 4 h
5 with whole PM, four transition metals (Cu, Fe, Mn, and Zn), one post-transition metal (Al),
6 two alkaline earth metals (Ca and Mg), and one heavy metal (Pb) at the same concentrations
7 found in 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (i.e., 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) of either PM-AW (anti-apoptotic) or PM-VS (non-anti-
8 apoptotic) (**Figure 1**; see Methods for description of PM samples). Apoptosis triggered by
9 A23187 treatment (3 μM) was quantified by flow cytometry using loss of $\Delta\Psi\text{m}$ (DiOC6(3)
10 low staining) and production of superoxide anion (HE high staining) as recommended by the
11 Nomenclature Committee on Cell Death [12]. With the exception of Zn, exposure to metallic
12 components, at concentrations found in 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ of PM-AW, reduced A23187-induced
13 apoptosis at a magnitude similar to that of exposure to whole PM. In contrast, when metallic
14 compounds (except Mg and Pb) were introduced at doses found in 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ of PM lacking
15 an anti-apoptotic effect (i.e., PM-VS), apoptosis was induced at rates similar to A23187 alone
16 (**Figure 1**). Further, exposure to copper in solution as chloride or sulfate salts reduced
17 apoptosis to a similar extent, suggesting that the salt type used in these experiments is not
18 relevant in the anti-apoptotic effect (**Additional file 1 A**). Moreover, metallic compounds
19 were not cytotoxic to 16HBE cells after a 24-h exposure (**Additional file 1 B**).

20 These findings suggest that metallic compounds, particularly Fe, Cu, and Al, may
21 contribute to the anti-apoptotic effect of PM-AW and do so in a dose-dependent manner. To
22 test this hypothesis, cells were exposed to PM-AW or Fe(II) (660 ng/mL) along with the iron
23 chelator deferoxamine (DFO, 200 μM) (**Figure 2A**). Interestingly, the use of DFO did not
24 modify the rate of spontaneous apoptosis (data not shown) but rather enhanced by 23% the
25 specific apoptosis induced by A23187. DFO blocked the anti-apoptotic effect of Fe (II) and

7

1 PM-AW of complete and partial way, respectively. We continued to investigate iron because
2 the difference in its concentrations in PM-AW and PM-VS is sufficiently large (**Table 1**). For
3 this, we performed a dose-effect study of Fe(II) on inhibition of A23187-induced apoptosis to
4 determine the dose(s) of Fe(II) capable to mimic the anti-apoptotic effect of whole particles
5 (**Figure 2B**). Inhibition of apoptosis by Fe(II) resulted in a Gaussian-type curve, with
6 statistical significance for doses from 500 to 750 ng/mL, corresponding well to the dose
7 adsorbed on 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ PM-AW (660 ng/mL). Unsurprisingly, Fe(II) dose equivalent to PM-
8 VS (1080 ng/mL) did not prevent apoptosis. Thus, the concentration of metallic compounds
9 is an important consideration in the anti-apoptotic effect conferred by urban PM.

10

11 ***Oxidative potential of PM and their metallic compounds***

12 Numerous *in vitro* studies demonstrate the modulation of apoptosis by air pollutants,
13 including metals, in relation to their ability to produce ROS [23, 30-31]. We therefore
14 assessed the intrinsic oxidative potential of PM and its metallic components using
15 dithiothreitol (DTT) oxidation. Increasing concentrations of PM (0-16 μg) were incubated 30
16 minutes with unoxidized DTT, and the remaining concentration was determined; H_2O_2 was
17 used as a positive control (**Figure 3A**). All PM oxidized DTT in a dose-dependent manner
18 with a similar effect for PM-AW, PM-VW, and PM-VS samples; the lowest observed effect
19 level (LOEL) was 8 μg and the half-maximal effective concentrations (EC50) were 11.7 μg ,
20 13.9 μg , and 12.2 μg , respectively. Note that PM-AS showed the most oxidative capacity,
21 with LOEL of 1.6 μg and EC50 of 6.4 μg (**Figure 3A**) and a rate of DTT loss of 21.07 ± 1.02
22 $\mu\text{M}/\mu\text{g}$ (**Figure 3B**). We also observed a significant rate of DTT loss with Cu(II) and Fe(II)
23 in doses found in samples of PM having anti-apoptotic activity (i.e., PM-AW, PM-AS, and
24 PM-VW); in contrast, Fe(III) and Zn(II) were ineffective (**Figure 3B**). Negative values
25 observed for Al(III) indicated an aluminium-mediated stabilization of DTT toward oxidation.

8

1 Pearson correlation analysis was used to determine the link between the intrinsic
2 oxidative potential of PM-AW or metals and their ability to inhibit apoptosis in 16HBE cells
3 (**Table 2**). A positive correlation was calculated between DTT oxidation potential of whole
4 PM-AW, Cu(II), and Fe(II) and their ability to inhibit apoptotic features *in cellulo*. Note the
5 negative correlation for Al(III) in agreement with its preventing effect on DTT oxidation. No
6 correlations were found for PM-VS or its metallic components. This suggests that, after
7 desorption from PM-AW, iron and copper might prevent apoptosis through their ability to
8 generate ROS and to modify the cellular redox homeostasis. This assumption is strengthened
9 by the dose-response study of H₂O₂ performed against A23187-induced apoptosis,
10 demonstrating that only the low doses of hydrogen peroxide (i.e., 10 to 50 μM) reduced
11 A23187-induced apoptosis to a similar extent to those of entire PM-AW or Fe(II)
12 components (**Additional file 2**).

13

14 ***Role of the cellular antioxidant response***

15 Given that small amounts of Fe(II) mimicked the anti-apoptotic effect of PM, and
16 considering the model of hierarchical oxidative stress response [32], we hypothesized that
17 transition metals, at low amounts, might trigger an adaptive antioxidant response that may be
18 involved in the establishment of an anti-apoptotic process. To confirm this, cells were treated
19 with different antioxidants—the specific hydroxyl radical scavenger (D-mannitol), the
20 superoxide dismutase mimetic and peroxynitrite scavenger (MnTBAP), reduced glutathione
21 (GSH), as well as oxidized glutathione (GSSG)—during PM-AW (10 μg/cm²) exposure and
22 before induction of apoptosis. Antioxidants did not modify apoptosis triggered by A23187
23 alone (**Figure 4A**). Nevertheless, in the presence of PM-AW, GSH was the only antioxidant
24 that further prevented the loss of ΔΨ_m and superoxide anion production, suggesting that
25 GSH may act in synergy with PM. The GSH dose-effect study revealed a dose-dependent

9

1 increase of the anti-apoptotic effect of PM-AW, with a linear correlation coefficient of 0.99
2 (**Figure 4B**). Thus, GSH and a cellular response of antioxidant kind may represent the
3 molecular mechanism by which PM produce an anti-apoptotic effect. Furthermore, the
4 depletion in total glutathione levels observed during A23187-induced apoptosis was
5 prevented when 16HBE cells were pre-treated for 4 h with 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ PM-AW or an
6 equivalent amount of Fe(II) (**Figure 5**). This effect on total glutathione cellular content was
7 specific to anti-apoptotic PM-AW since it was not found in the presence of non-anti-
8 apoptotic PM-VS. These findings evoke a key role of GSH in the anti-apoptotic effect
9 induced by urban airborne particles.

10

11 ***Role of Nrf2 activation pathway***

12 To decipher the molecular mechanisms involved in the anti-apoptotic effect of PM,
13 we studied Nrf2, a prominent contributor to the antioxidant response, by examining its
14 localization by confocal microscopy (**Figure 6A**). Nrf2 was localized mainly in the
15 cytoplasm of untreated cells. Exposure to PM-AW (10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) for 4 h resulted in nuclear
16 localization of Nrf2, indicating that this transcription factor was activated under these
17 conditions. A similar result was observed following Fe(II) at concentration found in 10
18 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ of PM-AW, while non-antiapoptotic PM-VS seemed unable to activate Nrf2. Nrf2
19 activation occurred rapidly after 30 min exposure to PM-AW, but more slowly (4 h)
20 following Fe(II) exposure (**Figure 6B**). These results suggest that activation of Nrf2 might be
21 a decisive molecular step in the anti-apoptotic effect of urban fine PM.

22 Given that Nrf2 adjusts its own expression and is regulated through proteasomal
23 degradation, we analyzed the mRNA expression of Nrf2 and some of its antioxidant and
24 detoxifying target genes: HO1, NQO1, SOD2 (the inducible mitochondrial Mn-SOD),
25 cytosolic GSTP1, and GPx1. First, we attempted to determine if PM-AW as well as its Fe(II)

10

1 and Cu(II) compounds, modify the expression of these genes (**Figure 7**). Nrf2, HO1, and
2 NQO1 mRNA expression levels increased after a 3-h exposure to PM-AW, and 30 min in the
3 case of GPx1 (**Figure 7A**). In addition, exposure to iron and copper compounds also
4 upregulated expression of Nrf2, HO1, and NQO1 to a similar extent as observed for whole
5 particles (**Figure 7B and C**), suggesting that Fe(II) and Cu(II) contribute to Nrf2 activation.
6 Furthermore, SOD2 and GSTP1 levels were not modulated by PM-AW, iron, or copper. Note
7 that Fe(II) and Cu(II) exposure upregulated gene expressions later than did PM-AW; this
8 observation probably reflects differences due to individual exposures compared to mixed
9 exposures done with entire particles. The exposure times leading to mRNA overexpressions
10 were consistent with the minimal duration of pre-treatment by PM-AW required to observe
11 their anti-apoptotic effect (**Additional file 3**). Indeed, a 1-h pre-treatment with PM-AW was
12 required and a maximal effect was seen for 4-h exposure, suggesting that 16HBE cells might
13 need to synthesize antioxidant and detoxifying enzymes for the establishment of the anti-
14 apoptotic effect triggered by PM and metallic compounds. Finally, we investigated whether
15 the upregulation of antioxidant genes was altered during the early phase of A23187-induced
16 apoptosis (**Figure 8**). Upregulation of Nrf2, HO1, NQO1, and GPx1 triggered by PM-AW
17 and Fe(II) was not altered by the addition of A23187 (15 min to 2 hours) in accordance with
18 the lack of regulation of those genes by A23187 alone (**Additional file 4**). Thus, PM-AW and
19 its metallic compounds, especially iron, may condition 16HBE cells by activating and
20 upregulating the ROS-sensitive transcription factor Nrf2 and some of its antioxidant target
21 genes, thereby providing the first evidence of a correlation between the exposition to the
22 environmental particulate (or their adsorbed metallic compounds, such as iron) and the
23 antioxidant adaptive response of the cell that may thus acquire the ability to resist to
24 apoptosis.
25

1 **Discussion**

2 The anti-apoptotic effect of fine and ultrafine particles is increasingly investigated, but
3 data remain insufficient to decipher associated mechanisms [33]. Importantly, the
4 identification of such mechanisms has implications for understanding PM as a carcinogen.
5 Our previous findings of the anti-apoptotic effect of PM, especially as related to the specific
6 content of PM [25], warranted further investigation. By focusing here on metallic
7 components of urban PM, we revealed their dose-dependent contribution to the anti-apoptotic
8 effect in human bronchial epithelial cells. Indeed, seven of the eight studied metals—Al, Cu,
9 Fe, Ca, Mg, Mn, and Pb—inhibited chemically-induced apoptosis. These findings accord
10 with other studies showing that heavy and transition metals can prevent apoptosis. Indeed, *in*
11 *vivo* or *in vitro* toxicological studies previously showed that iron, nickel, zinc as well as
12 arsenic, and cadmium reduce apoptotic cell death [30, 34-35]. Moreover, we demonstrated an
13 absence of cytotoxicity of metallic compounds to human bronchial epithelial cells, although
14 other reports indicated that cell death was induced through ROS generation following metal
15 exposure [23-24]. These divergent results likely stem from differences in cell type, time, and
16 mainly the dose used for metal exposure. In our study, Zn was the only metal devoid of an
17 anti-apoptotic effect, in contrast with previous studies demonstrating the stabilization of
18 lipids and proteins of cellular and organelles membranes, the maintenance of glutathione
19 levels, the reduction of DNA fragmentation and the procaspase-3 processing; and activation
20 of cytoprotective signaling pathways including Akt and ERK [36]. This likely results from
21 the low concentrations used herein (from 65 to 85 ng/mL, i.e., approximately 0.55 μ M),
22 while the anti-apoptotic effect of zinc was shown at a higher concentrations (>10 μ M) [35,
23 37].

24 Our results suggest that metallic compounds, may be involved in the anti-apoptotic
25 effect of PM-AW in a dose-dependent manner, particularly Al, Cu, Fe. Indeed, these three

1 transition metals have an anti-apoptotic effect specifically related to the differences in their
2 concentrations found in anti-apoptotic particles (PM-AW) versus non-anti-apoptotic particles
3 (PM-VS), and the dose-effect study performed with Fe(II) strengthen this statement. The anti-
4 apoptotic effect of iron, present in a low concentration in PM-AW compared to PM-VS, was
5 dose-dependent and counteracted by the iron chelator deferoxamine (DFO). Fe(II) at a low
6 dose (660 ng/mL) and entire PM-AW, both produced anti-apoptotic effects that were
7 preventable with DFO treatment. In contrast, at the high dose of Fe(II) present in PM-VS
8 (1080 ng/mL), no anti-apoptotic effect was observed. Wang *et al.* also showed that a low
9 dose of Fe (20 mg/kg) suppressed lead-induced apoptotic neurotoxicity *in vivo* through
10 activation of the MAPK pathway; in contrast, a high dose (40 mg/kg) was ineffective [34].
11 These results pointed out the anti-apoptotic effect of iron that was previously suggested
12 through the induction of apoptosis by iron chelation or deprivation in cancer cells [38].
13 Indeed, Koc *et al.* showed that iron deprivation of mouse B lymphoma cells switches on the
14 mitochondrial pathway of apoptosis through translocation of the proapoptotic Bax protein
15 from the cytosol to mitochondria, the dissipation of $\Delta\Psi_m$, and the activation of caspases [39].

16 Because transition metals generate ROS [23-24], it was perhaps not surprising that we
17 observed significant DTT oxidation activity for all samples of PM as well as for Cu(II) and
18 Fe(II). These findings support previous results on airborne particles that attributed PM-
19 induced DTT oxidation to PAH components [40] but also for 80% to metallic compounds,
20 especially Cu(II), Mn(II), and Fe(II) [41]. In addition, metal concentration is an important
21 parameter to consider in the study of oxidative potential by DTT oxidation assay [41].
22 Previous works in our laboratory demonstrated the production of hydrogen peroxide and
23 hydroxyl radical by PM-AW and aqueous extracts, which was preventable by the addition of
24 DFO [42-43]. These ROS produced at low doses, might be potential candidates of oxidizing
25 species, produced by PM-AW and iron and involved in their anti-apoptotic effect.

1 To uncover the anti-apoptotic mechanism, we selected two transition metals (Cu and
2 Fe) having an anti-apoptotic effect specifically related to the differences in their
3 concentrations found in anti-apoptotic particles (PM-AW) versus non-anti-apoptotic particles
4 (PM-VS). Zinc, on the other hand, acted more like a negative control since its concentrations
5 are equivalent in PM-AW and PM-VS. Calcium was not further studied due to the
6 mechanism of action of A23187 that triggers cytoplasmic and mitochondrial calcium
7 overload, loss of $\Delta\Psi_m$ and finally apoptosis [44-45]. ROS are apoptotic regulators [46], and
8 we hypothesized that low concentrations of metallic compounds—in particular iron and
9 copper—may provoke an antioxidant adaptive response that might lead to the anti-apoptotic
10 effect of PM [47]. This hypothesis was supported by the positive correlation seen between the
11 *in vitro* DTT oxidation activity of PM-AW—or its Cu(II) and Fe(II) components—and the
12 inhibition of A23187-induced apoptosis determined *in cellulo*. This assumption was
13 reinforced by the reduction of A23187-induced apoptosis we observed with physiological
14 doses of H₂O₂ (i.e., 10 to 50 μ M). Identical concentrations of hydrogen peroxide reduce
15 apoptosis induced by serum-depletion in endothelial cells suggesting that H₂O₂ is a signaling
16 molecule that downregulates apoptosis [48]. Haendeler *et al.* showed that the anti-apoptotic
17 effect of H₂O₂ is mediated through increased levels of thioredoxin-1 (Trx-1) mRNA and
18 protein [48], its nuclear import and upregulation of GSTP1 expression [49].

19 Thereby, in the case of the anti-apoptotic PM, the amount of ROS production might
20 be moderate, allowing cells to adapt by activating the antioxidant system. Consistent with the
21 first step of the hierarchical response to oxidative stress [32, 47], nuclear translocation of
22 Nrf2 was observed with PM-AW and Fe(II) *qs* PM-AW, contrary to non-anti-apoptotic
23 particles PM-VS. Consistent with our previous hypothesis, Kode *et al.* showed that low-dose
24 H₂O₂ (100 μ M) exposure in human primary small airway epithelial cells activated Nrf2
25 nuclear translocation after 1 h in human primary small airway epithelial cells [50]. Further,

1 nuclear translocation of Nrf2 was achieved before upregulation of its own mRNA [51] and
2 that of its target antioxidant genes HO1 [52], NQO1 [53], and GPx1. Similar to other data
3 from respiratory cells [54-55], we found that PM-AW, Fe(II), and Cu(II) exposures produced
4 overexpression of Nrf2, HO1, and NQO1 as early as 2 h exposure duration, and PM-AW
5 upregulated GPx1 expression within 30 minutes. Furthermore, Li *et al.* highlighted a strong
6 positive correlation between the particulate content of redox cycling chemicals (PAH content
7 and DTT oxidation activity) and their capability to induce HO-1 expression; in contrast, the
8 correlation is negative regarding the metals content of PM [32]. HO1 is the most intensely
9 overexpressed enzyme and is of particular interest; its expression and activity are
10 dramatically increased in mitochondrial fractions of human bronchial cells exposed to
11 cigarette smoke extract, inhibits cell death and maintains ATP levels [46]. The cytoprotective
12 mechanism of HO1 involves its enzymatic reaction products as biliverdin, carbon monoxide
13 (CO), and ferrous iron [36]. Additionally to restrain the mitochondrial translocation of Bcl-2
14 family proteins and Cytochrome c release, Queiroga *et al.* demonstrated that CO may directly
15 act on mitochondria as a pretreatment with low doses of CO reduces the calcium-induced
16 swelling and depolarization of isolated mitochondria [56]. Interestingly, our team previously
17 demonstrated that 4-h exposure to anti-apoptotic particles (i.e., PM-AW, PM-AS, and PM-
18 VW) induced a high upregulation of NQO1 mRNA whereas the non-anti-apoptotic PM-VS
19 produced a low-level induction of NQO1 expression [43], suggesting that level of NQO1
20 expression might regulate the anti-apoptotic effect of PM. Absence of effect of PM-AW, iron,
21 and copper exposure on SOD2 and GST expression likely stemmed from analyzing
22 expression too early since another study showed induction of SOD in human alveolar
23 epithelial cells after 6 hours of exposure to PM [57].

24 GSH plays an important role in redox homeostasis, thus we examined its involvement
25 in the PM-induced anti-apoptotic mechanism. Among all antioxidants tested — including a

1 hydroxyl radical scavenger (D-mannitol) and a superoxide dismutase mimetic and
2 peroxyxynitrite scavenger (MnTBAP) — GSH alone was capable of significantly increasing the
3 anti-apoptotic effect in a dose-dependent manner, suggesting that GSH may act in synergy
4 with PM-AW. Further, total intracellular glutathione quantification revealed a specific
5 restoration of GSH levels by PM-AW and Fe(II) during A23187-induced apoptosis.
6 Interestingly, Michael *et al.* also described increased GSH levels in a human alveolar
7 epithelial cell line (A549) exposed for 4 h to urban traffic PM₁₀ [57]. Other data demonstrate
8 that PM or aqueous components increase H₂O₂ and GSH production [57-58], thus we propose
9 that metallic components of PM might generate ROS that trigger the antioxidant cellular
10 response by increasing glutathione levels. Intracellular glutathione is predominantly found in
11 its reduced form and mitochondrial GSH (mGSH) represents a minor fraction of the total
12 GSH pool (10–15%). mGSH stems from the cytosolic GSH by specific transporters located
13 into the mitochondrial inner membrane [59]. We believe that maintaining the total
14 glutathione levels by PM-AW and Fe (II), would allow a maintenance of mGSH which
15 prevents apoptosis at the mitochondrial membrane permeabilization, as previously shown
16 [59].

17 The anti-apoptotic effect of PM could promote tumorigenesis when repeated
18 exposures to low concentrations activate Nrf2, which is implicated in both cell survival and
19 promotion of lung cancer [28, 60]. Additionally, Nrf2 activation by metallic particulate
20 compounds could act through organic components via AhR, as an interaction between AhR
21 and Nrf2 signaling pathways is likely. Indeed, the AhR ligand benzo[a]pyrene downregulates
22 Keap1 transcription and, thereby, leads to Nrf2 activation [61]. Indeed, Miao *et al.* suggested
23 that Nrf2 might be an AhR target gene [62], and others have shown a physical interaction
24 between AhR and Nrf2 as co-factors for ARE-dependent genes [63]. This AhR/Nrf2 crosstalk

1 suggests an additive impact of organic and metallic components of PM leading to an
2 antioxidant adaptive response, cell survival, and possibly tumorigenesis initiation.

3

4 **Conclusion**

5 Expanding on our previous work demonstrating the role of the PAH-AhR pathway in
6 the anti-apoptotic effect of exposure to atmospheric PM [25], this study identifies the metallic
7 components, specifically Fe(II) and Cu(II), contributing in a dose-dependent manner to the
8 anti-apoptotic effect of urban fine PM exposure. Together, our previous and present results
9 lead us to propose a model in which low levels of solubilized metals can generate low
10 amounts of ROS that elicit the activation of pro-survival Nrf2 protein and upregulation of
11 antioxidant enzymes HO1, NQO1, and GPx1 (**Figure 9**). In addition, regulation of redox
12 homeostasis by the maintenance of GSH levels may counteract mitochondrial membrane
13 permeabilization and subsequent apoptosis. Complementarily, desorbed PAH activate the
14 AhR pathway, which can regulate the expression of xenobiotic response element (XRE)-
15 dependent genes and/or contribute to the activation of the transcription factor Nrf2. To
16 conclude, our mechanistic study highlights how accurate amounts of metallic components,
17 particularly Fe(II) and Cu(II), contribute to the anti-apoptotic effect of urban PM,
18 supplementing the observations of involvement of the PAH-AhR signaling pathway. A fuller
19 understanding of the cellular and molecular impacts of atmospheric particles on cell death
20 impediment can provide clues to explain the development of lung cancers during long-term
21 exposures.

1 **Methods**

2 *Particles and metals*

3 Fine urban atmospheric PM were collected in Paris during winter or summer 2003 at
4 two locations corresponding to different sources: an urban background station at Vitry-sur-
5 Seine (VW: Vitry winter, VS: Vitry summer) in Paris suburb and a curbside traffic station at
6 Porte d'Auteuil bordering the highway ring road of Paris (AW: Auteuil winter, AS: Auteuil
7 summer). Particles were recovered on 150-mm diameter nitrocellulose filters (HAWP,
8 Millipore, Saint-Quentin-en-Yvelines, France) with a high volume sampler machine (DA-80
9 Digitel, Switzerland, flowrate: 30 m³/h, [42]). Their metal contents have been previously
10 analyzed by inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry or flame photometry
11 and described [64-65]. All particles were suspended at 2 mg/mL in supplemented
12 DMEM/F12 medium (Gibco[®]) and stored at -20°C. For treatment, after thawing, particles
13 were sonicated three times for 20 s at 70W (Vibracell, Bioblock Scientific, Illkrich, France)
14 and directly added onto cells at a standard dose of 10 µg/cm² (50 µg/mL). Metallic
15 compounds were studied as ionic suspension from salt powders diluted in ultrapure water:
16 Fe(II) [Ammonium iron(II) sulfate hexahydrate: (NH₄)₂Fe(SO₄)₂ · 6H₂O], Fe(III) [Iron (III)
17 chloride: FeCl₃], Al(III) (Aluminium chloride: AlCl₃), Cu(II) (Copper chloride: CuCl₂ and
18 Copper sulfate: CuSO₄), Zn(II) (Zinc Chloride: ZnCl₂), Ca(II) (Calcium chloride: CaCl₂),
19 Mg(II) (Magnesium chloride: MgCl₂), Mn(II) (Manganese chloride: MnCl₂), and Pb(II)
20 (Lead chloride: PbCl₂).

21

22 *Cell culture conditions*

23 Human bronchial epithelial 16HBE14o- cells, kindly provided by Dr. D.C. Gruenert
24 (Colchester, VT, USA), were cultured in DMEM/F12 GlutaMAX[™] medium (Gibco[®])
25 containing L-glutamine (2 mM), HEPES (15 mM), and phenol red and supplemented with 100

18

1 U/mL penicillin (Gibco®), 100 µg/mL streptomycin (Gibco®), 1.25 µg/mL fungizone
2 (Gibco®), and 2% UltrosorG (UG, Gibco®). Cells were grown at 37°C, 5% CO₂ on coating
3 composed of 2.9% bovine collagen (Purecol Natucan, 0.5 mg/cm²), 1% human fibronectin
4 (Sigma), and 10% bovine serum albumin (BSA, Sigma) diluted in LHC Medium (Gibco®).
5 Cells were maintained at subconfluence by trypsination with 0.05% Trypsine-EDTA
6 (Gibco®, 3 min, 37°C). Prior to particle treatment UG was removed.

7

8 ***Chemicals and apoptosis measurement***

9 16HBE cells were exposed 4 h to PM (10 µg/cm²) or metallic compounds (quantities
10 found in 10 µg/cm² of PM, **Table 1**) prior to apoptosis induction by A23187 (3 µM, Sigma)
11 for 20 h. H₂O₂ (1 mM, Sigma) was used as a positive control for ROS production and
12 apoptosis induction. The iron chelator Deferoxamine (DFO, 200 µM, Sigma) and
13 antioxidants (D-mannitol 50 mM, MnTBAP 100 µM, GSH 10 mM, and GSSG 10 mM,
14 Sigma) were added along with PM-AW or Fe(II) solutions for 4 h before induction of
15 apoptosis. Apoptotic and oxidative stress parameters were quantified by flow cytometry
16 performed on CyAn ADP 9C (IJM facility) or BD FACSAria II (BFA facility) flow
17 cytometers using 3,3'-dihexyloxycarbocyanine iodide (DiOC₆(3) low staining (2 nM, Life
18 Technologies™) for ΔΨ_m quantification, 2 µM hydroethidine (HE high staining, Life
19 Technologies™) for cytoplasmic superoxide anion generation, and 10 µg/mL propidium
20 iodide (PI high staining, Sigma) for determination of plasma membrane permeabilization.
21 Percentage of induction of specific apoptosis (SA) was calculated according to the following
22 formula: % SA = 100 × (% of apoptotic treated cells - % of apoptotic control cells) / (100 - %
23 of apoptotic control cells) [25]. Percentage of inhibition of specific apoptosis was calculated
24 according to the following formula: % inhibition of SA = 100 - [(100 × % SA of treated
25 cells) / % of A23-induced SA].

19

1 ***Inherent oxidative capacity by DTT assay***

2 The intrinsic ability to produce ROS by all batches of PM or metallic compounds
3 Cu(II), Fe(II), Fe(III), Zn(II), and Al(III) was measured by DTT assay [41]. This assay is
4 based on the ability of redox active compounds associated with PM to transfer electrons from
5 unoxidized dithiothreitol (DTT) to oxygen and to produce superoxide anion and disulfide
6 DTT. PM samples or metals were incubated 30 min at 37°C with 200 μ M DTT (Euromedex).
7 After incubation, samples were centrifuged at 3000 g (15 min, 4°C) and the loss of
8 unoxidized DTT was followed by its reaction with DTNB [5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic
9 acid), 2.5 mM, Euromedex] to form 2-nitro-5-mercaptobenzoic acid, which was quantified by
10 measuring absorbance at 405 nm with a plate reader (FlexStation 3, Molecular Devices).
11 Results are presented as unoxidized DTT concentrations obtained by subtracting the values of
12 blank control. PM and metals were diluted in DMEM/F12 medium without phenol red and
13 devoided of oxygen using a vacuum pump. All measurements were conducted with reduced
14 light exposure. The rate of DTT loss was calculated using the slope of linear regression of
15 unoxidized DTT remaining in solution as a function of amount of PM or metallic compounds,
16 and based on the average of 5 different replicates, resulting in a value expressed as μ M of
17 DTT per μ g.

18

19 ***Intracellular GSH/GSSG dosage***

20 Cells were exposed 4 h to PM (10 μ g/cm²) or their metallic compounds (*qs* 10 μ g/cm²
21 of PM) before collection and resuspension at 10⁶ cells/mL in PBS. GSH concentration was
22 assessed using the Glutathione Assay Kit (Sigma), following the manufacturer
23 recommendations. Briefly, the deproteinized lysate (with 5% 5-sulfosilyclic acid) was
24 assessed for GSH concentration by its reaction with DTNB to produce TNB. The GSSG

20

1 formed is recycled by glutathione reductase and NADPH. The GSSG present in samples also
2 reacts, and results were reported as the total glutathione (GSSG + GSH). H₂O₂ (1 mM) was
3 used as positive control known to induce GSH oxidation. Results are expressed for 10⁶ cells.
4

5 ***Quantitative reverse transcriptase-PCR***

6 Total RNA were extracted from 16HBE14o-cells using TriReagentTM according to the
7 manufacturer's instructions. RNA concentration was ascertained by measuring optical density
8 at 260 nm, and quality was verified by optical density absorption ratio (A260/A280) using a
9 Nanodrop ND-2000 (Thermo Scientific). Two µg of total RNA were reverse-transcribed to
10 cDNA for 30 min at 42°C in the presence of 50 U of M-MLV reverse transcriptase RNase H
11 (Promega), 20 µg/mL of oligo-dT primers (Roche Applied Sciences, Meylan, France), and
12 500 µM dNTP. 1/10th of the RT reaction was then PCR-amplified using 0.5 µM forward and
13 reverse primers (see details below), 1X Light Cycler 480SYBR Green I Master Mix (Roche)
14 containing FastStart Taq DNA Polymerase, and DNA double-strand-specific SYBR Green I
15 dye for product detection and characterization. Samples were amplified in a Light Cycler 480
16 (Roche) under the following conditions: 5 min at 95°C; 45 cycles of 10 s at 95°C, 20 s at
17 58°C, and 20 s at 72°C; 1 min at 95°C; and a ramp from 55°C to 95°C. The mRNA transcript
18 level was normalized against two reference genes, glyceraldehyde 3-phosphate
19 dehydrogenase gene [GAPDH, (GenBank: 2597)] and β2 microglobulin protein gene [B2M,
20 (GenBank: 567)]. To compare mRNA level, relative quantification was performed as outlined
21 in Pfaffl *et al.* [66]. Normalized mRNA ratio = (Eff target)^{ΔCt target(MEANcontrol – MEANsample)} / (Eff
22 ref.)^{ΔCt ref(MEANcontrol – MEANsample)}. The primer sequences were as follows:

23 Nrf2 : forward : 5'-GAGACAGGTGAATTTCTCCCAAT-3'

24 reverse : 5'-GGGAATGTGGGCAACCTGGG-3'

25 HO1 : forward : 5'-CAGGCAGAGAATGCTGATTC-3'

1 reverse : 5'-GCTCTTCTGGGAAGTAGACAGG-3'
2 NQO1 : forward : 5'-AAGAAAGGATGGGAGGTGGT-3'
3 reverse : 5'-GCTTCTTTTGTTCAGCCACA-3'
4 SOD2 : forward : 5'-TTGTCCAAATCAGGATCCAC-3'
5 reverse : 5'- TGCAAGCCATGTATGATCTTTCAG-3'
6 GSTP1 : forward : 5'-CGGGCAAGGATGACTATGT-3'
7 reverse : 5'-TCCAGCAGGTTGTAGTCAGC-3'
8 GPx : forward : 5'-GCGGGGCAAGGTACTACTTA-3'
9 reverse : 5'- CTCTTCGTTCTTGGCGTCT-3'
10 GAPDH : forward : 5'- CCCCTTCATTGACCTCAACTA-3'
11 reverse : 5'-GACAAGCTTCCCGTTCTCA-3'
12 B2M : forward : 5'- GCTCGCGCTACTCTCTCTTT-3'
13 reverse : 5'- GGATGAAACCCAGACACATA-3'.

14

15 ***Confocal immufluorescence***

16 16HBE cells were cultured for 24 h on Lab-Tek™ Chamber Slide System (Thermo
17 Scientific) with PM-AW, PM-VS (10 µg/cm²), or Fe(II) (quantities found in 10µg/cm² of
18 PM-AW). Specific antibody for Nrf2 (ref H-300, Santa Cruz Biotechnologies) was used on
19 paraformaldehyde-fixed (4% w/v) and 0.05% PBS Tween 20-permeabilized cells. Nrf2
20 protein was detected by a goat anti-rabbit IgG-conjugated Alexa® Fluor 488 (Life
21 Technologies). Actin staining was carried out using Rhodamine Phalloidin (0.8 U/mL, Life
22 Technologies). Nuclei were stained with DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole,
23 Dihydrochloride, Life Technologies) 0.5 µg/mL and lamella were mounted using medium
24 with DABCO® (Sigma). Immunostaining was evaluated by examination of slides under a

22

1 laser confocal microscope (LSM 710, Zeiss, IJM Facility). Images were compiled with Image
2 J software.

3

4 ***Statistical analysis***

5 All results are presented as the mean \pm standard error of the mean of independent
6 experiments. Data were analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by
7 Bonferroni's test to examine the differences between the different treated groups *versus*
8 control group or among the different treatment groups (GraphPad Prism®). Differences were
9 considered significant if the *p* value was less than at least 0.05.

- 1 **List of abbreviations used**
- 2 **A23187**, calcium ionophore (calcimycin)
- 3 **AhR**, aryl hydrocarbon receptor
- 4 **ARE**, antioxidant response elements
- 5 **B2M**, β 2 microglobulin protein gene
- 6 **CO**, carbon monoxide
- 7 **DFO**, deferoxamine
- 8 **DiOC₆(3)**, 3,3'-dihexyloxacarbocyanine iodide
- 9 **DTNB**, 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)
- 10 **DTT**, dithiothreitol
- 11 **EC50**, half maximal effective concentration
- 12 **FITC**, fluorescein isothiocyanate
- 13 **GAPDH**, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase gene
- 14 **GPx1**, glutathione peroxidase 1
- 15 **GSH**, reduced glutathione
- 16 **GSSG**, oxidized glutathione
- 17 **GSTP1**, glutathione S-transferase π isoenzyme
- 18 **H₂O₂**, hydrogen peroxide
- 19 **HE**, hydroethidine
- 20 **HO^o**, hydroxyl radical
- 21 **HO1**, heme oxygenase-1
- 22 **Keap1**, Kelch-like ECH-associated protein 1
- 23 **LOEL**, lowest observed effect level
- 24 **MAPK**, Mitogen-activated protein kinases
- 25 **mGSH**, mitochondrial GSH

- 1 **MMP**, mitochondrial membrane permeabilization
- 2 **NF- κ B**, nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
- 3 **NQO1**, NAD(P)H–quinone oxidoreductase 1
- 4 **Nrf2**, Nuclear factor E2-related factor 2
- 5 **PAH**, polycyclic aromatic hydrocarbons
- 6 **PCR**, polymerase chain reaction
- 7 **PI**, propidium iodide
- 8 **PM**, particulate matter
- 9 **PM-AS**, Auteuil summer
- 10 **PM-AW**, Auteuil winter
- 11 **PM-VS**, Vitry summer
- 12 **PM-VW**, Vitry winter
- 13 **PS**, phosphatidylserine
- 14 **ROS**, reactive oxygen species
- 15 **SOD2**, superoxide dismutase 2
- 16 **Trx-1**, thioredoxin-1
- 17 **UG**, UltrosorG
- 18 **XRE**, xenobiotic response elements
- 19 **$\Delta\Psi_m$** , mitochondrial transmembrane potential
- 20
- 21 **Competing interests**
- 22 The authors declare that there is no conflict of interest.
- 23
- 24

1 **Funding information**

2 This work was supported by Agence Nationale de la Recherche [0599-5 SET 024-01], Centre
3 National de la Recherche Scientifique (CNRS), Université Paris Diderot-Paris 7 (Bourse de
4 Master, Melanie Lovera-Leroux), Renault (DIMAT, for the supply and chemical analysis of
5 PM batches) and Legs Poix.

6

7 **Acknowledgments**

8 We thank Blandine Gaussère (BFA facility) and Nicole Boggetto (IJM facility) for their
9 technical assistance on flow cytometers as well as Isabelle George and the confocal
10 microscope platform in the Institute Jacques Monod, Paris, France. We particularly thank
11 Nathalie Janel and Ioana Ferecatu for critical readings and corrections of the manuscript.

12

13 **Author contributions**

14 MLL and KA designed the research, analyzed the data, and drafted the paper. MLL, BC, and
15 KA performed the experiments. NK and ABS contributed to the interpretation of the data and
16 helped improving the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

1 **Additional files – Supplementary figures**

2

3 **Additional file 1:** Effect of metals and their salt forms on the apoptosis of 16HBE cells.

4 **Additional file 2:** Dose-effect study of H₂O₂ on A23187-induced apoptosis.

5 **Additional file 3:** Kinetic study of the anti-apoptotic effect of PM-AW.

6 **Additional file 4:** Expression of antioxidant genes during A23187-induced apoptosis

1 **References**

- 2 1. Hoek G, Krishnan RM, Beelen R, Peters A, Ostro B, Brunekreef B, Kaufman JD:
3 **Long-term air pollution exposure and cardio- respiratory mortality: a review.**
4 *Environ Health* 2013, **12**:43.
5
- 6 2. Raaschou-Nielsen O, Andersen ZJ, Beelen R, Samoli E, Stafoggia M, Weinmayr G,
7 Hoffmann B, Fischer P, Nieuwenhuijsen MJ, Brunekreef B, et al: **Air pollution and**
8 **lung cancer incidence in 17 European cohorts: prospective analyses from the**
9 **European Study of Cohorts for Air Pollution Effects (ESCAPE).** *Lancet Oncol*
10 2013, **14**:813-822.
11
- 12 3. Chen Y, Ebenstein A, Greenstone M, Li H: **Evidence on the impact of sustained**
13 **exposure to air pollution on life expectancy from China's Huai River policy.** *Proc*
14 *Natl Acad Sci U S A* 2013, **110**:12936-12941.
15
- 16 4. Churg A, Brauer M, del Carmen Avila-Casado M, Fortoul TI, Wright JL: **Chronic**
17 **exposure to high levels of particulate air pollution and small airway remodeling.**
18 *Environ Health Perspect* 2003, **111**:714-718.
19
- 20 5. Val S, Liousse C, Doumbia EH, Galy-Lacaux C, Cachier H, Marchand N, Badel A,
21 Gardrat E, Sylvestre A, Baeza-Squiban A: **Physico-chemical characterization of**
22 **African urban aerosols (Bamako in Mali and Dakar in Senegal) and their toxic**
23 **effects in human bronchial epithelial cells: description of a worrying situation.**
24 *Part Fibre Toxicol* 2013, **10**:10.
25
- 26 6. Lodovici M, Bigagli E: **Oxidative stress and air pollution exposure.** *J Toxicol* 2011,
27 **2011**:487074.
28
- 29 7. Yanagi Y, Assuncao JV, Barrozo LV: **The impact of atmospheric particulate**
30 **matter on cancer incidence and mortality in the city of Sao Paulo, Brazil.** *Cad*
31 *Saude Publica* 2012, **28**:1737-1748.
32
- 33 8. **IARC: Outdoor air pollution a leading environmental cause of cancer deaths**
34 [http://www.iarc.fr/en/media-centre/iarcnews/pdf/pr221_E.pdf]
35
- 36 9. Hanahan D, Weinberg RA: **The hallmarks of cancer.** *Cell* 2000, **100**:57-70.
37 10. Hanahan D, Weinberg RA: **Hallmarks of cancer: the next generation.** *Cell* 2011,
38 **144**:646-674.
39
- 40 11. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR: **Apoptosis: a basic biological phenomenon with**
41 **wide-ranging implications in tissue kinetics.** *Br J Cancer* 1972, **26**:239-257.
42
- 43 12. Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH,
44 Blagosklonny MV, El-Deiry WS, Golstein P, Green DR, et al: **Classification of cell**
45 **death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009.**
46 *Cell Death Differ* 2009, **16**:3-11.
47

- 1 13. Galluzzi L, Zamzami N, de La Motte Rouge T, Lemaire C, Brenner C, Kroemer G:
2 **Methods for the assessment of mitochondrial membrane permeabilization in**
3 **apoptosis.** *Apoptosis* 2007, **12**:803-813.
4
- 5 14. Farina F, Sancini G, Mantecca P, Gallinotti D, Camatini M, Palestini P: **The acute**
6 **toxic effects of particulate matter in mouse lung are related to size and season of**
7 **collection.** *Toxicol Lett* 2011, **202**:209-217.
8
- 9 15. Agopyan N, Head J, Yu S, Simon SA: **TRPV1 receptors mediate particulate**
10 **matter-induced apoptosis.** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004, **286**:L563-
11 572.
12
- 13 16. Alfaro-Moreno E, Martinez L, Garcia-Cuellar C, Bonner JC, Murray JC, Rosas I,
14 Rosales SP, Osornio-Vargas AR: **Biologic effects induced in vitro by PM10 from**
15 **three different zones of Mexico City.** *Environ Health Perspect* 2002, **110**:715-720.
16
- 17 17. Garcon G, Dagher Z, Zerimech F, Ledoux F, Courcot D, Aboukais A, Puskaric E,
18 Shirali P: **Dunkerque City air pollution particulate matter-induced cytotoxicity,**
19 **oxidative stress and inflammation in human epithelial lung cells (L132) in**
20 **culture.** *Toxicol In Vitro* 2006, **20**:519-528.
21
- 22 18. Mates JM, Segura JA, Alonso FJ, Marquez J: **Roles of dioxins and heavy metals in**
23 **cancer and neurological diseases using ROS-mediated mechanisms.** *Free Radic*
24 *Biol Med* 2010, **49**:1328-1341.
25
- 26 19. Xia T, Korge P, Weiss JN, Li N, Venkatesen MI, Sioutas C, Nel A: **Quinones and**
27 **aromatic chemical compounds in particulate matter induce mitochondrial**
28 **dysfunction: implications for ultrafine particle toxicity.** *Environ Health Perspect*
29 2004, **112**:1347-1358.
30
- 31 20. Choi JH, Kim JS, Kim YC, Kim YS, Chung NH, Cho MH: **Comparative study of**
32 **PM2.5 - and PM10 - induced oxidative stress in rat lung epithelial cells.** *J Vet Sci*
33 2004, **5**:11-18.
34
- 35 21. Billet S, Garcon G, Dagher Z, Verdin A, Ledoux F, Cazier F, Courcot D, Aboukais A,
36 Shirali P: **Ambient particulate matter (PM2.5): physicochemical characterization**
37 **and metabolic activation of the organic fraction in human lung epithelial cells**
38 **(A549).** *Environ Res* 2007, **105**:212-223.
39
- 40 22. Andrysik Z, Vondracek J, Marvanova S, Ciganek M, Neca J, Pencikova K,
41 Mahadevan B, Topinka J, Baird WM, Kozubik A, Machala M: **Activation of the aryl**
42 **hydrocarbon receptor is the major toxic mode of action of an organic extract of a**
43 **reference urban dust particulate matter mixture: the role of polycyclic aromatic**
44 **hydrocarbons.** *Mutat Res* 2011, **714**:53-62.
45
- 46 23. Pulido MD, Parrish AR: **Metal-induced apoptosis: mechanisms.** *Mutat Res* 2003,
47 **533**:227-241.
48
- 49 24. Rana SV: **Metals and apoptosis: recent developments.** *J Trace Elem Med Biol*
2008, **22**:262-284.

- 1 25. Ferecatu I, Borot MC, Bossard C, Leroux M, Boggetto N, Marano F, Baeza-Squiban
2 A, Andreau K: **Polycyclic aromatic hydrocarbon components contribute to the**
3 **mitochondria-antiapoptotic effect of fine particulate matter on human bronchial**
4 **epithelial cells via the aryl hydrocarbon receptor.** *Part Fibre Toxicol* 2010, **7**:18.
- 5 26. Niestroy J, Barbara A, Herbst K, Rode S, van Liempt M, Roos PH: **Single and**
6 **concerted effects of benzo[a]pyrene and flavonoids on the AhR and Nrf2-**
7 **pathway in the human colon carcinoma cell line Caco-2.** *Toxicol In Vitro* 2011,
8 **25**:671-683.
- 9
- 10 27. Simmons SO, Fan CY, Yeoman K, Wakefield J, Ramabhadran R: **NRF2 Oxidative**
11 **Stress Induced by Heavy Metals is Cell Type Dependent.** *Curr Chem Genomics*
12 2011, **5**:1-12.
- 13
- 14 28. Kansanen E, Kuosmanen SM, Leinonen H, Levonen AL: **The Keap1-Nrf2 pathway:**
15 **Mechanisms of activation and dysregulation in cancer.** *Redox Biol* 2013, **1**:45-49.
- 16
- 17 29. Bryan HK, Olayanju A, Goldring CE, Park BK: **The Nrf2 cell defence pathway:**
18 **Keap1-dependent and -independent mechanisms of regulation.** *Biochem*
19 *Pharmacol* 2013, **85**:705-717.
- 20
- 21 30. Ding J, Zhang X, Li J, Song L, Ouyang W, Zhang D, Xue C, Costa M, Melendez JA,
22 Huang C: **Nickel compounds render anti-apoptotic effect to human bronchial**
23 **epithelial Beas-2B cells by induction of cyclooxygenase-2 through an**
24 **IKKbeta/p65-dependent and IKKalpha- and p50-independent pathway.** *J Biol*
25 *Chem* 2006, **281**:39022-39032.
- 26
- 27 31. Steenhof M, Gosens I, Strak M, Godri KJ, Hoek G, Cassee FR, Mudway IS, Kelly FJ,
28 Harrison RM, Lebret E, et al: **In vitro toxicity of particulate matter (PM) collected**
29 **at different sites in the Netherlands is associated with PM composition, size**
30 **fraction and oxidative potential—the RAPTES project.** *Part Fibre Toxicol* 2011,
31 **8**:26.
- 32
- 33 32. Li N, Hao M, Phalen RF, Hinds WC, Nel AE: **Particulate air pollutants and**
34 **asthma. A paradigm for the role of oxidative stress in PM-induced adverse**
35 **health effects.** *Clin Immunol* 2003, **109**:250-265.
- 36
- 37 33. Celardo I, De Nicola M, Mandoli C, Pedersen JZ, Traversa E, Ghibelli L: **Ce(3)+ ions**
38 **determine redox-dependent anti-apoptotic effect of cerium oxide nanoparticles.**
39 *ACS Nano* 2011, **5**:4537-4549.
- 40
- 41 34. Wang Q, Luo W, Zhang W, Dai Z, Chen Y, Chen J: **Iron supplementation protects**
42 **against lead-induced apoptosis through MAPK pathway in weanling rat cortex.**
43 *Neurotoxicology* 2007, **28**:850-859.
- 44
- 45 35. Kontargiris E, Vadalouka A, Ragos V, Kalfakakou V: **Zinc inhibits apoptosis and**
46 **maintains NEP downregulation, induced by ropivacaine, in HaCaT cells.** *Biol*
47 *Trace Elem Res* 2012, **150**:460-466.
- 48

- 1 36. Andreau K, Castedo M, Perfettini JL, Roumier T, Pichart E, Souquere S, Vivet S,
2 Larochette N, Kroemer G: **Preapoptotic chromatin condensation upstream of the**
3 **mitochondrial checkpoint.** *J Biol Chem* 2004, **279**:55937-55945.
4
- 5 37. An WL, Pei JJ, Nishimura T, Winblad B, Cowburn RF: **Zinc-induced anti-apoptotic**
6 **effects in SH-SY5Y neuroblastoma cells via the extracellular signal-regulated**
7 **kinase 1/2.** *Brain Res Mol Brain Res* 2005, **135**:40-47.
8
- 9 38. Brard L, Granai CO, Swamy N: **Iron chelators deferoxamine and**
10 **diethylenetriamine pentaacetic acid induce apoptosis in ovarian carcinoma.**
11 *Gynecol Oncol* 2006, **100**:116-127.
12
- 13 39. Koc M, Nad'ova Z, Truksa J, Ehrlichova M, Kovar J: **Iron deprivation induces**
14 **apoptosis via mitochondrial changes related to Bax translocation.** *Apoptosis* 2005,
15 **10**:381-393.
16
- 17 40. Li N, Sioutas C, Cho A, Schmitz D, Misra C, Sempf J, Wang M, Oberley T, Froines
18 J, Nel A: **Ultrafine particulate pollutants induce oxidative stress and**
19 **mitochondrial damage.** *Environ Health Perspect* 2003, **111**:455-460.
20
- 21 41. Charrier JG, Anastasio C: **On dithiothreitol (DTT) as a measure of oxidative**
22 **potential for ambient particles: evidence for the importance of soluble transition**
23 **metals.** *Atmos Chem Phys* 2012, **12**:11317-11350.
24
- 25 42. Baulig A, Poirault JJ, Ausset P, Schins R, Shi T, Baralle D, Dorlhene P, Meyer M,
26 Lefevre R, Baeza-Squiban A, Marano F: **Physicochemical characteristics and**
27 **biological activities of seasonal atmospheric particulate matter sampling in two**
28 **locations of Paris.** *Environ Sci Technol* 2004, **38**:5985-5992.
29
- 30 43. Baulig A, Singh S, Marchand A, Schins R, Barouki R, Garlatti M, Marano F, Baeza-
31 Squiban A: **Role of Paris PM(2.5) components in the pro-inflammatory response**
32 **induced in airway epithelial cells.** *Toxicology* 2009, **261**:126-135.
33
- 34 44. Smaili SS, Pereira GJ, Costa MM, Rocha KK, Rodrigues L, do Carmo LG, Hirata H,
35 Hsu YT: **The role of calcium stores in apoptosis and autophagy.** *Curr Mol Med*
36 2013, **13**:252-265.
37
- 38 45. Deniaud A, Sharaf el dein O, Maillier E, Poncet D, Kroemer G, Lemaire C, Brenner
39 C: **Endoplasmic reticulum stress induces calcium-dependent permeability**
40 **transition, mitochondrial outer membrane permeabilization and apoptosis.**
41 *Oncogene* 2008, **27**:285-299.
42
- 43 46. Orrenius S, Nicotera P, Zhivotovsky B: **Cell death mechanisms and their**
44 **implications in toxicology.** *Toxicol Sci* 2011, **119**:3-19.
45
- 46 47. Andreau K, Leroux M, Bouharrou A: **Health and cellular impacts of air**
47 **pollutants: from cytoprotection to cytotoxicity.** *Biochem Res Int* 2012,
48 **2012**:493894.

- 1 48. Haendeler J, Tischler V, Hoffmann J, Zeiher AM, Dimmeler S: **Low doses of**
2 **reactive oxygen species protect endothelial cells from apoptosis by increasing**
3 **thioredoxin-1 expression.** *FEBS Lett* 2004, **577**:427-433.
4
- 5 49. Schroeder P, Popp R, Wiegand B, Altschmied J, Haendeler J: **Nuclear redox-**
6 **signaling is essential for apoptosis inhibition in endothelial cells--important role**
7 **for nuclear thioredoxin-1.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007, **27**:2325-2331.
8
- 9 50. Kode A, Rajendrasozhan S, Caito S, Yang SR, Megson IL, Rahman I: **Resveratrol**
10 **induces glutathione synthesis by activation of Nrf2 and protects against cigarette**
11 **smoke-mediated oxidative stress in human lung epithelial cells.** *Am J Physiol*
12 *Lung Cell Mol Physiol* 2008, **294**:L478-488.
13
- 14 51. Cho HY, Kleeberger SR: **Nrf2 protects against airway disorders.** *Toxicol Appl*
15 *Pharmacol* 2010, **244**:43-56.
16
- 17 52. Alam J, Cai J, Smith A: **Isolation and characterization of the mouse heme**
18 **oxygenase-1 gene. Distal 5' sequences are required for induction by heme or**
19 **heavy metals.** *J Biol Chem* 1994, **269**:1001-1009.
20
- 21 53. Nioi P, McMahon M, Itoh K, Yamamoto M, Hayes JD: **Identification of a novel**
22 **Nrf2-regulated antioxidant response element (ARE) in the mouse**
23 **NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 gene: reassessment of the ARE consensus**
24 **sequence.** *Biochem J* 2003, **374**:337-348.
25
- 26 54. Deng X, Rui W, Zhang F, Ding W: **PM2.5 induces Nrf2-mediated defense**
27 **mechanisms against oxidative stress by activating PIK3/AKT signaling pathway**
28 **in human lung alveolar epithelial A549 cells.** *Cell Biol Toxicol* 2013, **29**:143-157.
29
- 30 55. Diabate S, Bergfeldt B, Plaumann D, Ubel C, Weiss C: **Anti-oxidative and**
31 **inflammatory responses induced by fly ash particles and carbon black in lung**
32 **epithelial cells.** *Anal Bioanal Chem* 2011, **401**:3197-3212.
33
- 34 56. Queiroga CS, Almeida AS, Alves PM, Brenner C, Vieira HL: **Carbon monoxide**
35 **prevents hepatic mitochondrial membrane permeabilization.** *BMC Cell Biol* 2011,
36 **12**:10.
37
- 38 57. Michael S, Montag M, Dott W: **Pro-inflammatory effects and oxidative stress in**
39 **lung macrophages and epithelial cells induced by ambient particulate matter.**
40 *Environ Pollut* 2013, **183**:19-29.
41
- 42 58. Shen H, Anastasio C: **A Comparison of Hydroxyl Radical and Hydrogen Peroxide**
43 **Generation in Ambient Particle Extracts and Laboratory Metal Solutions.** *Atmos*
44 *Environ (1994)* 2012, **46**:665-668.
45
- 46 59. Mari M, Morales A, Colell A, Garcia-Ruiz C, Kaplowitz N, Fernandez-Checa JC: **Mitochondrial**
47 **glutathione: features, regulation and role in disease.** *Biochim*
48 *Biophys Acta* 2013, **1830**:3317-3328.
49
- 50 60. Bauer AK, Hill T, 3rd, Alexander CM: **The involvement of NRF2 in lung cancer.**
Oxid Med Cell Longev 2013, **2013**:746432.

- 1 61. Nguyen PM, Park MS, Chow M, Chang JH, Wrischnik L, Chan WK:
2 **Benzo[a]pyrene increases the Nrf2 content by downregulating the Keap1**
3 **message.** *Toxicol Sci* 2010, **116**:549-561.
4
- 5 62. Miao W, Hu L, Scrivens PJ, Batist G: **Transcriptional regulation of NF-E2 p45-**
6 **related factor (NRF2) expression by the aryl hydrocarbon receptor-xenobiotic**
7 **response element signaling pathway: direct cross-talk between phase I and II**
8 **drug-metabolizing enzymes.** *J Biol Chem* 2005, **280**:20340-20348.
9
- 10 63. Wang L, He X, Szklarz GD, Bi Y, Rojanasakul Y, Ma Q: **The aryl hydrocarbon**
11 **receptor interacts with nuclear factor erythroid 2-related factor 2 to mediate**
12 **induction of NAD(P)H:quinoneoxidoreductase 1 by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-**
13 **dioxin.** *Arch Biochem Biophys* 2013, **537**:31-38.
14
- 15 64. Rumelhard M, Ramgolam K, Auger F, Dazy AC, Blanchet S, Marano F, Baeza-
16 Squiban A: **Effects of PM2.5 components in the release of amphiregulin by**
17 **human airway epithelial cells.** *Toxicol Lett* 2007, **168**:155-164.
18
- 19 65. Rumelhard M, Ramgolam K, Hamel R, Marano F, Baeza-Squiban A: **Expression and**
20 **role of EGFR ligands induced in airway cells by PM2.5 and its components.** *Eur*
21 *Respir J* 2007, **30**:1064-1073.
22
- 23 66. Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L: **Relative expression software tool (REST) for**
24 **group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in**
25 **real-time PCR.** *Nucleic Acids Res* 2002, **30**:e36.
26
27

1 **Figure legends**

2 **Figure 1: Anti-apoptotic effect of PM is specifically correlated to some metallic**
3 **compounds.** 16HBE cells were exposed for 4 h to Cu(II), Fe(II), Fe(III), Mn(II), Zn(II),
4 Al(III), Ca(II), Mg(II), and Pb(II) at concentrations found in 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (i.e., 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) of
5 either PM-AW (anti-apoptotic) or PM-VS (non-anti-apoptotic) (see Table 1). Apoptosis was
6 induced by treatment with A23187 (3 μM) for supplementary 20 hours. H_2O_2 (1 mM) was
7 used as a positive control for apoptosis. Percentage of apoptotic cells was determined by flow
8 cytometry using $\Delta\Psi\text{m}$ drop (DiOC₆(3) low staining) and superoxide anion production (HE
9 high staining) parameters. Data presented are means \pm SEM from 4 different experiments.
10 Line: value of specific apoptosis induced by A23187 (59.72 \pm 13.25 %). *Statistically
11 different from Medium condition (A23187 alone), $p < 0.05$; §statistically different from whole
12 PM condition, $p < 0.001$.

13

14 **Figure 2: The anti-apoptotic effect of PM-AW is specifically correlated to the amount of**
15 **iron.** (A) Effect of the iron chelator deferoxamine. 16HBE epithelial cells were treated 4 h
16 with PM-AW (10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) or Fe(II) (660 ng/mL, *qs* 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ of PM-AW) in the absence or
17 presence of deferoxamine (DFO, 200 μM) before induction of apoptosis with A23187 (3 μM)
18 for 20 h. Specific apoptosis was determined by flow cytometry assessing the loss of $\Delta\Psi\text{m}$
19 (DiOC₆(3) low staining) and the plasma membrane permeabilization (PI high staining). Line:
20 value of specific apoptosis induced by A23187 (47.03 \pm 5.44 %). Results are means \pm SEM
21 ($n = 4$). * $p < 0.01$ vs. Medium/None (i.e., A23187 alone), § $p < 0.01$ vs. A23187/DFO and #
22 $p < 0.05$ vs. A23187+PM-AW/DFO. (B) Dose-effect study of Fe(II) on apoptosis inhibition.
23 16HBE cells were exposed 4 h to different doses of Fe(II) (0-1250 ng/mL) before induction
24 of apoptosis by A23187 (3 μM) for 20 h. The amount of Fe(II) found absorbed on 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$
25 of PM-AW (anti-apoptotic) and PM-VS (non anti-apoptotic) are highlighted by arrows. The

34

1 inhibition of specific apoptosis was measured by flow cytometry as above. Data are
2 represented as means \pm SEM from 3 different experiments. * Statistically different from
3 control condition (A23187 alone) with $p < 0.01$.

4

5 **Figure 3: ROS production and intrinsic oxidative activities of PM and their metallic**
6 **compounds.** (A) Inherent oxidative potential of different batches of PM (from 0.8 to 16 μg)
7 evaluated by the DTT oxidation assay. H_2O_2 (0.05 to 1 mM) is used here as positive control.
8 Results are presented as unoxidized DTT concentrations obtained by subtracting the values of
9 blank control. Line: initial amount of DTT (200 μM). Data are represented as means \pm SEM
10 from 9 and 8 different experiments for PM and H_2O_2 , respectively. * $p < 0.01$, statistically
11 different from control without PM ($199.92 \pm 11.30 \mu\text{M}$). (B) Rate of DTT loss of different
12 batches of PM and their metallic compounds, Cu(II), Fe(II), Fe(III), Zn(II), and Al(III), in
13 quantities found in their respective PM batches (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Data are represented as means \pm
14 SEM ($n=5$). * $p < 0.01$ vs control condition (i.e., without PM or metals).

15

16 **Figure 4: The anti-apoptotic effect of PM-AW is specifically enhanced by reduced**
17 **glutathione.** (A) 16HBE cells were exposed 4 h to PM-AW (10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) and/or antioxidants
18 (50 mM D-mannitol, 100 μM MnTBAP, 10 mM GSH, and GSSG 10 mM) before induction of
19 apoptosis by A23187 (3 μM) for additional 20 h. Apoptosis was assessed by flow cytometry
20 and expressed as induction of specific apoptosis for $\Delta\Psi\text{m}$ drop and ROS production
21 (DiOC₆(3) low and HE high staining). Line: value of specific apoptosis induced by A23187
22 ($58.24 \pm 5.27\%$). Results are means \pm SEM ($n = 3$). * Statistically different from
23 Medium/A23187+PM-AW condition with $p < 0.001$. (B) 16HBE cells were exposed 4 h to
24 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ of PM-AW and different doses of GSH (0-10 mM) before induction of apoptosis by
25 A23187 (3 μM) for 20 h. Apoptosis was assessed by flow cytometry and expressed as

35

1 induction of specific apoptosis for DiOC₆(3) low staining. Data are represented as means ±
2 SEM from 3 different experiments. Significance was calculated with respect to control
3 condition (without GSH, * $p < 0.05$).

4

5 **Figure 5: Total glutathione (GSH+GSSG) level.** 16HBE cells were exposed or not to PM-
6 AW (10 µg/cm²), Fe(II) (660 ng/mL), or PM-VS (10 µg/cm²) for 4 h before induction of
7 apoptosis with A23187 (3 µM) for 2 hours. H₂O₂ (1 mM, 4 h) was used as positive control of
8 induced apoptosis and oxidative stress. Line: level of total glutathione with A23187 alone
9 (8.65 ± 5.275 nmol/10⁶ cells). Shown are means ± SEM (n = 3). * Significantly different
10 from Medium/None and § significantly different from Medium/A23187 with $p < 0.05$.

11

12 **Figure 6: Intracellular localization of Nrf2 in control and treated 16HBE cells.** (A)
13 Double-labeling immunofluorescence analysis of Nrf2 (green), actin (red), and nuclei (blue)
14 detected on 16HBE cells exposed for 4 h to PM-AW (10 µg/cm²), Fe(II) (660 ng/mL), or
15 PM-VS (10 µg/cm²). Merged images of nuclei and Nrf2 allowed visualization of nuclear
16 distribution (white arrows). (B). Quantification of Nrf2 nuclear localization in 16HBE cells
17 treated for the indicated times with 10 µg/cm² of PM-AW or PM-VS or 660 ng/mL Fe(II).
18 Data are means ± SEM from 3 different experiments. * Statistically different from control
19 condition (7.34 ± 1.62) with $p < 0.05$.

20

21 **Figure 7: Expression of Nrf2 and antioxidant target genes in cells exposed to PM-AW,**
22 **Fe(II), and Cu(II).** Normalized mRNA ratio of Nrf2, HO1, NQO1, SOD2, GSTP1, and
23 GPx1 were measured by quantitative PCR in 16HBE cells exposed 0.5-4 h to 10 µg/cm² of
24 PM-AW (A), 660 ng/mL Fe(II) (B), or 43 ng/mL Cu(II) (C). GAPDH and B2M were used as

36

1 reference genes for the calculation of normalized mRNA ratio. Data are expressed as means \pm
2 SEM (n=3), and * p <0.001, significantly different from control (Co).

3

4 **Figure 8: Effect of PM-AW and Fe(II) on antioxidant genes expression during A23187-**
5 **induced apoptosis.** Normalized mRNA ratio of Nrf2, HO1, NQO1, and GPx1 were
6 measured by quantitative PCR in 16HBE cells exposed for 4 h to 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ of PM-AW (A)
7 or 660 ng/mL Fe(II) (B) before apoptosis was induced by A23187 (3 μM) over the various
8 specified times. GAPDH and B2M were used as reference genes for the calculation of
9 normalized mRNA ratio. Data are expressed as mean \pm SEM (n=3), and * p <0.01,
10 significantly different from control (Co).

11

12 **Figure 9: Proposed mechanistic model of the anti-apoptotic effect of PM.** Exposure of
13 bronchial epithelial cells to PM leads to particle endocytosis, PAH desorption, and
14 solubilization of metallic compounds. Low levels of metals produce low amounts of ROS and
15 activate Nrf2, which translocates to the nucleus to bind to specific antioxidant response
16 elements (ARE). The activation of Nrf2 allows upregulation of itself as well as antioxidant
17 genes such as HO1, NQO1, and GPx1 and the maintenance of GSH levels that may
18 counteract mitochondrial membrane permeabilization (MMP) and subsequent apoptosis.
19 Moreover, desorbed PAH activate the AhR pathway, which regulates the expression of
20 xenobiotic response element (XRE)-dependent genes and/or might further activate the
21 transcription factor Nrf2. Illustration carried out using Servier Medical Art.

22

Table 1: Metal concentrations in various PM samples and experimental doses.

Metal content	Total	Cu	Fe	Mn	Zn	Al	Ca	Mg	Pb
PM-AW (mg/g) ^a	67.36	0.86	13.20	0.16	1.50	3.40	19.50	1.60	0.25
Dose used in experiments (ng/mL) ^b	43	660	8	75	170	975	80	12.5	
PM-AS (mg/g) ^c	106.68	1.23	26.3	0.37	1.7	10.5	36.2	3.6	0.42
Dose used in experiments (ng/mL) ^b	61.5	1315	ND	85	525	ND	ND	ND	ND
PM-VW (mg/g) ^d	120.29	0.37	13.5	0.42	1.3	10.4	59.6	4.3	0.52
Dose used in experiments (ng/mL) ^b	18.5	675	ND	65	520	ND	ND	ND	ND
PM-VS (mg/g)	193.26	0.40	21.60	0.54	1.30	20.40	110.6	6.7	0.43
Dose used in experiments (ng/mL) ^b	20	1080	27	65	1020	5530	335	21.5	

^a From [42]; ^b (*qs* 10 µg/cm² or 50 µg/mL of PM); ^c From [64]; ^d From [65]; ND: not done.

Table 2: Correlation coefficients (Pearson) between DTT oxidation activity and A23187-induced apoptosis.

DTT oxidation	A23187-induced apoptosis	
	PM-AW	PM-VS
Whole PM	0.859	0.526
Cu(II)	0.950	0.423
Fe(II)	0.981	-0.118
Fe(III)	0.760	0.344
Zn(II)	-0.114	-0.476
Al(III)	-0.828	-0.410

Data are presented for dose-effect experiments with PM-AW, PM-VS, and their metallic compounds *quantum satis*: Cu(II), Fe(II), Fe(III), Zn(II), and Al(III). DTT oxidation refers to unoxidized DTT concentrations assessed *in vitro*. Apoptosis triggered by A23187 treatment (3 μ M) was quantified *in cellulo* by flow cytometry using dissipation of $\Delta\Psi_m$ (DiOC6(3) low staining) and superoxide anion production (HE high staining). Bold values represent a statistical correlation ($p < 0.05$).

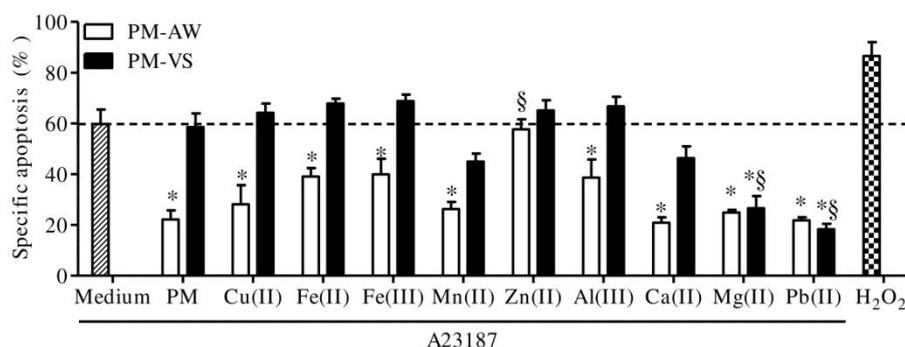


Figure 1

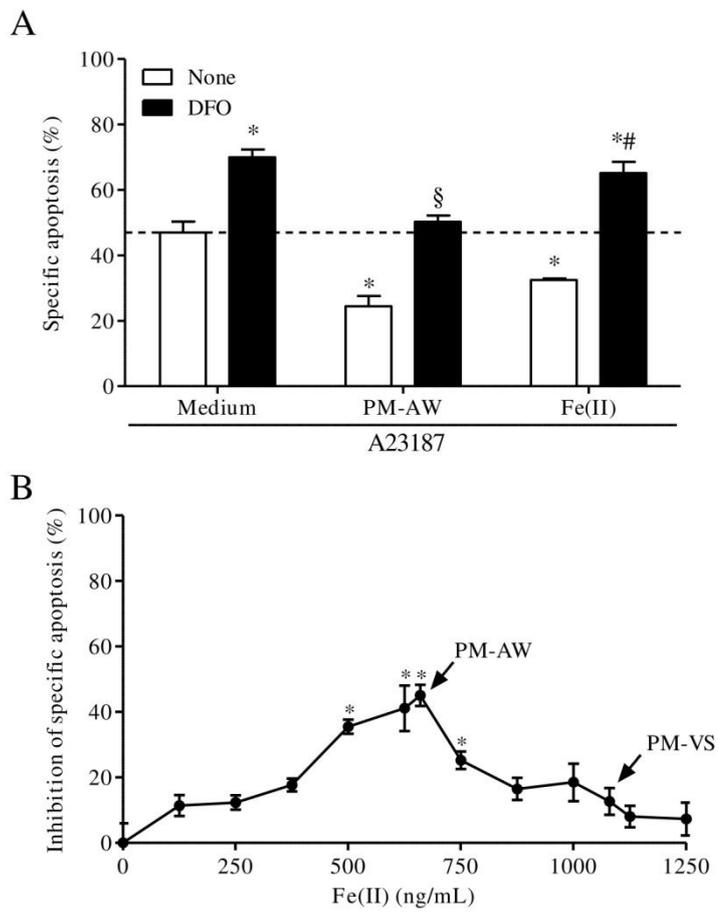
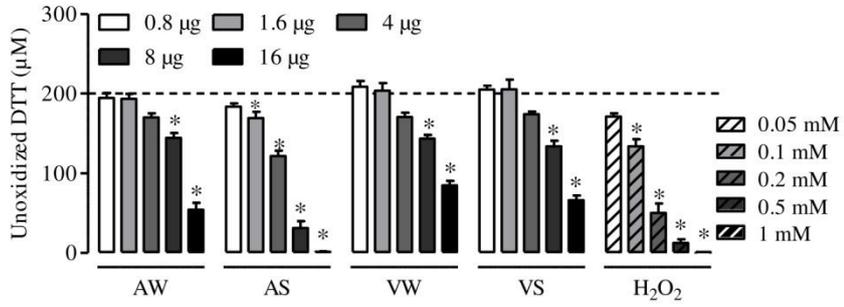


Figure 2

A



B

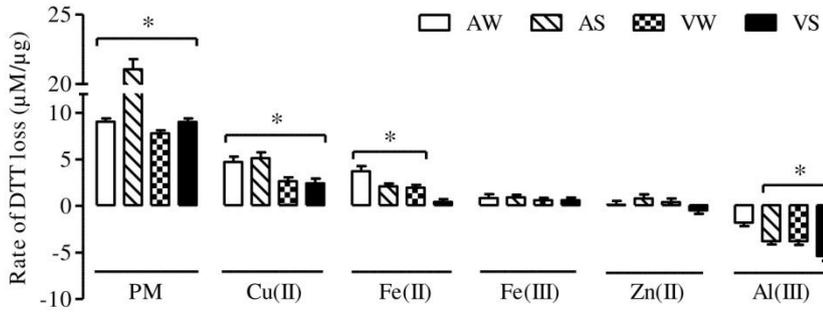


Figure 3

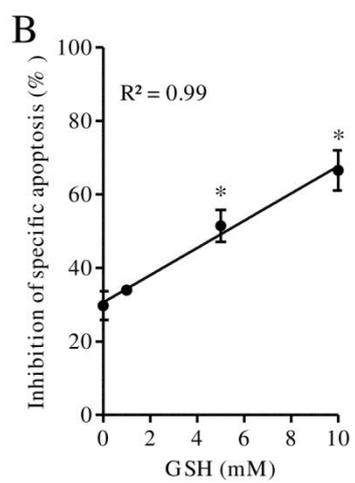
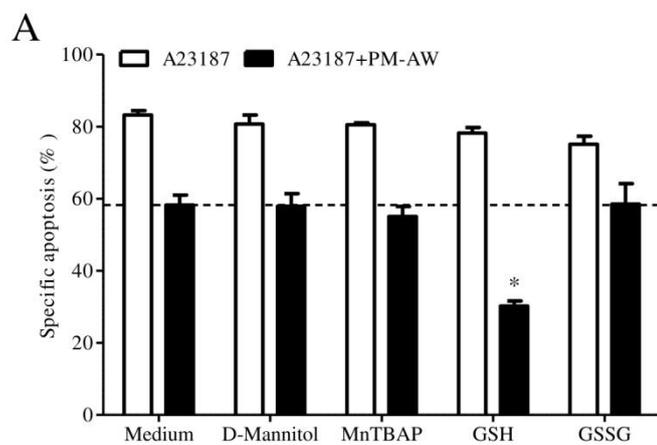


Figure 4

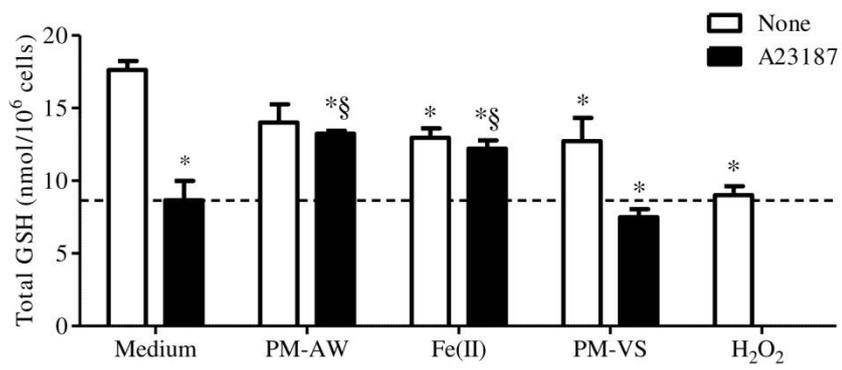


Figure 5

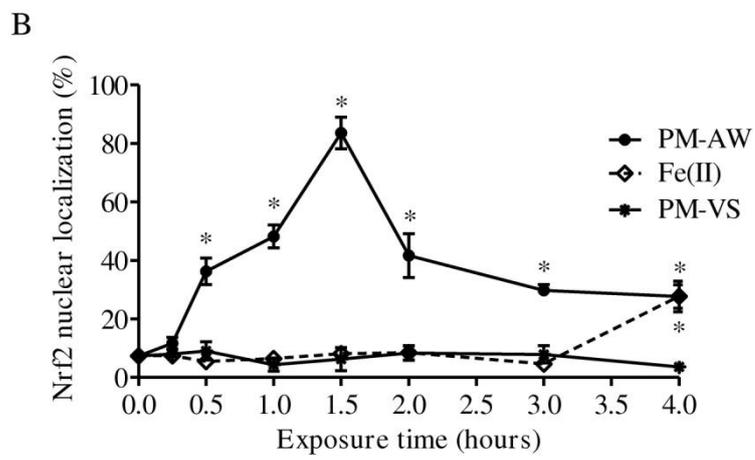
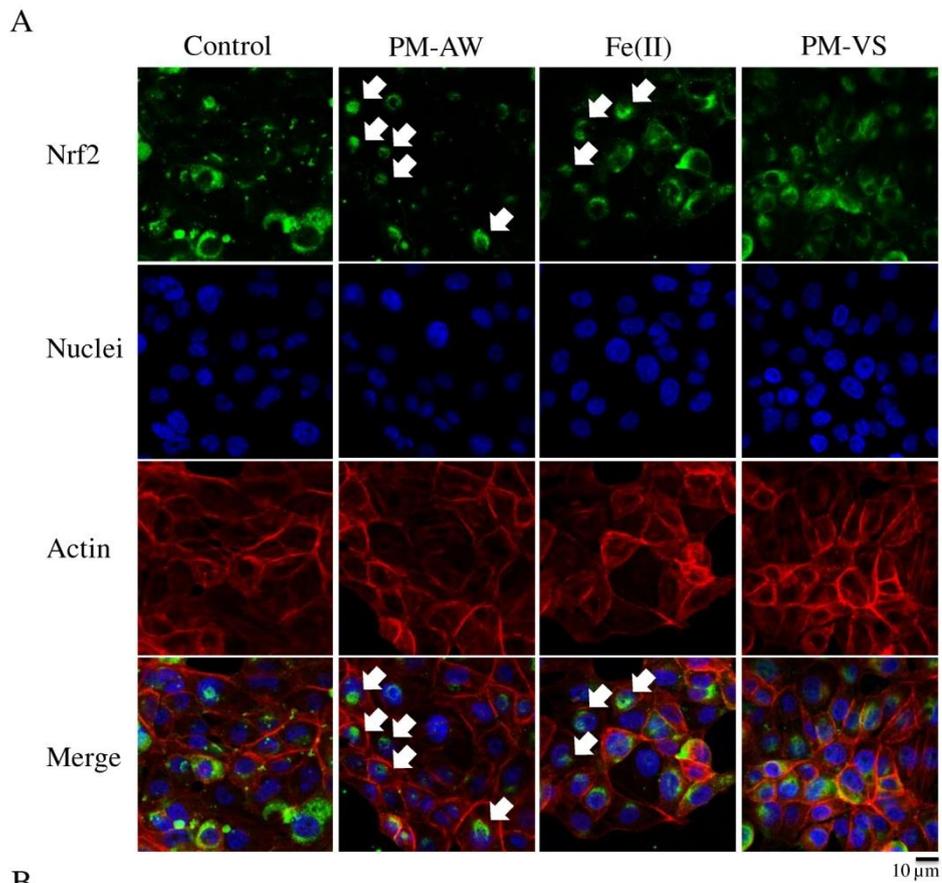


Figure 6

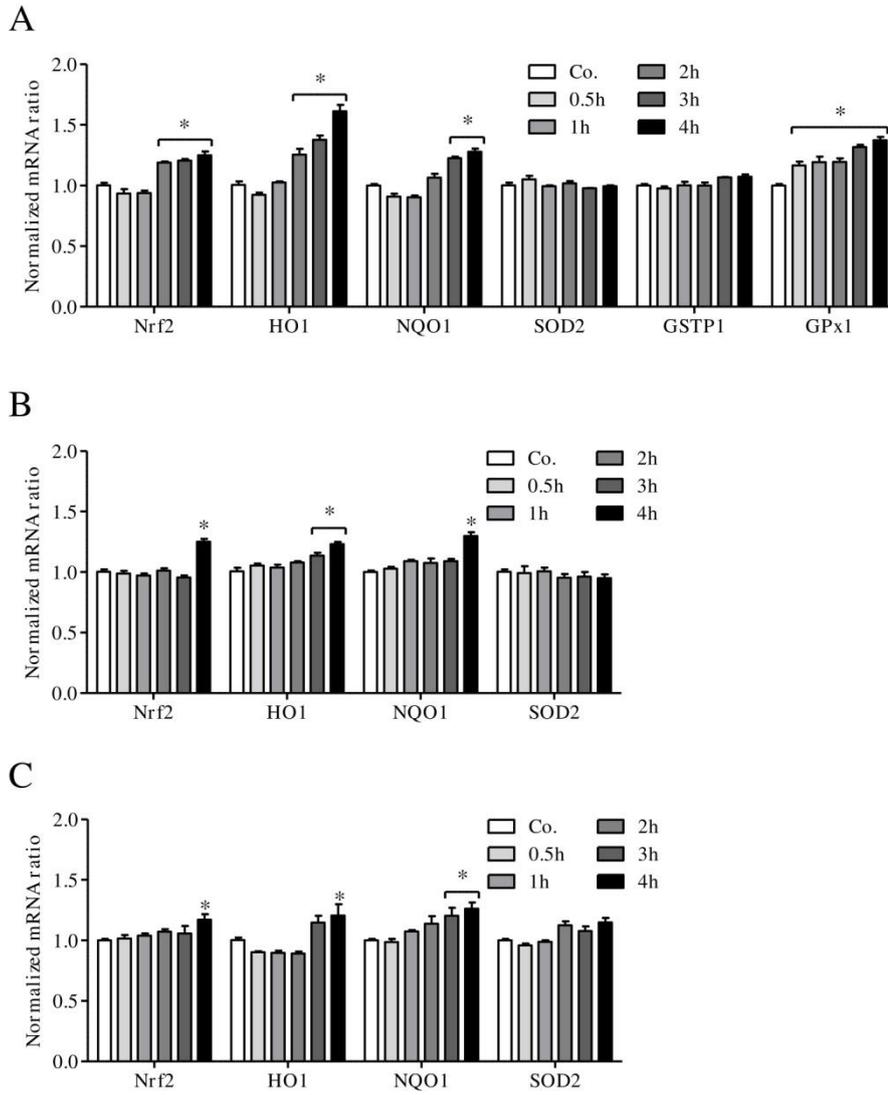


Figure 7

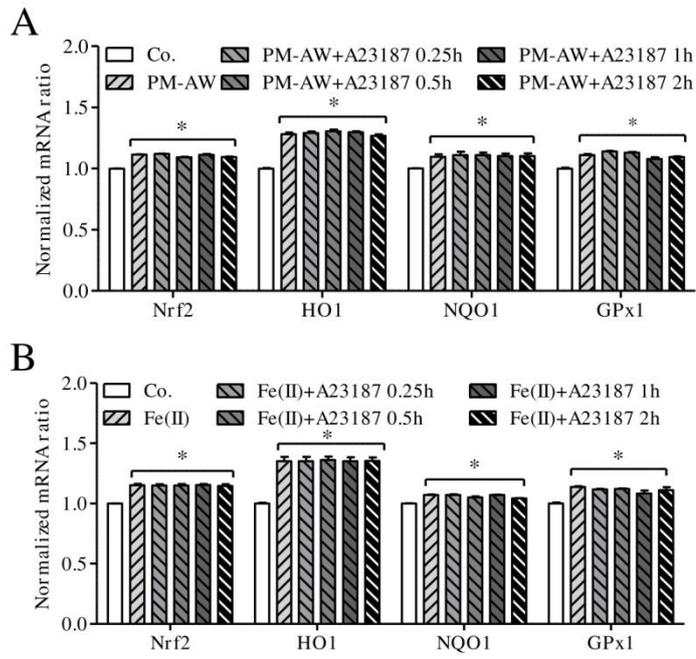


Figure 8

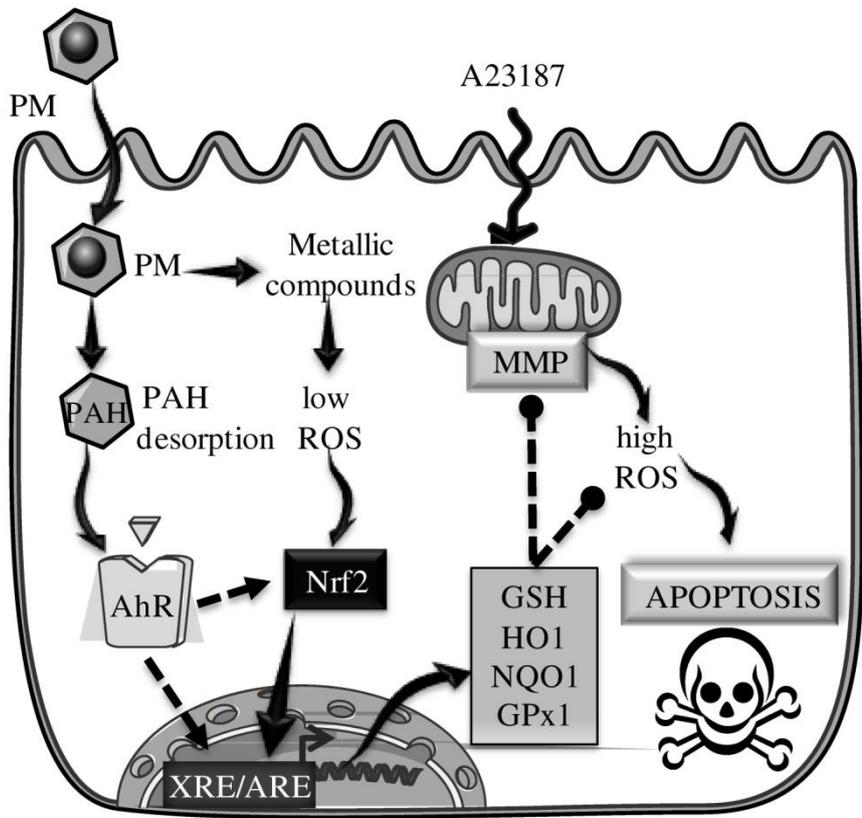
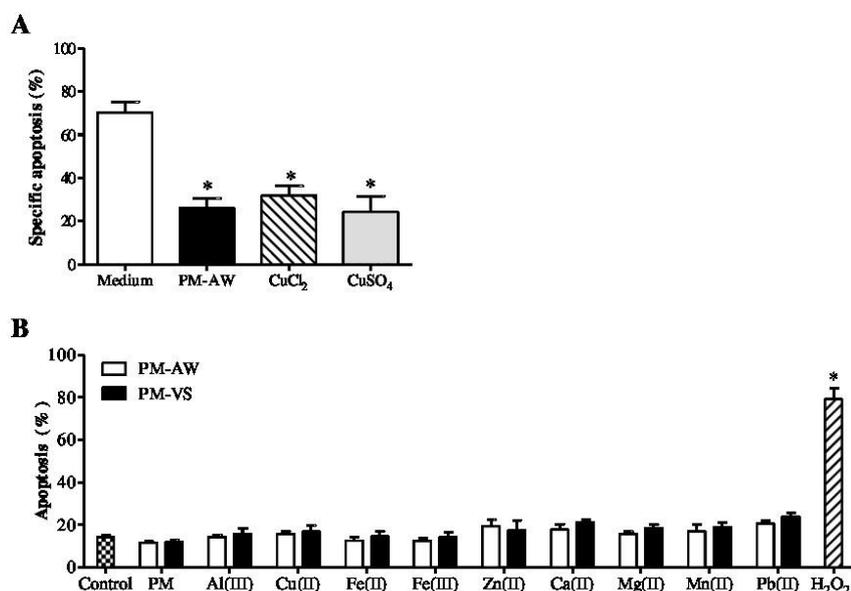
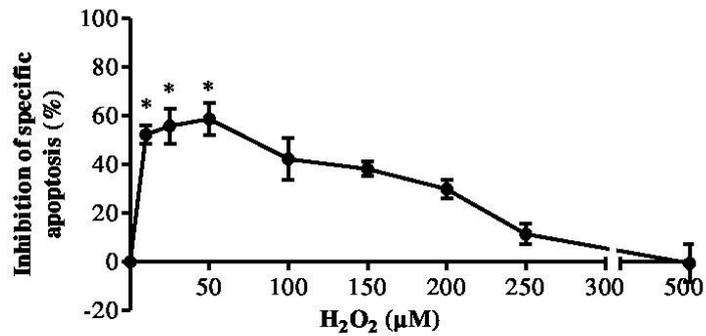


Figure 9

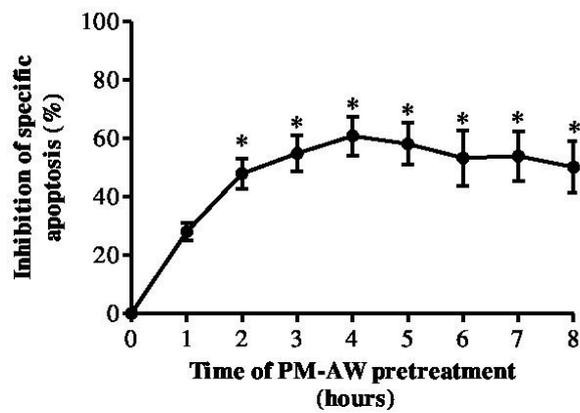


Additional file 1: Effect of metals and their salt forms on the apoptosis of 16HBE cells.

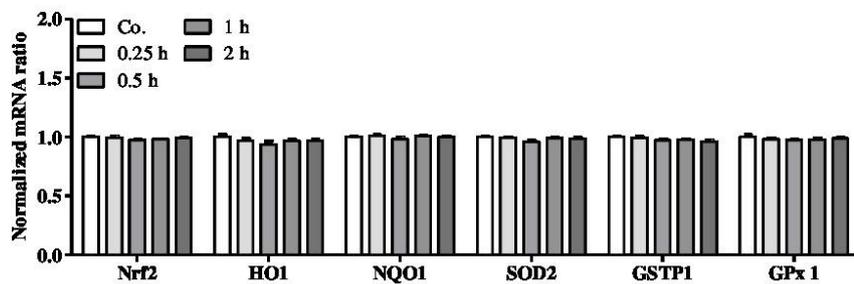
(A) 16HBE cells were exposed for 4 h to PM-AW (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) or quantum satis Cu(II) as chloride (CuCl₂) or sulfate (CuSO₄) salt before addition of A23187 (3 μM) for additional 20 h. Quantification of apoptosis by flow cytometry was performed to assess $\Delta\Psi\text{m}$ drop (DiOC6(3) low staining) and superoxide anion production (HE high staining). Data are represented as means \pm SEM from 3 different experiments. * Statistically different from Medium condition with $p < 0.001$. (B) 16HBE cells were exposed 24 h to 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ of whole PM or to different metals at the dose found in 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ of PW-AW or PM-VS (see Table 1 for details). H₂O₂ (1 mM) was used here as positive control for apoptosis.



Additional file 2: Dose-effect study of H₂O₂ on A23187-induced apoptosis. 16HBE cells were exposed for 4 h to different doses of H₂O₂ (0-500 μM) before induction of apoptosis by A23187 (3μM) for additional 20 hours. The inhibition of specific apoptosis induced by A23187 was determined by flow cytometry assessing ΔΨ_m drop (DiOC6(3) low) and superoxide anion production (HE high). Data are represented as means ± SEM from 3 different experiments. * Statistically different from control condition (A23187 alone without H₂O₂) with p<0.001.



Additional file 3: Kinetic study of the anti-apoptotic effect of PM-AW. 16HBE cells were exposed for the specified hours to PM-AW ($10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) before induction of apoptosis by A23187 ($3\mu\text{M}$) for 20 hours. The inhibition of specific apoptosis induced by A23187 was determined by flow cytometry assessing $\Delta\Psi\text{m}$ drop (DiOC₆(3) low) and superoxide anion production (HE high). Data are represented as means \pm SEM from 3 different experiments. * Statistically different from control condition (A23187 alone) with $p < 0.001$.

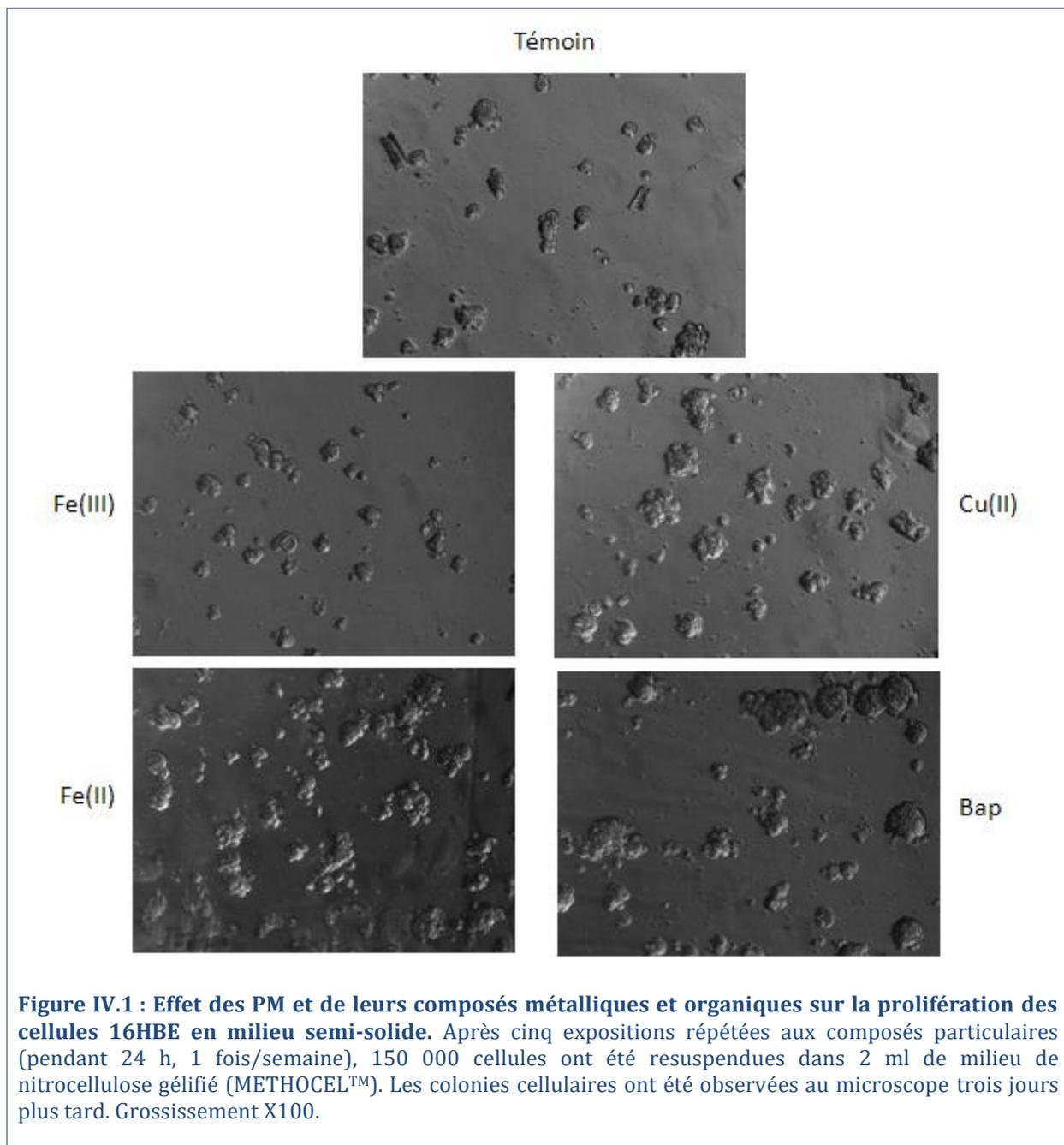


Additional file 4: Expression of antioxidant genes during A23187-induced apoptosis. Normalized mRNA ratio of Nrf2, HO1, NQO1, SOD2, GSTP1, and GPx1 were measured by quantitative PCR in human bronchial epithelial (16HBE) cells exposed for 0.25-2 h to A23187 (3 μ M). GAPDH and B2M were used as reference genes for the calculation of normalized mRNA ratio. Data are expressed as means \pm SEM (n=3).

IV.2.3) Résultat supplémentaire & Discussion

Cette étude nous permet de proposer un modèle, pour les mécanismes de l'effet anti-apoptotique des particules atmosphériques, impliquant : d'une part les HAP, *via* la translocation nucléaire du facteur de transcription AhR (Aryl hydrocarbon Receptor) et la transcription des gènes cibles possédant l'élément de réponse aux xénobiotiques (XRE) (*Ferecatu et al. 2010*); d'autre part les métaux, *via* l'induction d'une réponse adaptative anti-oxydante et l'activation subséquente du facteur de transcription Nrf2 qui conduit à la surexpression des gènes HO1, NQO1 et GPx1. De plus, plusieurs études ont démontré qu'il existe une interaction entre les voies de signalisation du AhR et de Nrf2. En effet, ces deux facteurs de transcription ont des gènes cibles en commun (*Surh 2003*) tels que Nrf2 (*Miao et al. 2005; Hayes et al. 2008*), GST (*Hayes et al. 1995*) et NQO1 (*Begleiter et al. 2002*). Enfin, il semblerait que Nrf2 et AhR peuvent interagir physiquement en tant que cofacteurs (*Wang, L. et al. 2013*), ou bien que le AhR peut aussi fixer l'ARE (*Niestroy et al. 2011*). Par ailleurs, il a été démontré que le benzo(a)pyrène peut réguler négativement la transcription de Keap1 et donc participer à l'activation de Nrf2 (*Nguyen et al. 2010*).

Cette réponse adaptative peut conduire à la survie cellulaire et la cancérogenèse. En effet, l'implication de la production d'ERO, ainsi que l'activation de Nrf2 dans l'initiation de la cancérogenèse, ont largement été démontrées, en particulier dans les cancers du poumon (*Sporn et al. 2012; Bauer et al. 2013; Ganan-Gomez et al. 2013*). Ainsi, nous avons fait l'hypothèse que les composés métalliques des PM auraient la capacité de transformer les cellules épithéliales bronchiques normales en cellules précancéreuses, de par leur acquisition de caractéristiques spécifiques comme la résistance à l'apoptose. Afin de conforter cette hypothèse, nous avons cultivé les cellules dans un milieu de nitrocellulose gélifié (METHOCEL™), après des traitements successifs aux composés particuliers. Des observations au microscope nous ont permis d'analyser les résultats de manière qualitative. Les cellules 16HBE étant des cellules adhérentes, en conditions normales elles ne peuvent pas pousser en suspension sauf si elles subissent des mutations leur conférant la capacité de proliférer. Hors, la perte de l'adhérence, et le potentiel répliatif désordonné sont des caractéristiques des cellules en voie de cancérisation (voir § I.4.4). Les résultats montrent que le Fe(II), le Cu(II) et le BaP, mais pas le Fe(III) ont permis aux cellules de proliférer dans le milieu de nitrocellulose et de former des colonies (**Figure IV.7**).



En plus de protéger de la mort cellulaire, les composés particulaires semblent donc induire des modifications cellulaires telles que les cellules acquièrent la capacité de proliférer en absence d'adhérence.

Pour conclure, notre étude permet de mettre en lumière l'effet délétère des mélanges et des faibles doses de toxique, surtout dans la cancérogenèse. Une interaction possible entre AhR et Nrf2 suggère un effet additif des composants organiques et métalliques, sur la réponse adaptative anti-oxydante, pouvant conduire à la survie cellulaire et à l'initiation de la cancérogenèse.

IV.3) RESULTATS SUPPLEMENTAIRES

Sachant que les particules inhibent l'apoptose induite par le ionophore calcique A23187 et que l'internalisation des PM, notamment des nanoparticules, a été montrée dans les cellules épithéliales pulmonaires humaines par macropinocytose (*Vranic et al. 2013*), nous nous sommes aussi intéressés au rôle de la voie de signalisation calcique et des interactions éventuelles entre le cytosquelette et les particules.

IV.2.1) Rôle du calcium dans l'effet anti-apoptotique

Les PM-AW ($10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) inhibent spécifiquement l'apoptose induite par A23187 mais pas celle déclenchée par la ionomycine (*Ferecatu et al. 2010*), nous avons donc cherché à savoir quel était l'effet des particules anti-apoptotiques (PM-AW, PM-AS et PM-VW) et non-anti-apoptotiques (PM-VS) sur l'augmentation du calcium intracellulaire induite par l'A23187 (**Figure IV.2**). Pour cela, les cellules ont été prétraitées 4h avec 10 et $50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de particules, avant la mesure du taux de calcium intracellulaire des cellules 16HBE (grâce au fluorochrome Fluo-4) et l'ajout d'A23187 ($5 \mu\text{M}$). La fluorescence est lue immédiatement après l'injection grâce à la FlexStation®3 (voir § II.5.1).

L'A23187 déclenche l'apoptose en induisant une augmentation importante et immédiate du Ca^{2+} intracellulaire qui se stabilise au bout de quelques minutes. Cette augmentation du Ca^{2+} est significativement diminuée par les PM-AW à la concentration de $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ et par les 4 lots de PM à $50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (**Figure IV.2**).

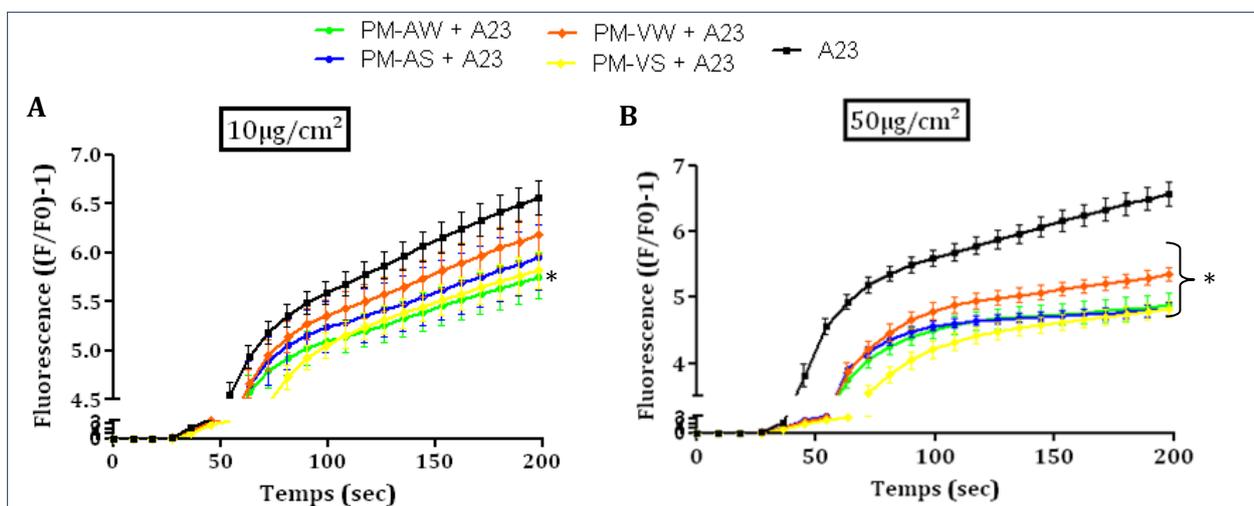
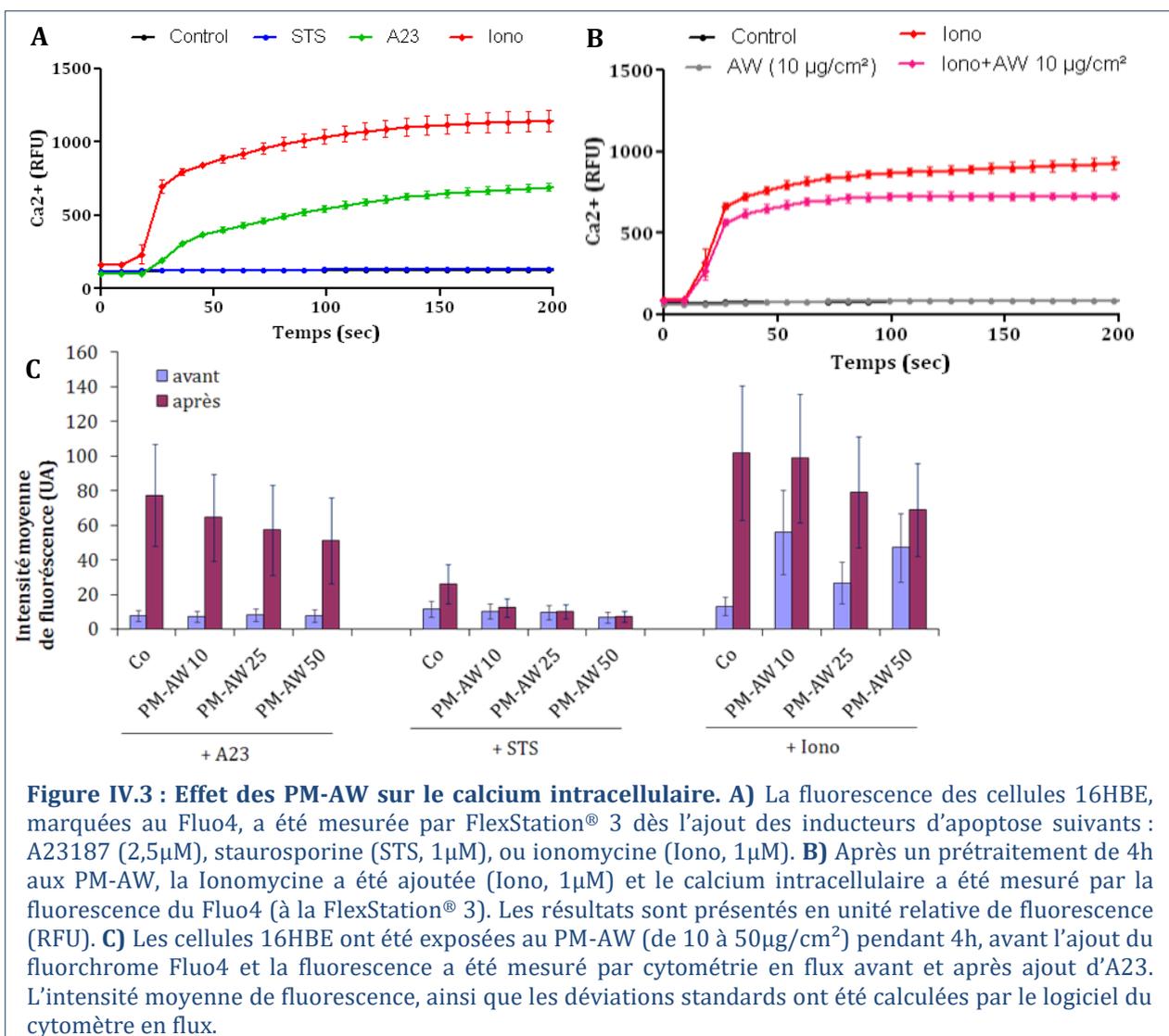


Figure IV.2 : Effet des PM_{2.5} sur le pic de calcium induit par A23, dans les cellules 16HBE. Les cellules 16HBE ont été exposées pendant 4h aux particules à $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (A) ou $50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (B), avant l'ajout du fluorochrome Fluo4, marquant le calcium intracellulaire, puis l'inducteur d'apoptose A23187 ($5 \mu\text{M}$) a été ajouté juste avant la lecture de la fluorescence en cinétique. Les résultats sont présentés comme la fluorescence relative par rapport au témoin. * traité vs A23187 seul, $n=24$, $p<0,05$.

L'augmentation du Ca^{2+} intracellulaire a également été retrouvée avec un autre ionophore calcique : l'ionomycine ($1 \mu\text{M}$), mais pas avec la staurosporine (STS, $1 \mu\text{M}$) qui est un inducteur d'apoptose inhibant les protéines kinases calcium dépendantes (**Figure IV.3 A**). De

manière intéressante, les PM-AW semblent réduire l'augmentation de Ca^{2+} provoquée par l'ionomycine (**Figure IV.3 B**) alors qu'elles ne protègent pas contre l'apoptose induite par cet inducteur (*Ferecatu et al. 2010, Annexe 1*). A l'inverse, les PM-AW protègent de l'apoptose induite par STS, qui n'induit pas d'augmentation calcique (*Ferecatu et al. 2010, Annexe 1* et **Figure IV.3 A**).

Ces résultats contradictoires posent la question d'une interaction entre les PM non internalisées dans les cellules 16HBE et le fluorochrome Fluo-4 qui provoquerait l'extinction de sa fluorescence. Afin de tester cette hypothèse, des mesures de Ca^{2+} intracellulaire ont été réalisées par cytométrie en flux. Pour cela, les cellules 16HBE ont été exposées au PM-AW (de 10 à 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) pendant 4h, avant l'ajout du Fluo-4 et l'intensité de sa fluorescence a été mesurée par cytométrie en flux avant et après ajout des inducteurs d'apoptose (A23187, STS, et Iono) (**Figure IV.3 C**).



Les résultats confirment que les deux ionophores calciques (A23 et Iono) augmentent le taux de Ca^{2+} intracellulaire qui est diminué par les PM-AW (**Figure IV.3 C**). Comme la technique de cytométrie en flux quantifie l'intensité de fluorescence du Fluo-4 spécifiquement émise par

les cellules, ceci suggère que les PM-AW peuvent contrecarrer légèrement l'augmentation de Ca^{2+} intracellulaire de manière dose-dépendante.

Les PM_{2.5} semblent donc capables de réguler le flux calcique intracellulaire de manière dose-dépendante.

[IV.2.2\) Interaction particules / cytosquelette](#)

Sachant que l'augmentation du Ca^{2+} intracellulaire peut induire des réarrangements du cytosquelette, en particulier sur le réseau d'actine (*Saneyoshi et al. 2012*) et que les évènements précoces de l'apoptose s'accompagnent d'une stabilisation du réseau de microtubules (*Aslan et al. 2009*), il nous a semblé intéressant d'initier des expériences sur l'effet des PM-AW anti-apoptotiques sur l'organisation des microtubules et des filaments fins d'actine.

Nous avons tout d'abord examiné l'impact des inducteurs d'apoptose A23187 et STS sur les réseaux d'actine et tubuline (**Figure IV.4**). Après 1h d'exposition à l'A23187, les cellules commencent à présenter des *foci* de polymérisation intense des microtubules, ce phénomène s'accroissant jusqu'à 4 heures. Parallèlement, l'A23187 semble augmenter la fluorescence de l'actine corticale et des fibres de stress. Dans le cas de l'apoptose induite par la STS, les cellules 16HBE présentent une morphologie très altérée après 1 heure de traitement, des microtubules et un réseau d'actine désorganisé (**Figure IV.4**).

A l'inverse, l'exposition des cellules 16HBE aux PM-AW ($10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) pendant 1 ou 4 heures ne semble pas impacter la structure du réseau d'actine (**Figure IV.5**).

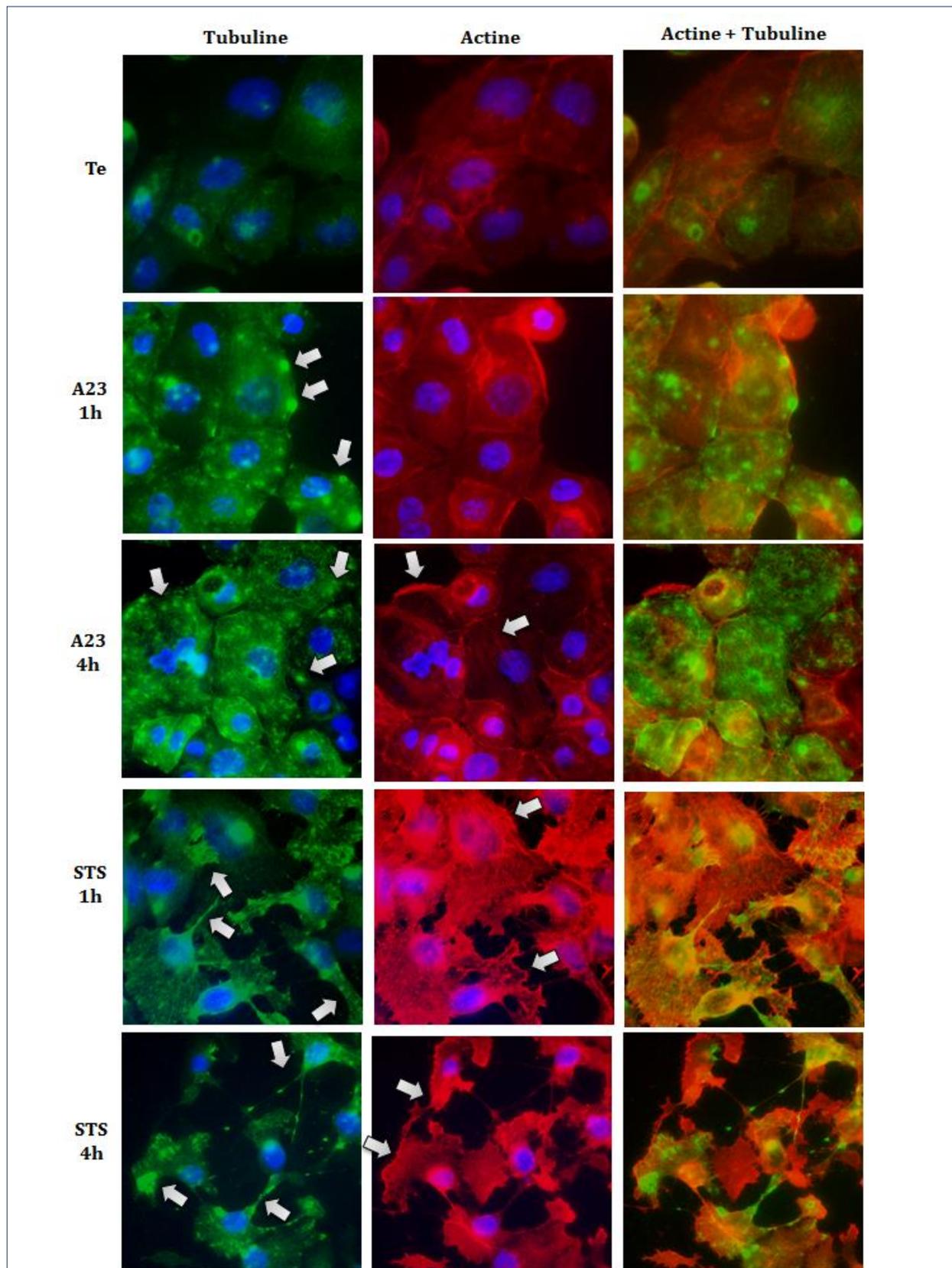


Figure IV.4 : Effet des inducteurs d'apoptose sur l'actine et la tubuline des cellules 16HBE. Les cellules 16HBE ont été exposées pendant 1h ou 4h aux inducteurs d'apoptose A23 (3 μ M) ou STS (1 μ M) puis fixées et marquées avec la phalloïdine-rhodamine pour l'actine et avec un anticorps secondaire couplé au fluorochrome FITC pour la tubuline, avant d'être observées en microscopie électronique à fluorescence.

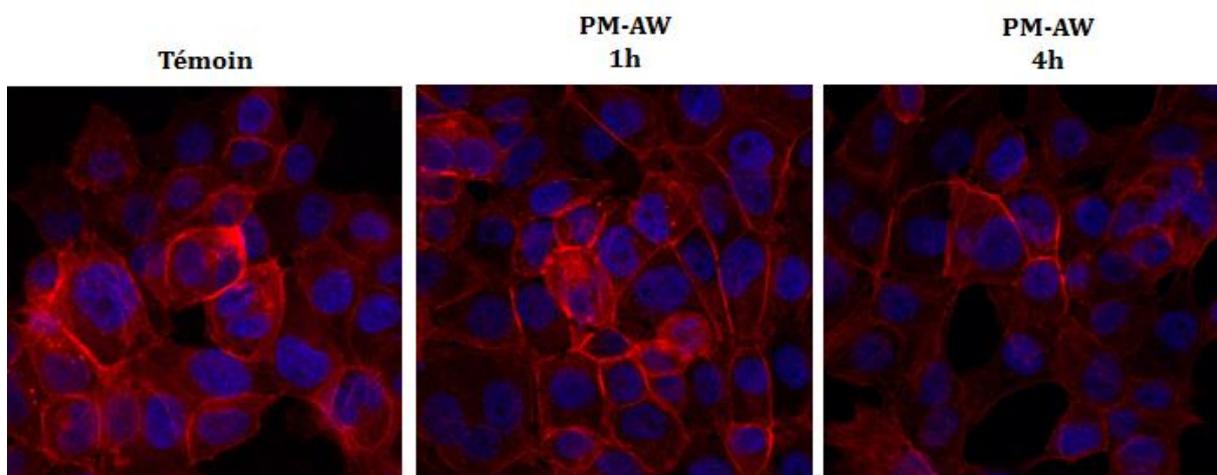


Figure IV.5 : Effet des PM-AW sur l'actine des cellules 16HBE. Les cellules 16HBE ont été exposées pendant 1h ou 4h aux PM-AW ($10\mu\text{g}/\text{cm}^2$), puis fixées et marquées avec la phalloïdine-rhodamine 132, avant d'être observées en microscopie électronique à fluorescence.

L'étude des conséquences d'une exposition aux PM-AW ($10\mu\text{g}/\text{cm}^2$) sur la morphologie des cellules 16HBE dans le cadre de leur effet anti-apoptotique a été réalisée par leur observation par microscopie électronique à balayage (MEB, **Figure IV.6 et IV.7**). Les observations en MEB confirment que les cellules 16HBE possèdent des microvillosités (flèches vertes, **Figure IV.6 A**). On peut observer qu'après 4h d'exposition aux PM-AW ($10\mu\text{g}/\text{cm}^2$), les microvillosités ont une forte interaction avec les particules, qui se fixent aux cellules et forment des agrégats (flèches bleues, **Figure IV.6 B**), mais les cellules gardent leur intégrité morphologique.

Dès 1h d'exposition au A23187, les cellules commencent à présenter des modifications morphologiques visibles, caractéristiques de l'apoptose, notamment la formation de bourgeons membranaires (« blebbing », flèches rouges) et la perte des microvillosités (**Figure IV.6 C**). Ces deux phénomènes tendent à diminuer lors du prétraitement par les PM-AW ($10\mu\text{g}/\text{cm}^2$ pendant 4h, **Figure IV.6 D**).

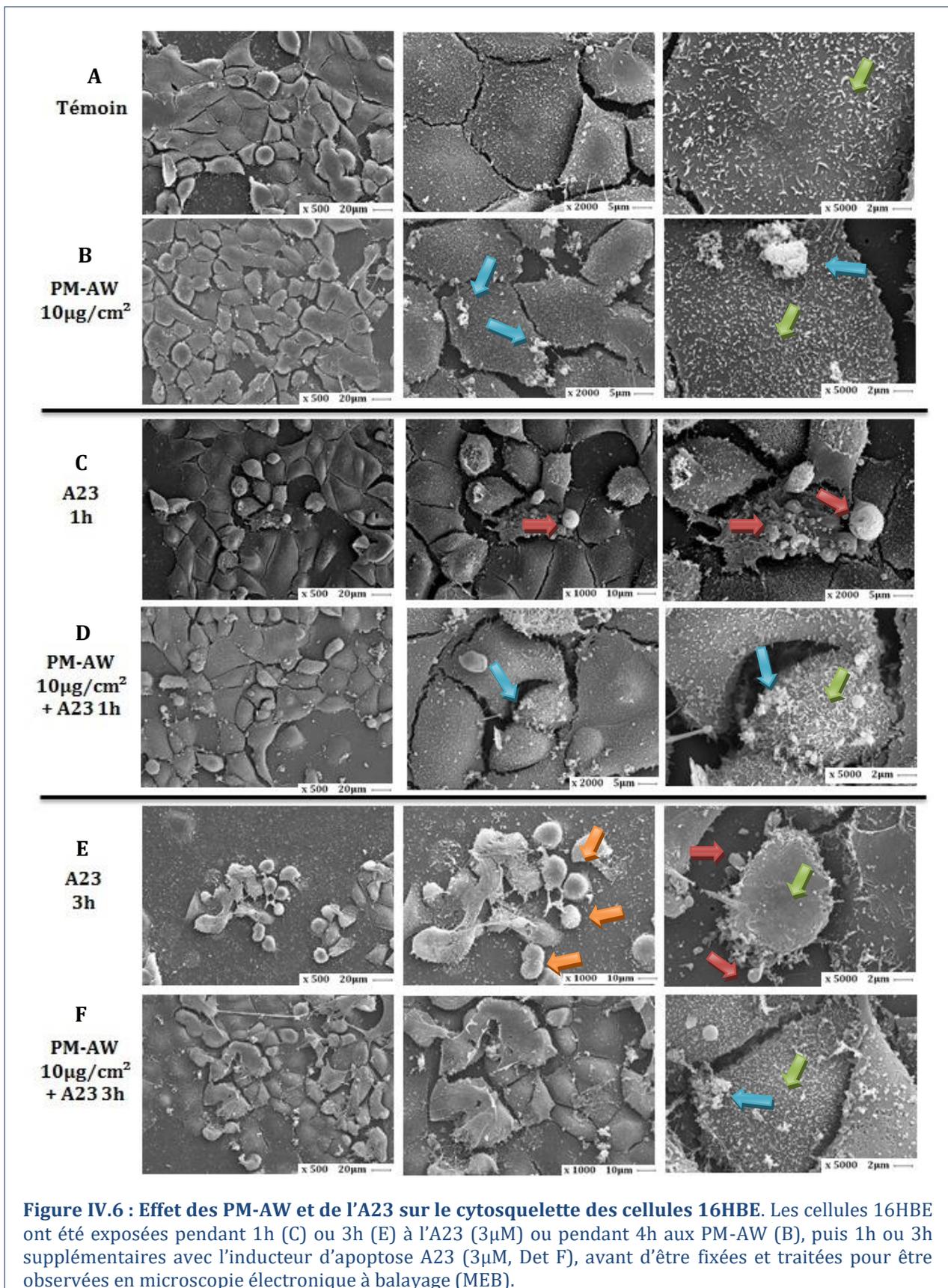
Après 4h de traitement, l'A23187 induit clairement une mort apoptotique (**Figure IV.6 E**), caractérisée par le détachement des cellules (elles sont rondes, flèches oranges), la formation de bourgeons (« blebbing », flèches rouges), et la perte de leurs microvillosités (flèches vertes). Le prétraitement des cellules par les PM-AW (4h à $10\mu\text{g}/\text{cm}^2$) a visiblement permis de diminuer l'apoptose des cellules et de maintenir leur intégrité morphologique (**Figure IV.6 F**).

Concernant l'apoptose induite par la STS, dès 1h des modifications morphologiques importantes au niveau des microvillosités apparaissent (**Figure IV.7 C**), celles-ci sont beaucoup moins nombreuses et très allongées (flèches vertes). Le prétraitement aux PM-AW montre que les microvillosités allongées ont une très forte interaction avec les particules (**Figure IV.7 D**).

Après 4h de traitement par la STS, les cellules 16HBE meurent en prenant une morphologie très « dendritique » (**Figure IV.7 E**, flèches rouges) comme observées en immunofluorescence (voir **Figure IV.4**) et perdent leurs microvillosités à la surface de la membrane plasmique (flèche verte). Comme pour l'A23187, le prétraitement aux PM-AW a

clairement protégé des cellules des altérations morphologiques induites par le STS (**Figure IV.7 F**).

Ainsi, les PM-AW protègent les cellules des altérations du cytosquelette et morphologiques provoquées par les inducteurs d'apoptose.



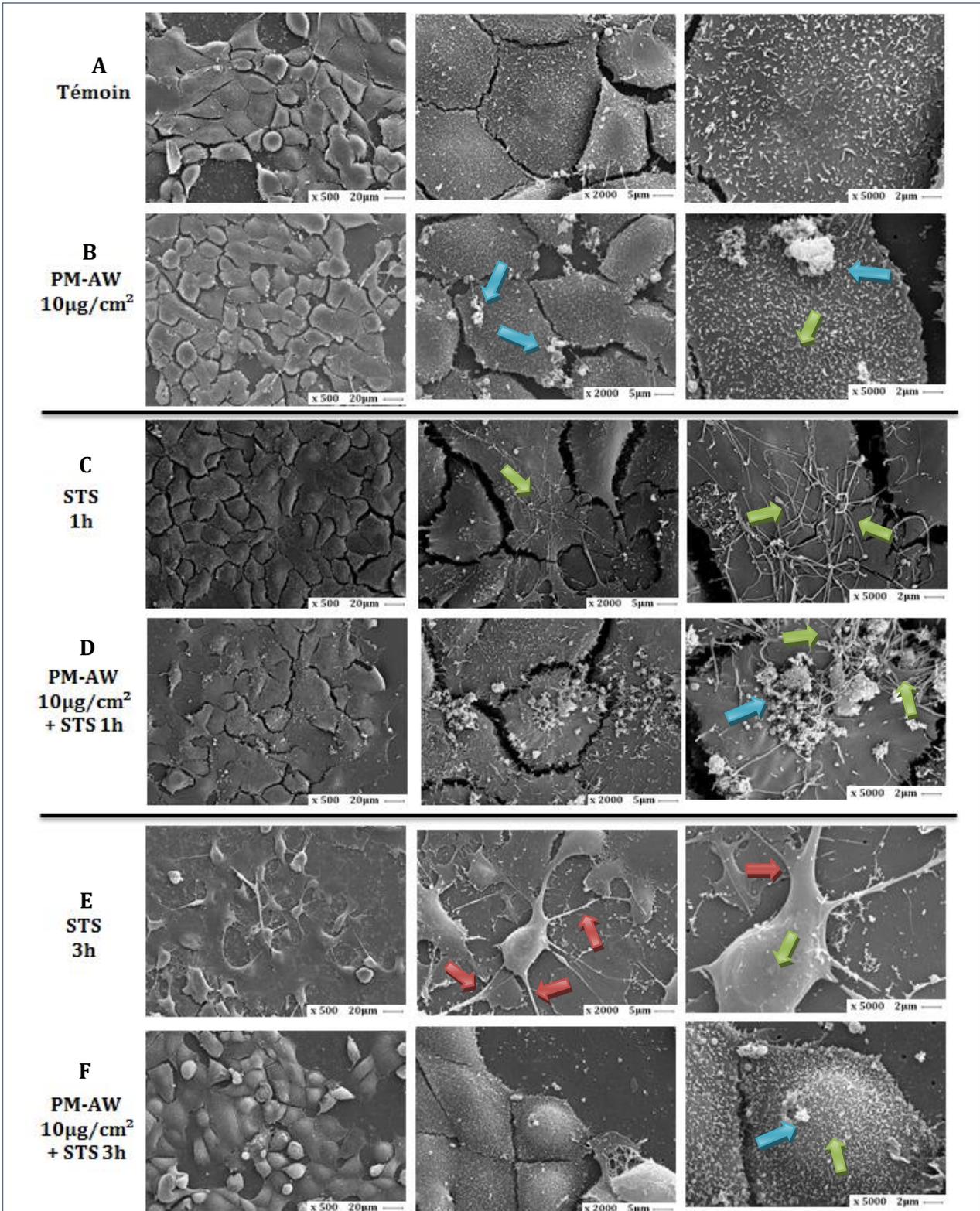


Figure IV.7 : Effet des PM-AW et du STS sur le cytosquelette des cellules 16HBE. Les cellules 16HBE ont été exposées pendant 1h (C) ou 3h (E) au STS (1µM) ou pendant 4h aux PM-AW (B), puis 1h ou 3h supplémentaires avec l'inducteur d'apoptose STS (1µM, Det F), avant d'être fixées et traitées pour être observées en microscopie électronique à balayage (MEB).

IV.2.2) Discussion

Pour résumer, nous avons montré que les particules, notamment les PM-AW, sont capables de réduire l'augmentation de Ca^{2+} intracellulaire causée par les ionophores calciques A23187 et ionomycine (**Figures IV.3 et IV.4**). Cependant, nous ne pouvons déterminer si cette réduction du taux de Ca^{2+} intracellulaire participe à l'effet anti-apoptotique des PM car (voir **Tableau IV.1**):

- i) les particules anti-apoptotiques (PM-AW, -AS et -VW) mais également les PM non-anti-apoptotiques (-VS) réduisent l'augmentation de Ca^{2+} ;
- ii) les PM-AW semblent réduire l'augmentation de Ca^{2+} provoquée par l'ionomycine alors qu'elles ne protègent pas contre l'apoptose induite par cet inducteur ;
- iii) les PM-AW protègent de l'apoptose induite par STS, qui n'induit pas d'augmentation calcique.

Tableau IV.1: Récapitulatif des effets des inducteurs sur le calcium. Les PM-AW protègent de l'apoptose et réduisent le pic de calcium induits par l'A23187, mais elles protègent aussi de l'apoptose induite par STS, qui n'induit pas d'augmentation calcique. A l'inverse, les PM-AW ne protègent pas de l'apoptose induite par l'ionomycine, mais réduisent le pic de calcium induit par ce ionophore.

inducteur	Effet anti-apoptotique des PM-AW	Diminution du Ca^{2+} intracellulaire
A23187	oui	oui
STS	oui	non
ionomycine	non	oui

L'A23187 étant un ionophore calcique, il induit l'apoptose suite à une importante augmentation du calcium intracellulaire (*Reed et al. 1972*). Cependant, les mécanismes moléculaires impliqués dans cette induction sont encore méconnus et dépendent du type cellulaire étudié. En effet, plusieurs études ont montré une activation des caspases par l'A23187 dans différents types cellulaires (musculaires, lymphoblastiques, neuronales, ..., *Menconi et al. 2004*), bien que les caspases ne jouent pas nécessairement un rôle effecteur dans le mécanisme apoptotique (*D'Mello et al. 2000*). A l'inverse, d'autres publications décrivent une induction d'apoptose par A23187 indépendante des caspases (*Cummings et al. 2004*).

Par ailleurs, des études réalisées au laboratoire (par le Dr Ioana Ferecatu, le Dr Aïda Bouharrou, Camille Bossard et Bélinda Crobeddu) ont montré que l'induction d'apoptose par A23187 dans les cellules 16HBE semble dépendre de l'activation des calpaïnes mais être indépendante de l'activation des caspases (résultats non illustrés). En effet, il est connu que le processus apoptotique peut être exécuté indépendamment des caspases, *via* l'activation d'autres protéases telles que les calpaïnes (*Lu et al. 2002*), qui sont composées d'une sous-unité régulatrice où se fixe le calcium et d'une sous-unité catalytique cystéine-protéinase (*Sorimachi et al. 1997; Lopatniuk et al. 2011*). La fonction ionophore calcique du A23187 est concordante avec l'activation des calpaïnes et l'induction d'apoptose dépendante des calpaïnes (*Ray et al. 2000*;

Menconi et al. 2004; Kar et al. 2009). Il sera nécessaire de poursuivre les recherches dans ce domaine afin de confirmer l'activation des calpaïnes par l'A23187 dans les cellules 16HBE et déterminer si elles sont impliquées dans l'effet anti-apoptotique des PM.

Enfin, l'absence d'effet anti-apoptotique des PM-AW vis-à-vis de l'apoptose induite par l'ionomycine pourrait contredire l'hypothèse d'un effet de ces particules sur la signalisation calcique puisque l'ionomycine et l'A23187 sont tous deux des ionophores monocarboxyliques qui favorisent une augmentation sélective du Ca²⁺ cytosolique (*Liu, C. et al. 1978*). Il faut cependant citer une publication montrant que, contrairement à l'A23187, l'ionomycine ne permet pas une surcharge en calcium mitochondrial dans les cellules épimastigotes de *Trypanosoma cruzi* (*Irigoin et al. 2009*). La mesure des taux de Ca²⁺ cytosolique et mitochondrial en réponse à l'A23187 et l'ionomycine pourrait nous permettre de comprendre pourquoi l'apoptose induite par l'A23187 est sélectivement inhibée par les PM.

Les études préliminaires du cytosquelette ont montrées d'une part que les inducteurs d'apoptose A23187 et STS altèrent les réseaux d'actine et de tubuline, tandis que les PM-AW ne semblent pas altérer les microfilaments d'actine. Ces expériences méritent d'être approfondies par une étude des microtubules après traitement par les PM ainsi qu'un marquage de l'actine et de la tubuline après un prétraitement par les PM suivi d'un traitement par les inducteurs afin de voir si les PM sont capables d'empêcher l'apparition des fibres de stress et des *foci* de polymérisation des microtubules. D'autre part, l'A23187 et la STS induisent précocement (à 1 h et 3 h de traitement) des modifications morphologiques, dont la perte des microvillosités membranaires et un début de détachement de la matrice, qui sont contrecarrés par le prétraitement aux PM-AW (10 µg/cm²).

Le caractère innovant de ces résultats résulte dans la capacité des PM, à faible dose, à protéger des altération morphologiques causées par d'autres agents, puisqu'au contraire, d'autres études ont montré que les PM, mais à des doses plus fortes provoquent des altérations du cytosquelette, notamment dans les réseaux d'actine et tubuline et dans les jonctions serrées, en lien avec l'induction d'un stress oxydant (*Wang, T. et al. 2010; Mutlu et al. 2011*) ou une modulation du calcium intracellulaire (*Moller et al. 2005*).

Par ailleurs, l'activation des calpaïnes par des PM₁₀ a été démontrée dans des cellules épithéliales bronchiques humaines (BEAS-2, *Watterson et al. 2009*) montrant que les particules sont capables de moduler l'activation de ces protéines kinases. De manière intéressante, l'équipe de G. N. Garcia a montré, *in vivo* (dans des modèles de souris et *in vitro* (dans des cellules endothéliales respiratoires humaines) que l'activation des calpaïnes par des PM_{2.5} était liée à l'induction d'un stress oxydant et l'altération du cytosquelette. Ils suggèrent que les ERO générés par les PM conduisent à des modifications de l'homéostasie calcique, induisant l'activation des calpaïnes et l'altération des jonctions serrées *via* le clivage de la protéine ZO-1 (*Wang, T. et al. 2012*), reflétant le lien étroit qui existe entre l'homéostasie calcique, le statut redox intracellulaire, et le cytosquelette.

IV.4) CONCLUSION

Tout d'abord, cette étude nous a permis de confirmer que les composés particulaires métalliques ont un effet anti-apoptotique en lien avec leur concentration, et que les particules PM_{2.5} de 2003, ainsi que les métaux, ont une capacité oxydante intrinsèque liée à l'induction d'une réponse cellulaire anti-oxydante. Cette réponse anti-oxydante, caractérisée par l'augmentation du GSH total dans la cellule, est corrélée à l'effet anti-apoptotique des PM. La génération de H₂O₂ intracellulaire par les PM pourrait expliquer cette réponse anti-oxydante, puisque, comme les PM, de faibles doses de H₂O₂ ont été capables de protéger les cellules de l'apoptose. Il serait donc nécessaire d'effectuer un dosage du H₂O₂ intracellulaire afin de vérifier cette hypothèse.

Nous avons démontré que la voie de signalisation Nrf2 est impliquée, dans la réponse anti-oxydante et l'effet anti-apoptotique induit par les PM_{2.5}-AW, *via* sa translocation nucléaire et la transcription de ses gènes cibles HO1, NQO1 et GPX1. Nos résultats sont en accord avec les publications, montrant une surexpression de HO-1 et NQO1 après des expositions similaires dans la lignée cellulaire alvéolaire A549 (*Deng et al. 2013*) et dans les cellules épithéliales bronchiques humaines immortalisées BEAS-2B (*Diabate et al. 2011*). Cependant, nous n'avons pas mis en évidence de surexpression des gènes de SOD2 et de GST après 4h de traitement, mais il est possible que ces expressions nécessitent un temps plus long, comme cela a déjà été montré dans d'autres types cellulaires (*Tanaka et al. 2000; Saint-Georges et al. 2008*).

Cette étude nous a permis de proposer un modèle pour les mécanismes de l'effet anti-apoptotique des particules atmosphériques, impliquant d'une part les HAP, *via* la translocation nucléaire du facteur de transcription AhR (Aryl hydrocarbon Receptor) et la transcription des gènes cibles possédant l'élément de réponse aux xénobiotiques (XRE) (*Ferecatu et al. 2010*), d'autre part les métaux, *via* l'induction d'une réponse adaptative anti-oxydante et la subséquente translocation du facteur de transcription Nrf2 activant ces gènes cibles, possédant l'élément de réponse anti-oxydante (ARE) (**Article : Figure 9**).

Cette réponse adaptative peut conduire à la survie cellulaire et la cancérogenèse. En effet, l'implication de la production de ROS ainsi que l'activation de Nrf2, dans l'initiation de la cancérogenèse, a déjà été démontrée, en particulier dans les cancers du poumon (*Sporn et al. 2012; Bauer et al. 2013; Ganan-Gomez et al. 2013*). Des études complémentaires préliminaires ont montré que l'exposition répétée des cellules aux composés particulaires des PM-AW leur permet d'acquérir la capacité de proliférer en absence d'adhérence, soutenant l'hypothèse que l'exposition aux particules atmosphériques à faible dose peut conduire à la transformation précancéreuse des cellules.

L'étude du calcium intracellulaire a montré que les PM sont capables de moduler l'homéostasie calcique, mais aucun lien entre cette régulation et l'effet anti-apoptotique n'a pu être établi.

Enfin, l'étude morphologique de l'interaction entre la membrane cellulaire et les PM a montré que les PM ne modifient pas les microfilaments, contrairement à deux inducteurs

d'apoptose (A23187 et STS) qui altèrent les réseaux d'actine et de tubuline. Il serait nécessaire d'effectuer des marquages de l'actine et de la tubuline après prétraitement par les PM, suivit des inducteurs d'apoptose, afin de voir si les PM protègent des altérations causées sur ces deux protéines du cytosquelette. Il serait également judicieux d'effectuer les mêmes expériences avec des agents détruisant spécifiquement l'actine, comme la Cytochalasin D, ou la tubuline comme la Colchicine, afin de voir si les PM protègent aussi des altérations causés par ces produits.

V. CONCLUSIONS GENERALES & PERSPECTIVES

Grâce aux nombreuses études épidémiologiques réalisées depuis la révolution industrielle, la pollution atmosphérique a été depuis longtemps associée à une augmentation de tous types de cancers. La composante particulaire est particulièrement incriminée, notamment dans les cancers broncho-pulmonaires (CBP). Cependant les mécanismes moléculaires associés sont très peu connus. La récente classification de la pollution atmosphérique, et en particulier des particules fines PM_{2,5}, en tant que « cancérigène certain pour l'homme » par l'IARC, montre qu'il est indispensable de poursuivre et approfondir les recherches sur les mécanismes impliqués dans l'initiation des CBP par les particules atmosphériques. Sachant que la résistance à l'apoptose est l'une des premières caractéristiques acquises par les cellules cancéreuses (*Hanahan et al. 2000; Hanahan et al. 2011*), notre équipe s'est focalisée sur la capacité de différentes particules à moduler l'apoptose des cellules épithéliales bronchiques humaines.

Dans ce contexte, mes travaux de thèse avaient pour objectifs :

- i) de comprendre le rôle de la taille et de la composition chimique** des PM dans leur effet sur l'apoptose (aussi bien son induction que son inhibition) ;
- ii) d'identifier les composés impliqués** dans l'inhibition de l'apoptose observée avec certaines PM ;
- iii) de décrypter les mécanismes moléculaires** mis en œuvre dans la résistance à l'apoptose conférée par les composés identifiés.

Le modèle cellulaire que nous avons utilisé dans l'ensemble de mon travail a été la lignée 16HBE, de cellules épithéliales bronchiques non transformées provenant d'un enfant ayant subi une greffe, immortalisées par l'antigène T du virus SV40. L'intérêt de cette lignée est qu'elle conserve lors de sa culture *in vitro*, un certain nombre de caractéristiques des cellules épithéliales bronchiques humaines : ce sont des cellules adhérentes, elles possèdent des microvillosités ainsi que des jonctions gap et adhérentes fonctionnelles bien qu'elles ne présentent pas d'inhibition de contact et ne produisent pas de cils. De plus, l'endocytose des nanoparticules ainsi que l'activation du cytochrome P450 par les pDi et la réaction inflammatoire a été précédemment prouvée dans ces cellules (*Belade et al. 2012 ; Bonvallot et al. 2001*). Les cellules 16HBE sont des cellules non cancéreuses capables de se transformer lors d'expositions répétées au BaP et d'induire ainsi l'apparition de tumeurs pulmonaires chez la souris *nude* (*Zhao, P. et al. 2012*). Les **cellules 16HBE** sont donc un **modèle cellulaire adéquat pour l'étude des cellules épithéliales bronchiques humaines et les processus de cancérogénicité en lien avec l'acquisition d'une résistance à l'apoptose.**

Les résultats acquis au cours de cette thèse ont clairement mis en évidence que :

i) La taille et la composition chimique des particules conditionnent leur capacité à moduler l'apoptose des cellules épithéliales bronchiques humaines

Dans une première étude, l'utilisation de différents lots de particules issues de sources contrastées et/ou de différentes classes de taille a permis de déterminer que **la taille, la dose et la composition chimique des PM constituent des paramètres qui conditionnent possiblement l'induction de l'apoptose**. Afin d'avoir une approche réaliste, nous avons utilisé des doses auxquelles un individu est susceptible d'être exposé dans des conditions normales de pollution. Ainsi, nous avons exposé les cellules 16HBE à une concentration maximale de **10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, correspond à une exposition 5 jours à une pollution de zones urbaines** telles que celles observées dans des mégacités comme Paris (Li, N. et al. 2003a).

L'étude de des différents lots de particules a montré qu'**aussi bien la taille que la composition chimique des particules peuvent conditionner l'induction d'apoptose** des cellules 16HBE. Cependant, la composition chimique des PM semble être un paramètre plus déterminant dans la modulation de l'apoptose puisque **des particules de même classe de taille, prélevées à un même endroit ont eu des effets différents**. Ces différences entre les prélèvements ont également été observées pour l'induction de l'expression des gènes de l'inflammation et des EMX. Ainsi, **les variations dans les effets provoqués par les PM pourraient résulter des sources et donc des compositions chimiques différentes**. Cependant, les analyses chimiques des PM prélevées en 2009-2010, ayant été réalisées sur des séries de prélèvements de même caractéristiques spatio-temporelles (soit : WB, TR, OB, et OP), nous n'avons pu identifier les composés particuliers impliqués dans l'induction de l'apoptose des cellules épithéliales bronchiques 16HBE.

Concernant la résistance à l'apoptose conférée par les PM, l'étude du rôle la taille doit être approfondie. L'inhibition de l'apoptose induite par des inducteurs spécifique a été observée avec trois des quatre lots de PM_{2.5} prélevées en 2003 (PM-AW, -AS et -VW), mais pas avec des particules fines et grossières prélevées en 2009-2010. Cependant, parmi tous les lots à notre disposition, seuls quelque uns ont pu être étudiés quant à l'effet anti-apoptotique (TR5 et OB3) ; ce qui limite la conclusion que nous pouvons apporter sur le rôle de la taille dans l'inhibition de l'apoptose. Il sera donc **nécessaire d'étudier d'autres particules de différents classes de tailles, notamment d'autres PM_{2.5} et des particules ultrafines**, afin de conclure sur ce point d'autant plus les particules fines issues du trafic prélevées en 2010 ont légèrement réduit l'apoptose de manière non significative (TR5 F, Figure III.9).

Les résultats que nous avons obtenus ont clairement démontré que **la composition chimique des particules fines urbaines de 2003 est un paramètre clé impliqué dans leur effet anti-apoptotique ; en particulier les composés organiques et métalliques**. En effet, l'analyse chimique ces PM_{2.5} a montré que celles ayant un effet anti-apoptotique (PM-AW, -AS et -VW) ont une composition très différente des particules non-anti-apoptotiques (PM-VS). Elles ont notamment **plus de HAP et moins de métaux** (Tableaux III.1 et II.4).

ii) Les HAP particulières à plus de 5 noyaux benzéniques et les composés métalliques participent à l'effet anti-apoptotique des PM

Les résultats obtenus dans la première étude ont orientés nos recherches sur l'effet de ces composés organiques et métalliques sur l'inhibition de l'apoptose, en lien avec leurs concentrations. Ainsi, nous avons démontré qu'aussi bien les composés organiques que les composés hydrosolubles participent aux propriétés anti-apoptotiques des PM, et une étude de corrélation entre la composition et l'effet anti-apoptotique des PM nous a permis de déterminer qu'**une concentration de HAP lourds supérieure à 46 µg/g, ainsi qu'une concentration inférieure à 147 mg/g en métaux seraient nécessaire pour réduire d'au moins 40% l'apoptose** induite par l'A23187.

Plus précisément, les HAP légers ne semblent pas impliqués dans l'effet anti-apoptotique tandis que les HAP lourds sont nécessaires (à une concentration supérieure à 46 µg/g). **L'utilisation de différents HAP a permis de discriminer ceux ayant plus de 5 noyaux benzéniques comme nécessaires à l'effet anti-apoptotique des PM-AW** (Tableau III.2).

Parmi les composés métalliques, ce sont principalement les **métaux alcalino-terreux** (à une concentration inférieure à 123 mg/g) et les **métaux de transition** (à une concentration inférieure à 21,5 mg/g) qui semblent participer à l'effet anti-apoptotique des PM. **La capacité anti-apoptotique du Fe(II) et Fe(III), de l'Al(III), du Cu(II), du Ca(II), du Mg(II), du Mn(II) et du Pb(II) a notamment été vérifiée en cytométrie en flux et nous avons montré que celle-ci dépend bien de sa concentration** (Figures III.13 et III.14).

Dans le contexte actuel, la population est exposée à une multitude de polluants environnementaux, et plusieurs études s'intéressant à l'exposition de mélanges de toxiques ont montré qu'ils pouvaient être plus néfastes à de faibles doses, que les polluants seuls. Or, la pollution atmosphérique particulaire constitue un mélange complexe de composés toxiques (organiques, métalliques et biologiques, voir § I.1.1.iii). Afin de poursuivre ce travail, il serait donc intéressant d'exposer les cellules épithéliales bronchiques humaines à un nombre restreint de composés, organiques et métalliques (par exemple, BaP, Fe et Cu), en mélange, afin de « reconstituer » un modèle de composés particuliers cytoprotecteur, mais sans la contrainte de la nature particulaire des PM. En effet, celle-ci peut poser quelques interférences avec les techniques biologiques utilisant des fluorochromes, du fait du cœur carboné des PM, comme nos résultats de dosage du calcium intracellulaire peuvent le suggérer.

iii) Les mécanismes moléculaires de la réponse adaptative anti-oxydante sont impliqués dans l'effet anti-apoptotique des PM

Afin de comprendre les mécanismes moléculaires associés à l'effet anti-apoptotique observé avec les composés particuliers, **nous avons premièrement identifié la voie AhR comme impliquée dans l'effet anti-apoptotique induit par les HAP particuliers**, lors d'une étude réalisée par le Dr Ioana Ferecatu, à laquelle j'ai participé (Ferecatu et al. 2010, Annexe 1).

En complément, mon travail de thèse s'est concentré sur les composés métalliques et les mécanismes moléculaires qu'ils activent lors de l'établissement d'une résistance à l'apoptose.

En se basant sur la connaissance de l'induction d'un stress oxydant par les PM et les métaux (Baulig et al. 2003; Manzl et al. 2004; Cho et al. 2005; Rana 2008; Gobe et al. 2010) ainsi que sur le **modèle hiérarchique de réponse au stress** établi par N. Li et ses collaborateurs (Li, N. et al. 2003a), nous avons cherché à savoir si nos PM et leur composés métalliques induisaient un stress oxydant pouvant être impliqué dans la résistance à l'apoptose. Ainsi, de manière concordante à d'autres études réalisées précédemment (Baulig et al. 2009; DiStefano et al. 2009; Shen et al. 2012), nous avons démontré que **les PM prélevées en 2003 ainsi que leurs composés métalliques ont une activité pro-oxydante intrinsèque** liée à l'induction d'une réponse cellulaire anti-oxydante (voir § III-Article soumis). Cependant, il serait tout à fait souhaitable de quantifier *in cellulo* la quantité de métaux de transition, notamment le fer, ainsi que la production de diverses ERO, notamment le peroxyde d'hydrogène suite à une exposition aux PM anti-apoptotiques par une technique de résonance paramagnétique électronique (RPE).

La réponse anti-oxydante induite par les particules et les composés métalliques semble liée au glutathion (GSH) puisque, contrairement aux autres anti-oxydants étudiés, l'ajout de GSH a augmenté, de manière dose-dépendante, l'effet anti-apoptotique des PM-AW. De plus, le prétraitement avec les particules anti-apoptotiques PM-AW (10 µg/cm²), de même qu'avec le Fe(II) (à la concentration contenue dans 10 µg/cm² de PM-AW) ont permis de contrecarrer la déplétion de GSH provoquée par l'inducteur d'apoptose A23187. Enfin, de faibles doses de H₂O₂ ont aussi été capables de protéger les cellules 16HBE contre l'apoptose induite par l'A23187 (voir § III-Article soumis). Ces résultats sont concordants avec ceux obtenus précédemment par A. Baulig et collaborateurs qui avaient démontré que la N-acétylcystéine (NAC, un précurseur de GSH), mais pas le D-mannitol, réduit la production d'HO° par les PM_{2.5} (Baulig et al. 2009). Ainsi, l'ensemble de ces résultats suggèrent que **les PM-AW, via leurs composés métalliques, provoquent un faible stress oxydant induisant une réponse adaptative anti-oxydante, spécifiquement liée au GSH intracellulaire**. La mesure de l'activité de la glutamate cystéine ligase (GCL), qui catalyse la synthèse du GSH, nous permettrait de confirmer la synthèse de GSH induite par les PM et ses composés, et des dosages individuels du glutathion réduit (GSH) et oxydé (GSSG) nous permettrait de faire un ratio GSH/GSSG.

Pour aller plus loin dans notre analyse mécanistique de la réponse adaptative anti-oxydante, nous nous sommes intéressés à la voie de signalisation Nrf2 et nous avons montré qu'elle est impliquée dans la résistance à l'apoptose. En effet, nous avons clairement montré l'activation rapide d'Nrf2 et sa translocation nucléaire après traitement par les PM-AW anti-apoptotiques (à 10µg/cm²) et le Fe(II) (qsp 10µg/cm² de PM-AW), mais pas par les PM-VS, non-anti-apoptotiques. Nrf2 induit ensuite la transcription de ces gènes cibles, possédant l'élément de réponse anti-oxydante ARE notamment Nrf2 lui-même, HO-1, NQO1 et GPx (voir § III-Article soumis). L'activation de Nrf2 par les PM a plusieurs fois été démontrée (Baulig et al. 2003; Diabate et al. 2011; Deng et al. 2013), mais notre étude apporte un éclaircissement sur le rôle de l'activation de Nrf2 par les composés métalliques, dans l'effet anti-apoptotique conféré par les particules fines. Ainsi, **les composés métalliques des PM_{2.5} induiraient un léger stress**

oxydant, conduisant à une réponse adaptative anti-oxydante, via l'activation la voie Nrf2 (Figure V.1). Afin de vérifier cette hypothèse, des expériences d'extinction du gène Nrf2 (siRNA) sont en cours de réalisation. Il serait également intéressant d'invalider l'expression de l'enzyme HO1 qui est la plus fortement induite par les PM-AW. De plus, notre étude de l'expression des gènes cibles d'Nrf2 pourrait être complétée par l'analyse des gènes impliqués spécifiquement dans la synthèse du GSH, tels que la « glutamate-cystéine ligase » (GCL) dont on sait qu'elle restaure le taux de GSH et protège contre le stress oxydant induit par la fumée de cigarette (*Kode et al. 2008*).

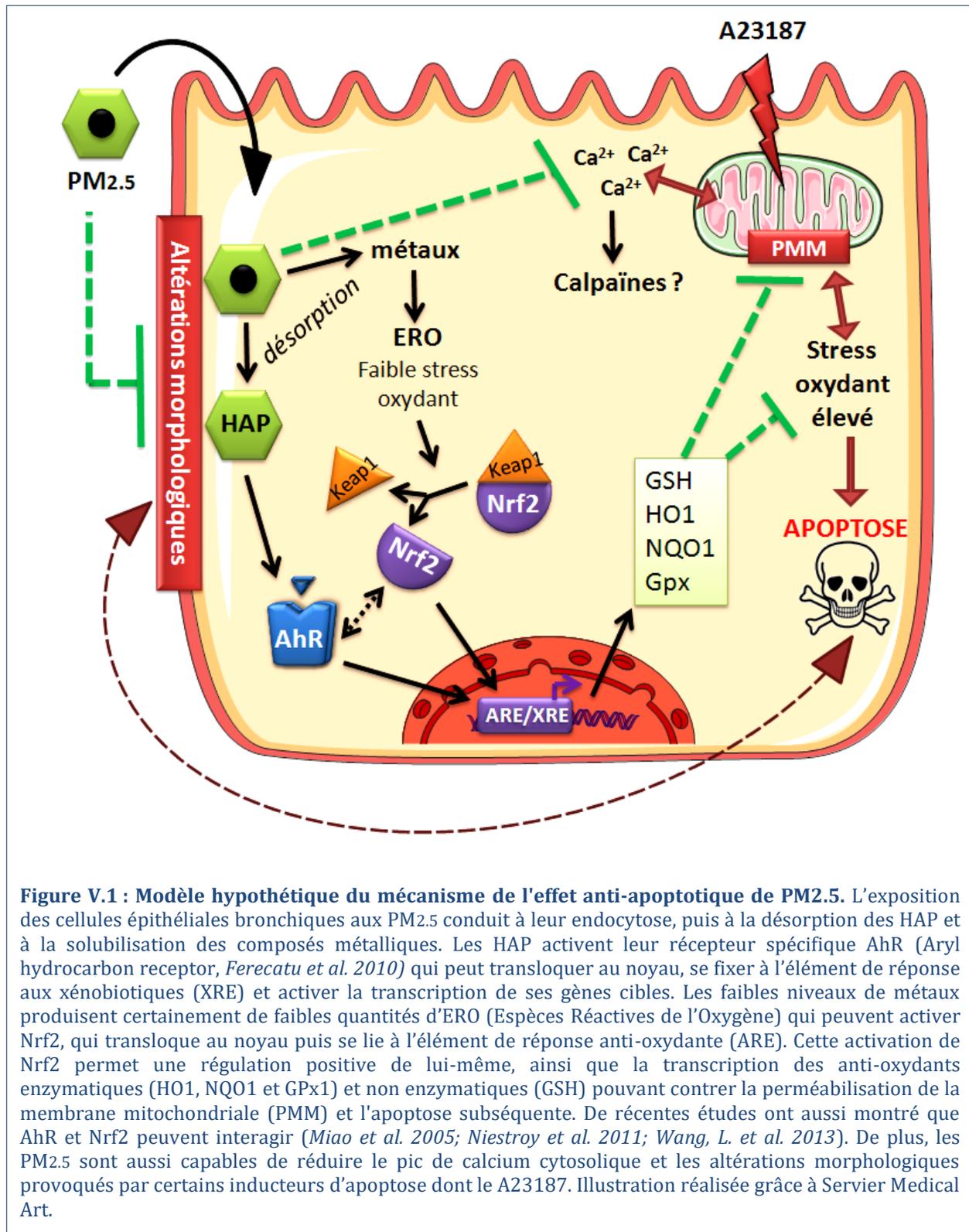
Mon étude des composés métalliques a permis de compléter notre modèle des mécanismes moléculaires et cellulaires induisant la résistance à l'apoptose par les PM2.5 (**Figure V.1**). Ainsi selon notre modèle, les PM2.5 peuvent être internalisées, puis, *in cellulo*, les composés particuliers se désorbent ; les HAP activent le récepteur « Aryl hydrocarbon » (AhR) tandis que les métaux induisent un faible stress oxydant qui active Nrf2. Ces deux facteurs de transcription sont transloqués dans le noyau où ils vont se fixer respectivement sur les éléments ARE et XRE et activer la transcription des gènes de la réponse anti-oxydante et des gènes du métabolisme des xénobiotiques. Ces deux voies de signalisation peuvent être interconnectées bien que les mécanismes impliqués dans ce dialogue ne sont pas encore complètement élucidés. Ainsi Nrf2 et AhR peuvent interagir physiquement pour fonctionner comme des cofacteurs pour les gènes ARE et XRE, le AhR pourrait aussi activer la transcription des gènes ARE ; enfin, certains gènes possèdent à la fois l'élément ARE et l'élément XRE comme le gène codant pour Nrf2 lui-même (*Miao et al. 2005; Niestroy et al. 2011; Wang, L. et al. 2013*).

iv) Les PM induisent d'autres modifications cellulaires et moléculaire pouvant être impliqués dans l'acquisition de la résistance à l'apoptose

En plus de l'activation de la voie Nrf2, **la régulation du calcium intracellulaire semble être impliquée dans l'effet anti-apoptotique des PM (Figure V.1)**. En effet, les PM semblent capables de diminuer le pic de calcium provoqué par les ionophores calciques (A23 et Ionomycine) inducteurs de l'apoptose des cellules 16HBE. Ces résultats restent cependant à confirmer notamment par l'utilisation de chélateurs de Ca²⁺ de manière concomitante aux PM. Cependant, des travaux réalisés dans notre équipe ont montré que, dans les cellules 16HBE, **l'apoptose induite par A23187 semble dépendre de l'activation des calpaïnes** (protéases activées par de fortes doses de calcium) en non pas des caspases comme cela a déjà été montré (*D'Mello et al. 2000; Cummings et al. 2004*). La régulation de l'activation des calpaïnes serait une piste à explorer afin de décrypter l'effet cytoprotecteur des PM contre l'apoptose spécifiquement induite par A23187.

Des études morphologiques préliminaires nous ont permis de montrer que les inducteurs d'apoptose A23187 et STS altèrent fortement le cytosquelette (réseaux d'actine et de tubuline), ainsi que la morphologie cellulaire (microvillosités), et que **les PM-AW semblent protéger les cellules de ces altérations morphologiques (Figure V.1)**. Ces résultats apportent un nouveau regard sur l'interaction PM/membrane cellulaire et il serait intéressant de

poursuivre les recherches afin de déterminer si l'internalisation des PM est une condition *sine qua non* à leur effet protecteur ou si seule l'interaction PM/membrane suffit. Il serait également justifié de déterminer le lien existant entre les altérations de l'homéostasie calcique et celles du cytosquelette, puisque le calcium est connu pour modifier la polymérisation de l'actine *via* notamment la gelsoline.



Enfin, nous avons montré qu'en plus de conférer une résistance à l'apoptose **les composés particuliers semblent permettre la survie voire la prolifération des cellules épithéliales bronchiques 16HBE en condition non adhérente, en lien avec la composition des PM**. En effet, les traitements répétés avec les particules ainsi que certains composés (Cu(II), Fe(II), et BaP) ont permis aux cellules de pousser dans un milieu semi-solide METHOCEL™ contrairement aux cellules non traitées (**Figure IV.1**). Cette expérience préliminaire mérite d'être reconduite de manière plus rigoureuse par un test de formation de colonies en milieu Agar afin de pouvoir appréhender les effets des PM anti-apoptotiques ainsi que leurs composés organiques et métalliques sur les processus de cancérogenèse. En effet, depuis quelques années, **des études suggèrent que les PM (Hung et al. 2007; Rubio et al. 2010), les HAP (notamment le BaP, Teranishi et al. 2010) et les métaux (dont l'aluminium, le fer et le cuivre, Wang, Q. et al. 2007; Yu, J.W. et al. 2010) peuvent avoir un effet cytoprotecteur conduisant à la cancérisation des cellules pulmonaires**, notamment via l'activation de la voie de survie Nrf2.

Le paradoxe de la voie Nrf2 résulte dans son implication dans la cancérogenèse aussi bien comme possible suppresseur de tumeurs que comme oncogène (pour revue voir Sporn et al. 2012). En effet, des études *in vivo* ont montré le développement de multiples cancers dans des souris *Nrf2*^{-/-} (Becks et al. 2010; Ohkoshi et al. 2013; Cheung et al. 2014), alors que l'étude de carcinomes des voies aériennes a mis en évidence des mutations activatrices d'*Nrf2* ou inhibitrices de Keap1, conduisant à l'activation constitutive de *Nrf2* (pour revue voir Sporn et al. 2012). L'ensemble de ces données, laissent donc supposer que le classement d'*Nrf2* en tant qu'oncogène ou en tant que suppresseur de tumeurs dépend du type de cancer, de l'étape de développement du cancer, et du degré d'activation de *Nrf2*. La mise en perspective de nos résultats dans un contexte d'expositions répétées à de faibles doses de particules atmosphériques laisse supposer qu'**une suractivation, ou l'activation répétée, de la voie anti-oxydante Nrf2 pourrait induire une réponse adaptative conduisant à l'établissement d'une résistance à l'apoptose, à la survie de cellules endommagées et à l'acquisition de caractéristiques précancéreuses**. Ce type de mécanisme d'adaptation pouvant conduire à la cancérogenèse a déjà été suggéré précédemment pour la voie *Nrf2* et pour la voie AhR (pour revue voir Barouki 2010; Sporn et al. 2012).

En conclusion, ce travail de thèse met en exergue, l'influence de la composition chimique des particules sur leurs effets toxiques, ainsi que, leurs impacts cellulaires et moléculaires sur l'établissement d'une résistance à la mort cellulaire apoptotique, et peut fournir des indices mécanistiques permettant d'expliquer le développement des cancers du poumon lors d'expositions à long terme.

VI. ANNEXES

ANNEXE 1:.....181

“Polycyclic aromatic hydrocarbon components contribute to the mitochondria-antiapoptotic effect of fine particulate matter on human bronchial epithelial cells *via* the aryl hydrocarbon receptor ”.

Ioana Ferecatu, Marie-Caroline Borot, Camille Bossard, Melanie Leroux, Nicole Boggetto, Francelyne Marano, Armelle Baeza-Squiban, Karine Andreau.

Particle and Fibre Toxicology 2010, 7:18

ANNEXE 2 :.....199

“Health and cellular impacts of air pollutants: from cytoprotection to cytotoxicity”.

Karine Andreau, Melanie Leroux and Aïda Bouharrou

Biochemistry Research International 2012, 493894

Annexe 1:

“Polycyclic aromatic hydrocarbon components contribute to the mitochondria-antiapoptotic effect of fine particulate matter on human bronchial epithelial cells via the aryl hydrocarbon receptor”.

Ioana Ferecatu, Marie-Caroline Borot, Camille Bossard,

Melanie Leroux, Nicole Boggetto, Francelyne Marano,

Armelle Baeza-Squiban, Karine Andreau.

Particle and Fibre Toxicology 2010, 7:18

RESEARCH

Open Access

Polycyclic aromatic hydrocarbon components contribute to the mitochondria-antiapoptotic effect of fine particulate matter on human bronchial epithelial cells *via* the aryl hydrocarbon receptor

Ioana Ferecatu¹, Marie-Caroline Borot¹, Camille Bossard¹, Melanie Leroux¹, Nicole Boggetto², Francelyne Marano¹, Armelle Baeza-Squiban¹, Karine Andreau^{1*}

Abstract

Background: Nowadays, effects of fine particulate matter (PM_{2.5}) are well-documented and related to oxidative stress and pro-inflammatory response. Nevertheless, epidemiological studies show that PM_{2.5} exposure is correlated with an increase of pulmonary cancers and the remodeling of the airway epithelium involving the regulation of cell death processes. Here, we investigated the components of Parisian PM_{2.5} involved in either the induction or the inhibition of cell death quantified by different parameters of apoptosis and delineated the mechanism underlying this effect.

Results: In this study, we showed that low levels of Parisian PM_{2.5} are not cytotoxic for three different cell lines and primary cultures of human bronchial epithelial cells. Conversely, a 4 hour-pretreatment with PM_{2.5} prevent mitochondria-driven apoptosis triggered by broad spectrum inducers (A23187, staurosporine and oligomycin) by reducing the mitochondrial transmembrane potential loss, the subsequent ROS production, phosphatidylserine externalization, plasma membrane permeabilization and typical morphological outcomes (cell size decrease, massive chromatin and nuclear condensation, formation of apoptotic bodies). The use of recombinant EGF and specific inhibitor led us to rule out the involvement of the classical EGFR signaling pathway as well as the proinflammatory cytokines secretion. Experiments performed with different compounds of PM_{2.5} suggest that endotoxins as well as carbon black do not participate to the antiapoptotic effect of PM_{2.5}. Instead, the water-soluble fraction, washed particles and organic compounds such as polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) could mimic this antiapoptotic activity. Finally, the activation or silencing of the aryl hydrocarbon receptor (AhR) showed that it is involved into the molecular mechanism of the antiapoptotic effect of PM_{2.5} at the mitochondrial checkpoint of apoptosis.

Conclusions: The PM_{2.5}-antiapoptotic effect in addition to the well-documented inflammatory response might explain the maintenance of a prolonged inflammation state induced after pollution exposure and might delay repair processes of injured tissues.

* Correspondence: karine.andreau@univ-paris-diderot.fr

¹Université Paris Diderot-Paris 7. Unit of Functional and Adaptive Biology (BFA) CNRS EAC 4413, Laboratory of Molecular and Cellular Responses to Xenobiotics, Bâtiment Buffon, case courrier 7073, 5 rue Thomas Mann, 75013 Paris, France

Background

Nowadays, air pollution is considered as a major inducer of harmful health effects, especially due to fine particulate matter (PM_{2.5}, atmospheric particles with an aerodynamic diameter equal or less than 2.5 µm). Urban PM_{2.5} is a mixture composed mainly of soots from fossil fuel combustion [1] together with several components adsorbed, including organic elements, biological species and metals [2]. *In vitro* short-term exposure to PM is associated with an inflammatory response as a consequence of cellular oxidative stress increase [3]. Fine PM are taken up by airway epithelial cells and alveolar macrophages [4,5] leading to proinflammatory cytokine expression and release (i.e. GM-CSF, IL-1α, IL-8, TNFα, etc) [6,7] as well as the production of reactive oxygen species (ROS) [8]. Moreover, recent data demonstrate that short exposure of bronchial or nasal epithelial cells to urban PM_{2.5} provokes the secretion of EGFR ligands and Amphiregulin, which leads to GM-CSF secretion *via* an autocrine pathway [9].

Long-term effect of atmospheric particles remains underestimated. Nevertheless, epidemiological studies provide evidence of their deleterious impacts by increasing cardiopulmonary morbidity and mortality [10], asthma [11], bronchitis [12], exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease (COPD, [13]). In addition, cancerous pathologies such as tracheal, bronchial and lung tumors are exacerbated [14]. In tissues, chronic exposure was associated with persistence of particles into the lungs leading to bronchioli wall thickening [15] and airway remodeling characterized by epithelial mucus-producing cells metaplasia, subepithelial fibrosis and airway smooth muscle hypertrophy/hyperplasia as observed in chronic asthma and COPD [16]. Thus, mechanisms involved in airway remodelling might be the excessive cell proliferation as well as the resistance to the apoptotic cell death.

Apoptosis is a programmed cell death defined by specific morphological alterations but with only slight ultrastructure modifications of cytoplasmic organelles and phosphatidylserine (PS) residue externalization [17]. It is noteworthy that mitochondrial alterations constitute the checkpoint of the apoptotic cell death. This is highlighted by the mitochondrial membrane permeabilization (MMP) which is measured by the decrease of mitochondrial transmembrane potential ($\Delta\Psi$ m), and by the subsequent superoxide anion production and Cytochrome *c* release. The activation of caspases or other proteases triggers the proteolysis of specific substrates involved into the final appearance of morphological features of apoptosis. Most publications dealing with toxicity of airborne particles showed an induction of apoptosis associated with ROS generation, $\Delta\Psi$ m drop, caspase-9 activation and DNA fragmentation [18]. *In vitro* experiments showed that PM-induced apoptosis

was reported in normal human lung tissue or airway epithelial cells [19,20].

The toxicity of ambient particles is mainly attributed to various adsorbed components. For instance, organic compounds are known to mimic the apoptotic effect of PM in various cell types through pathways which require the activation of the aryl hydrocarbon receptor (AhR) and the generation of ROS leading to DNA damage. Nevertheless, polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) induced-apoptosis is mainly mediated *via* the mitochondria pathway in a p53-dependent manner [21]. Metals also affect human health, especially when these toxicants compete with essential elements and modify many cellular processes. Transition metals promote apoptosis through ROS generation, mitochondria dysfunction, activation of MAPK, p53 and caspases or down regulation of antiapoptotic proteins Bcl-2 [22]. Metals and the water-soluble fractions of PM are known to cause inflammation and cancer mostly due to DNA damage as a consequence of ROS generation by Fenton reaction. In addition, the exacerbation of asthma after inhalation of PM is mainly attributed to the biological compounds. Endotoxins induce proinflammatory cytokines production [23] and are able to provoke apoptosis-like cell death involving a scavenger receptor.

Most of PM pro-apoptotic data were obtained *in vitro* from acute exposure (with 80 to 100 µg/cm² of particles) which usually corresponds to high pollution periods. The purpose of the present study was to investigate the effect of low doses of air particles (PM_{2.5}), on different bronchial epithelial cells (tumoral, immortalized and primary cells) regarding their induction or reduction of apoptosis. First, we found that Parisian PM_{2.5} are not cytotoxic, but have an antiapoptotic effect towards well-known cell death inducers, A23187, staurosporine and oligomycin. The reduced apoptosis observed after particle exposure is not related to the pro-inflammatory response and the EGF pathway. Moreover, water-soluble as well as organic components such as heavy PAH, are able to mimic the effects triggered by PM_{2.5}, suggesting that such compounds are involved in the antiapoptotic effect. Finally, we identified the aryl hydrocarbon receptor as a molecular effector involved in the mechanism of the antiapoptotic effect of PM_{2.5} on human bronchial epithelial cells.

Results

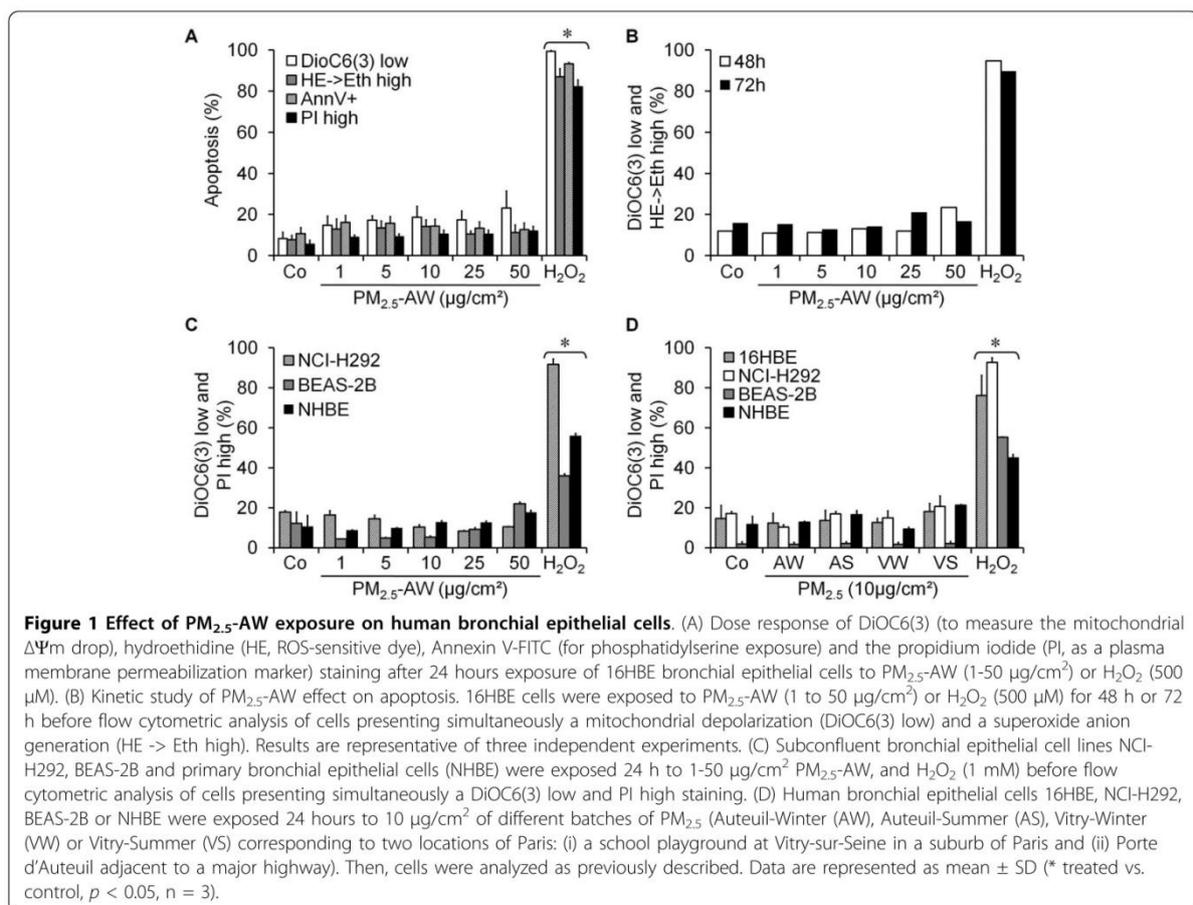
PM_{2.5} are not cytotoxic in human bronchial epithelial cells

First, we were interested in finding out whether particles from Parisian ambient air have cytotoxic effect on human bronchial cells. Thus, we exposed 16HBE human bronchial epithelial cells to increasing amount of PM_{2.5}-AW from 1 to 50 µg/cm². Several hallmarks of apoptotic cell

death - recommended by the Nomenclature Committee on Cell Death [17] - were quantified by flow cytometry. Figure 1A shows that 24 h exposure to PM_{2.5}-AW induced none of several hallmarks of apoptosis such as: ΔΨm drop (as quantified with DiOC6(3) low staining), oxidative potential (as quantified with the superoxide anion-reactive hydroethidine), phosphatidylserine exposure (driven by Annexin V-FITC positive staining) and plasma membrane permeabilization (allowing propidium iodide high staining). H₂O₂ is used here as positive control of apoptosis. Moreover, even when 16HBE cells were exposed for longer times to PM_{2.5}-AW (1-50 μg/cm²), no significant increase of apoptotic parameters was observed (Figure 1B) suggesting that PM_{2.5}-AW do not have cytotoxic activity on human bronchial epithelial cells 16HBE exposed for 24 up to 72 hours. In order to determine if this lack of toxicity is specific to 16HBE cells, we extended our study to other human bronchial epithelial cells, such as NCI-H292 and BEAS-2B cell lines and to non-differentiated primary human bronchial epithelial cells (NHBE). Similarly to 16HBE cells, the

dose effect study (1-50 μg/cm²) of PM_{2.5}-AW did not show any induction of apoptotic cell death, measured by ΔΨm loss and PI high staining, with any of the three different cell types tested (Figure 1C). Conversely, cells tested herein were not resistant to apoptosis induction as demonstrated after 24 h incubation with hydrogen peroxide.

These results might be related to the batch of PM_{2.5} used, in particular timing and location of particle collection. To test this hypothesis, we used several batches of Parisian PM_{2.5}: Auteuil-Winter (AW), Auteuil-Summer (AS), Vitry-Winter (VW) or Vitry-Summer (VS) collected in the Paris area: (i) Porte d'Auteuil adjacent to a major highway and considered as a curbside station and (ii) a school playground at Vitry-sur-Seine in the suburb of Paris. When bronchial cells were exposed 24 h to these PM_{2.5} (10 μg/cm²), we noticed only an increased granularity corresponding to particle uptake without any reduction in cell size (data not shown). Apoptotic cell death was then quantified by ΔΨm loss and plasma membrane permeabilization, and none of these parameters was



significantly increased by exposure to the four different batches of PM_{2.5} (Figure 1D). Altogether, Parisian PM_{2.5} seem to have no cytotoxic effect in several human bronchial epithelial cells, including the primary NHBE cells.

Parisian PM_{2.5} have an antiapoptotic effect

The lack of cytotoxicity of PM_{2.5} on 16HBE does not mean that atmospheric particles do not modify the state of bronchial cells, for instance the capacity to die by apoptosis. Indeed, some components adsorbed on PM_{2.5} are well-known modulators of the apoptotic process. To determine whether PM_{2.5} were able to reduce cell death, 16HBE cells were exposed 24 h to A23187 (3 μM), a calcium ionophore known to induce apoptosis acting through endoplasmic reticulum and mitochondria stress in HeLa cells [24]. A transmission electron microscopy study of 16HBE cells exposed to A23187 showed typical morphological alterations of apoptosis such as reduction in cellular volume, nuclear chromatin condensation (pyknosis), organelle modifications, but with maintenance of the plasma membrane integrity (Figure 2A). In agreement with previous results, particle exposure alone did not alter 16HBE ultrastructure. However, when PM_{2.5}-AW were added 4 h prior to A23187, particles prevented apoptotic alterations and maintained nuclear and mitochondrial morphologies similar to the control condition. Moreover, A23187 alone provoked the reduction of cell size (66.2% of control) and increased granularity (149.2% of control) but PM_{2.5}-AW (50 μg/cm²) totally counteracted the cellular volume decrease (data not shown).

These results strongly suggest that PM_{2.5} might have an antiapoptotic effect. To test this, we used widespread cell death inducers directed against different organelles or effectors of apoptosis such as: three mitochondrial respiratory chain inhibitors (rotenone, antimycin and oligomycin), two calcium ionophores (ionomycin and A23187), a protein kinase inhibitor (STS), and an oxidative stress inducer (hydrogen peroxide, Figure 2B and 2C). A 4 h pretreatment with PM_{2.5}-AW allowed a significant reduction of apoptosis induced by the ATP synthase inhibitor oligomycin (33% reduction of DiOC6 (3) low), the calcium ionophore A23187 (35% reduction of DiOC6(3) low) and staurosporine (44% reduction of DiOC6(3) low), but not by ionomycin, rotenone, antimycin A and H₂O₂. Furthermore, experiments performed in NCI-H292 and NHBE cells showed that PM_{2.5}-AW also reduced apoptosis induced by A23187 or STS but not by H₂O₂ suggesting that the antiapoptotic effect of atmospheric particles could be a general feature of human bronchial epithelial cells (Figure 2C and 2D). Toxicological studies showed that PM_{2.5}-AW significantly prevented mitochondrial and plasma membranes alterations of apoptosis at concentrations as high as 5 μM of A23187

(Figure 3 A and 3B). Moreover, the antiapoptotic effect of PM_{2.5}-AW was partially efficient at 10 μg/cm² and totally effective for concentrations beyond 25 μg/cm² (Figure 3 C and 3D) suggesting that the antiapoptotic activity of PM_{2.5} is effective at the mitochondrial checkpoint.

Recently, we showed that nanoparticles are responsible for cytokines adsorption (such as GMC-SF and TNFα) as well as other proteins like fetal calf serum or bovine serum albumin [25]. To investigate if the reduction in A23187-mediated apoptosis observed with PM_{2.5} pretreatment was not due to a possible adsorption of A23187 onto particles, we performed two different experiments. On one hand, inhibition of apoptosis was still maintained when cells were first exposed to PM_{2.5} followed by several washes before addition of the apoptotic inducer (Figure 4a and 4b). On the other hand, PM_{2.5} and the apoptotic inducer were incubated together without cells. After sedimentation, the supernatant containing the nonadsorbed inducer was added to 16HBE cells. This does not seem to reduce the apoptotic effect of A23187 (Figure 4c). Altogether, these two experiments show that the apoptotic resistance is not related to the adsorption onto PM_{2.5} but rather suggest a specific molecular mechanism occurring in bronchial epithelial cells.

The antiapoptotic effect of PM_{2.5} is related to organic and water-soluble components

Several studies on atmospheric particles underlined that cytotoxic effect of PM were linked to an oxidative stress and secretion of proinflammatory cytokines *via* the epidermal growth factor receptor (EGFR) ligands such as Amphiregulin (AR). Thus, we analyzed the secretion of GM-CSF and AR after performing a 4 h or a 24 h PM_{2.5} exposure (Figure 5A). Results showed that AR and GM-CSF secretion occur only after a 24 h exposure, which is in agreement with previous studies published on PM_{2.5}-VW and PM_{2.5}-AS [9,26]. Our results suggest that the antiapoptotic activity of PM_{2.5}, which is an early event, is not related to the EGFR pathway and secretion of proinflammatory cytokines which is a late event. To confirm this, we used a recombinant EGF ligand (rEGF) or the inhibitor of EGF receptor (AG1478, Figure 5B) to show that none of the two compounds modifies the reduction of A23187-induced apoptosis.

In order to identify the components of PM_{2.5} involved in the process of the antiapoptotic effect described herein, we compared the capacity of the four different batches of Parisian PM_{2.5} to reduce apoptosis mediated by A23187. Surprisingly, solely PM_{2.5}-VS were unable to reduce apoptosis (Figure 6A) suggesting that the antiapoptotic effect of PM_{2.5} might be associated with some compounds which are less present in PM_{2.5}-VS batch

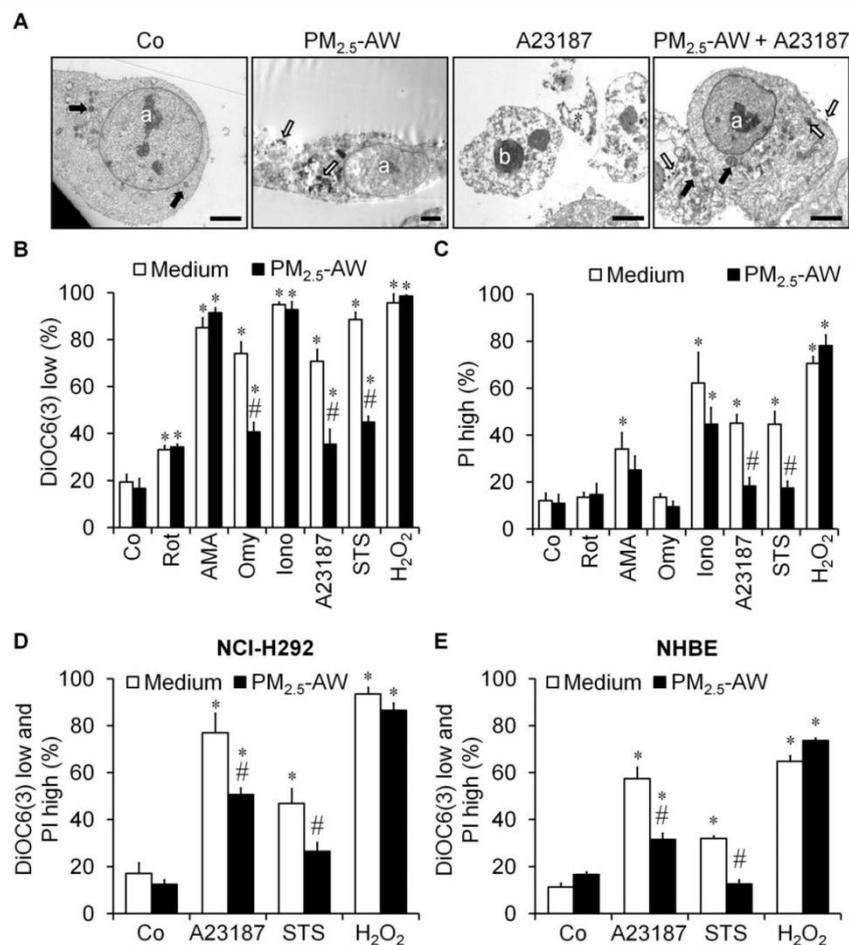


Figure 2 Parisian PM_{2.5} have an antiapoptotic effect against several death inducers. (A) Transmission electron microscopy of 16HBE cells treated 24 h with A23187 (3 μ M) in the absence or in the presence of a 4 h pretreatment with 10 μ g/cm² PM_{2.5}-AW. The micrographs illustrate that control or PM_{2.5}-treated cells show normal nuclear chromatin condensation with the presence of some nucleoli (a) and normal ultrastructure of mitochondria (black arrow). PM's aggregates are localized near to the plasma membrane of cells exposed to particles or into the cytoplasm (white arrows). Treatment with A23187 alone triggered typical features of apoptotic cell death characterized by reduced cellular volume, massive chromatin condensation (b), formation of apoptotic bodies (black asterisk) and maintenance of the plasma membrane integrity. Note that PM_{2.5}-AW pretreatment prevented A23187-induced morphological modifications and allowed 16HBE cells to retain nuclear or mitochondria morphologies similar to those of the control. Scale bar represent 5 μ m. (B and C) After a 4 h pretreatment with PM_{2.5}-AW (10 μ g/cm²), 16HBE cells were exposed to different inducers of cell death for another 20 h such as mitochondrial respiratory chain inhibitors (rotenone (Rot, 5 μ M), antimycin A (AMA, 25 μ g/ml) and oligomycin (Omy, 5 μ M)), calcium ionophores (ionomycin (Iono, 0.5 μ M) and A23187, 3 μ M), protein kinases inhibitor (staurosporine STS, 1 μ M) and oxidative stress activator (H₂O₂, 500 μ M). Then, cells were quantified for DiOC6(3) low or PI high staining by flow cytometry. (D and E) The human bronchial epithelial NCI-H292 cell line and NHBE primary cells were assessed by flow cytometry in the presence or the absence of PM_{2.5}-AW pretreatment (10 μ g/cm²) and apoptosis inducers: A23187 (3 μ M), staurosporine (STS, 1 μ M) and H₂O₂ (500 μ M). Experiments were repeated three times, and means \pm S.D. are shown. Significance was calculated with respect to untreated controls (*, $p < 0.001$) and with respect to non-pretreated cells with particles (#, $p < 0.001$).

than in the others. In opposite, the lack of antiapoptotic effect might also be attributed to components more absorbed in PM_{2.5}-VS than the others. Indeed, chemical analysis of all batches showed that PM_{2.5}-VS contain more metals and less organic compounds (especially heavy PAH) than PM_{2.5}-AW, AS and VW batches [2]. Thus, we tested PM_{2.5}-AW organic extracts (Oex) and

washed particles devoid of water-soluble components, PM_{2.5}-AW aqueous extracts (Aex) and 95nm-carbon black particles (CB). Figure 6A shows that aqueous and organic extracts and, in a less extent washed particles, can mimic the antiapoptotic activity of whole PM_{2.5}. In contrast, CB particles were unable to protect from apoptosis triggered by A23187. This suggests that water-

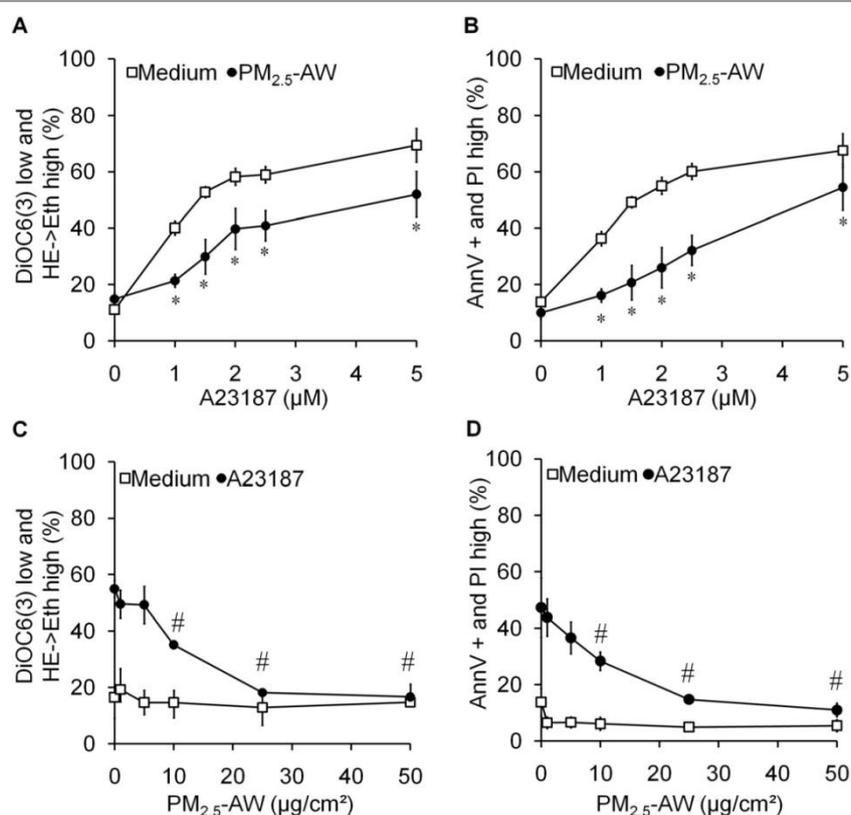


Figure 3 Dose-effect studies of the antiapoptotic effect of PM_{2.5}-AW. Apoptosis was quantified simultaneously by four parameters and expressed as percentage of 16HBE cells showing $\Delta\Psi_m$ drop (DiOC6(3) low) and ROS production (HE->Eth high) or PS exposure (Annexin V+) and plasma membrane permeabilization (PI high). (A and B) After a 4 h pretreatment with PM_{2.5}-AW (10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$), 16HBE cells were exposed to the indicated concentrations of A23187. Significance was calculated with respect to medium conditions (*, $p < 0.001$, $n = 3$). (C and D) Particle pretreatment was performed with different doses (1-50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) 4 h prior to induction of apoptosis by 3 μM of A23187. Results are means \pm S.D ($n = 3$). Significance was calculated with respect to non-pretreated cells with particles (#, $p < 0.001$).

soluble as well as organic compounds might be responsible for the antiapoptotic effect. To confirm this, we performed experiments with different heavy PAH (with at least 4 rings), such as Benzo[a]pyrene (B(a)P), Dibenzo[a,h]anthracene (DB(a,h)A), Benzo[g,h,i]perylene (B(g,h,i)P), Indeno[1,2,3-cd]pyrene (iP) and Benzo[b]fluoranthrene (B(b)F). Except for B(b)F, all the other PAH reduced the amount of apoptosis induced by A23187, similar to that of PM_{2.5} pretreatment and B(a)P seems to be the most efficient (Figure 6B and 6C). Note that the particle-coupled PAH are bioavailable in our system since CYP1A1 mRNA and its enzymatic activity were increased (data not shown). Moreover, when different light PAH (3-rings) found on particles were tested, the antiapoptotic effect was not found (Additional file 1 Figure S1). We also took into consideration the effect of biological compounds adsorbed onto particles, such as endotoxines, by using a specific bacteria LPS neutralizing protein rENP. This did not diminish the protector

effect of PM_{2.5} from apoptosis induced by A23187 and STS (Additional file 1 Figure S2) indicating that endotoxins are not involved in the process. Altogether, our data strongly suggest that water-soluble and heavy PAH components contribute to the antiapoptotic effect of Parisian PM_{2.5} observed in human bronchial epithelial cells.

The antiapoptotic mechanism is mediated by the aryl hydrocarbon receptor

To delineate the molecular mechanism of the antiapoptotic effect of PM_{2.5} efficient at the mitochondrial checkpoint, we focused on the aryl hydrocarbon receptor (AhR) activated after cell exposure to organic compounds such as PAH. Indeed, AhR is a ligand-induced transcription factor which relocates to the nucleus and induces the expression of numerous target genes. Thus, we investigated the possible implication of AhR in our process. To test this we first either activated or inhibited

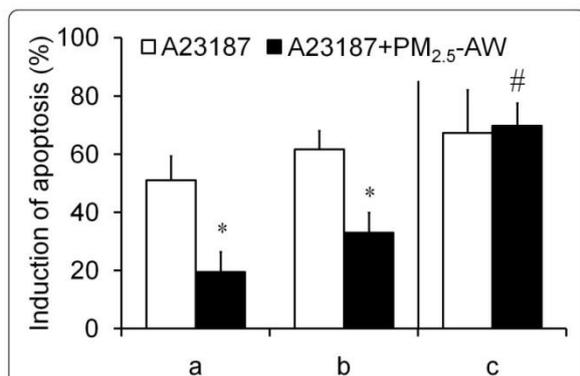


Figure 4 Study of direct adsorption of A23187 onto particles. (a) 16HBE cells were exposed 4 h to 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ $\text{PM}_{2.5}$ -AW prior to addition of 3 μM A23187 during 20 supplementary hours. (b) To avoid possible adsorption, $\text{PM}_{2.5}$ -AW were removed and cells were washed five times with PBS before drug treatment. (c) Particles and A23187 were co-incubated 4 h into a coated 24 wells-plate without cells, and then supernatant was used to trigger apoptosis for 20 h supplementary. $\Delta\Psi\text{m}$ dissipation was measured by flow cytometry and results are expressed as percentage of apoptosis induction as described in Materials and Methods section. Results are means \pm S. D (n = 3). Significance was calculated for $\text{PM}_{2.5}$ -AW + A23187 versus A23187 alone for all conditions with $p < 0.05$ (*) or for $\text{PM}_{2.5}$ -AW + A23187 treatment with respect to a, b or c condition (#, $p < 0.05$).

AhR, using an agonist (beta-naphthoflavone, beta-NF) or an antagonist (alpha-naphthoflavone, alpha-NF). Figure 7A shows that beta-NF (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) used prior to A23178 significantly reduced the amount of apoptotic cells (31% reduction of DiOC6(3) low), and further improved the protection conferred by $\text{PM}_{2.5}$ exposure (54% vs. 37% reduction of DiOC6(3) low). Conversely, pretreatment with alpha-NF significantly reduced the protection provided by $\text{PM}_{2.5}$ exposure (25% vs. 37% reduction of DiOC6(3) low), although it did not noticeably modify the apoptotic effect of A23187. These findings are consistent with the involvement of AhR in the antiapoptotic effect of $\text{PM}_{2.5}$ exposure.

Finally, we tested the effect of AhR silencing in the antiapoptotic effect observed after $\text{PM}_{2.5}$ -exposure. For this, we used validated fluorescent-siRNA (Alexa Fluor 647) in order to select the fluorescent positive cells by flow cytometry. After siRNA optimization (80% transfected cells with 10 nM siRNA after 48 h, data not shown) and validation of AhR silencing by western blot (Figure 7B upper panel), DiOC(6)3 and PI assays were performed by flow cytometry on cells exposed or not to $\text{PM}_{2.5}$ and/or A23187 for 24 h as before. Figure 7B (lower graph) shows that AhR silencing significantly reduced the protection triggered by $\text{PM}_{2.5}$ (18% vs. 27% reduction of DiOC(6)3 low) alike the antagonist (alpha-NF) did. Interestingly, both the AhR silencing and AhR antagonist partially reduced the $\text{PM}_{2.5}$ -protective effect

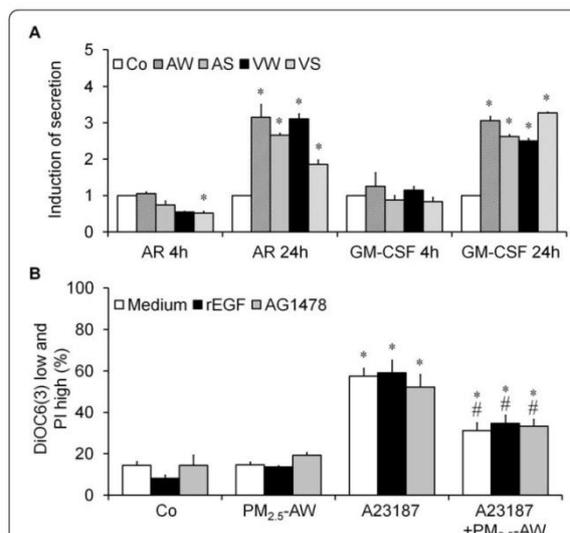


Figure 5 The antiapoptotic effect is not correlated with proinflammatory cytokines release after $\text{PM}_{2.5}$ exposure. (A) Proinflammatory potential of different batches of $\text{PM}_{2.5}$ 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (AW, AS, VW and VS) on 16HBE cells. After 4 h or 24 h particle exposure, Amphiregulin (AR) and granulocyte monocyte colony-stimulating factor (GM-CSF) secretion were evaluated by ELISA. Data are represented as mean \pm SD of triplicates. * indicates significance at $p < 0.001$, treated vs. control. (B) Flow cytometric analysis was done as before in the presence or absence of $\text{PM}_{2.5}$ -AW pretreatment and/or apoptosis inducer A23187 (3 μM). The implication of the EGFR was evaluated using the recombinant EGF ligand (rEGF 150 ng/ml) or the inhibitor AG1478 (1 μM). Data are represented as mean \pm SD of three independent results (* treated vs. control $p < 0.05$; # vs. A23187 alone, $p < 0.05$).

with almost the same extent (10%). The increase in alpha-NF concentration (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$, data not shown) or siRNA-AhR amount (25 nM, Additional file 1 Figure S3) did not completely abolish the protection suggesting that another pathway might be involved. Taken together, these results suggest that AhR partially contributes to the antiapoptotic effect of $\text{PM}_{2.5}$ exposure.

Discussion

To our knowledge, this article is the first study presenting evidence that low concentrations of PM which are not cytotoxic, have an antiapoptotic effect on human bronchial epithelial cells. We report here the cellular effects of $\text{PM}_{2.5}$ from two sites in Paris, sampled in winter and in summer. In order to remove the risk of cell type-specific events, our study was done in parallel on different human bronchial cell lines as well as on primary cells. We show that the four batches of $\text{PM}_{2.5}$ are not cytotoxic on human bronchial cells, at a range of concentration from 1 to 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. This is supported by data from flow cytometry, with the measurement of the main apoptotic hallmarks, as well as from electron

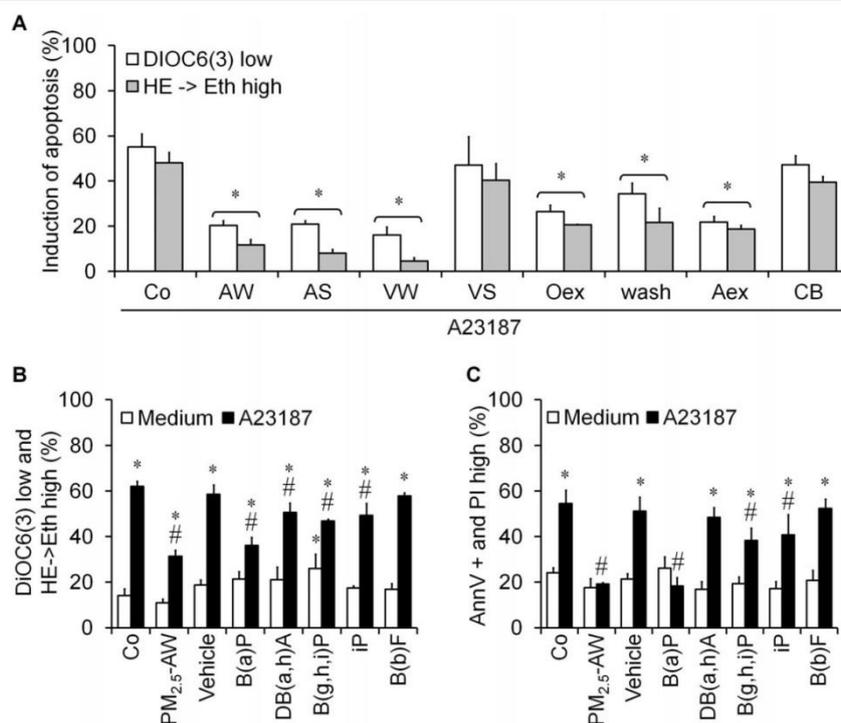


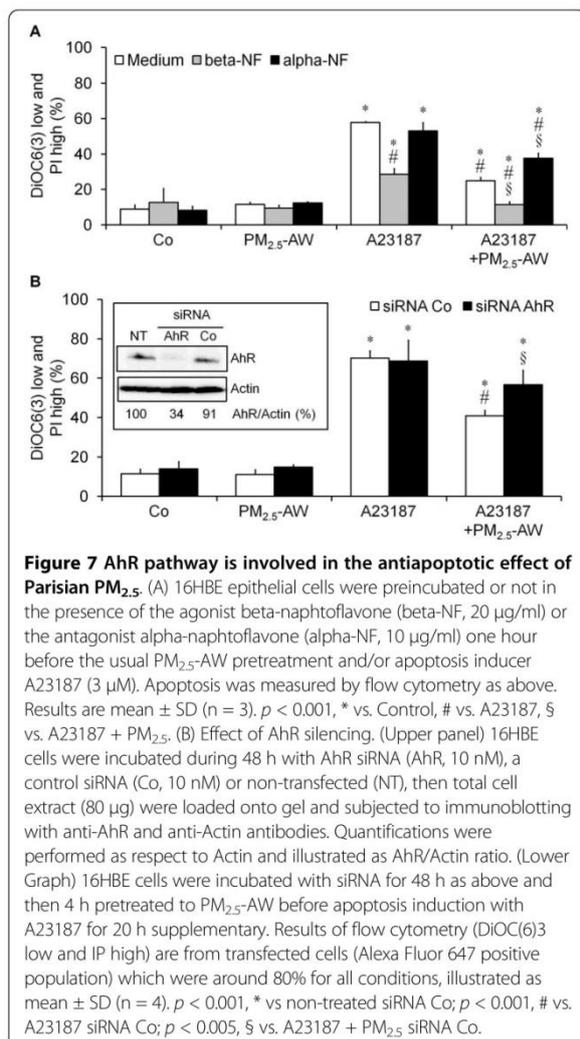
Figure 6 Role of the different components of PM_{2.5} in the antiapoptotic effect. (A) 16HBE cells were treated 4 h with different batches of PM_{2.5} 10 µg/cm² (AW, AS, VW and VS), the equivalent concentration of organic extracts (Oex, 4.27 mg/ml), aqueous extracts (Aex), washed particles (wash, 10 µg/cm²) of PM_{2.5}-AW and carbon black (CB, 10 µg/cm²) before a 20 h exposure to A23187 (3 µM). Apoptosis was assessed by flow cytometry and expressed as induction of apoptosis. Results are mean ± SD (n = 3). * p < 0.001 compared with A23187 alone. (B and C) Effect of heavy PAH on A23187-induced apoptosis. Treatments with PM_{2.5}-AW (10 µg/cm²), the vehicle (Cyclohexane, 1%), Benzo[a]pyrene (B(a)P, 270 nM), Dibenzo[a,h]anthracene (D,B(a,h)A, 35 nM), Benzo[g,h,i]perylene (B(g,h,i)P, 443 nM), Indeno[1,2,3-cd]pyrene (iP, 217 nM) and Benzo[b]fluoranthrene (B(b)F, 333 nM), were performed 4 h prior to induction of apoptosis by A23187 (3 µM). Results are mean ± SD (n = 4). * vs. control, p < 0.001; # vs. A23187, p < 0.05.

microscopy data. Our results were obtained with a low concentration of PM_{2.5} unlike previous publications performed with higher doses (e.g. 100 µg/cm², [18]). Indeed, the standard dose used here (10 µg/cm²) is a concentration which could mimic a five day exposure of PM_{2.5} in the tracheobronchial region, considering that PM_{2.5} mass deposition is 2.3 µg/cm²/24 h [11]. Our results are in agreement with a previous publication where BEAS-2B human bronchial cells were not susceptible to diesel exhaust particles-induced apoptosis [27] and here, we provided supplementary evidences of a non-toxicological activity of PM_{2.5} in NHBE primary culture. Moreover, in our studies and those of Sanchez-Perez *et al.* [28], the lack of induced-apoptosis triggered by PM at 10 µg/cm² suggests that a “sub-lethal” concentration could have different impacts on cell fate than at high concentrations.

The originality of this work is that PM_{2.5} exposure confers a specific decrease in apoptosis induced by A23187, staurosporine and oligomycin as demonstrated

in immortalized (16HBE), cancerous (NCI-H292, BEAS-2B) as well as primary normal bronchial epithelial cells (NHBE). In order to characterize the molecular mechanism of the antiapoptotic activity of PM_{2.5} exposure, first we demonstrated that the reduction of apoptosis is observed prior to proinflammatory cytokines secretion which led us to rule out the involvement of the classical EGFR signaling pathway as well as the proinflammatory cytokines secretion by bronchial epithelial cells. However, PM_{2.5}-antiapoptotic effect in addition to the well-documented inflammatory response might explain the maintenance of a prolonged inflammation state *in vivo* induced after pollution exposure and might delay repair processes of injured tissues [29].

To further delineate the mechanism of the antiapoptotic activity, a strategy would be to identify the cellular targets which are in common between staurosporine, A23187 and oligomycin. On one hand, staurosporine and A23187 are known to regulate cellular calcium signaling pathways inducing an endoplasmic reticulum stress



which leads to cytoplasmic calcium uptake [24], mitochondrial Ca²⁺ overload [30] and finally ΔΨm drop. Thus, PM_{2.5} exposure might counteract the Ca²⁺ uptake induced by these apoptotic inducers. However, this hypothesis is in discrepancy with the fact that the antiapoptotic effects of PM_{2.5} were not observed when using ionomycin, which is a well-known calcium ionophore, like A23187. Indeed, A23187 and ionomycin, which are both monocarboxylic ionophores, promote a selective increase of cytosolic Ca²⁺ [31]. But on the contrary to A23187 [24], a recent study showed that ionomycin did not allow the mitochondrial calcium overload in epimastigote cells of *Trypanosoma cruzi* [32]. The measurement of cytosolic and mitochondrial calcium uptakes in response to A23187 and ionomycin might allow us to understand why A23187-induced apoptosis is sensitive to PM while ionomycin is not. Moreover, caspases are the

main effectors of apoptosis, but A23187, staurosporine and ionomycin can also activate Ca²⁺-specific proteases, such as calpains [33,34]. Indeed, our preliminary studies showed that calpains are activated after A23187 treatment of 16HBE and NCI-H292 cells (data not shown). As described for oligomycin, A23187, but not ionomycin, is a specific inhibitor of mitochondrial ATP synthase also known to catalyze the direct exchange of Ca²⁺/2H⁺ in liver mitochondria [35] and to disrupt the mitochondrial transmembrane potential [36]. All these data suggest that ionomycin and A23187 might trigger the apoptotic process by slightly different mechanisms especially at the mitochondrial level. Thus, we hypothesize that PM_{2.5} could directly reduce apoptosis at the mitochondrial step by maintaining ΔΨm, or *via* the upregulation of antiapoptotic proteins such as Bcl-2 known to protect from A23187-induced apoptosis [24,37].

Humans are exposed to a mixture of compounds including organic and inorganic components adsorbed on PM. Evidences suggest that organic compounds such as the polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) can mimic the pro-oxidant [3] and apoptotic effect of PM [38]. Here, we investigated the role of different organic compounds (PAH, Oex), particles devoid of hydrosoluble components, (wash, CB) and aqueous extracts (Aex) of PM_{2.5} with respect to cell death. We found that the organic extracts and several heavy PAH, B(a)P in particular, could reproduce the antiapoptotic activity. Moreover, the water-soluble fraction also contributes to the reduction of apoptosis while carbon black, light PAH and endotoxins have no effect. In our study, B(a)P is the compound that protects the most efficiently from apoptosis induced by A23187. This points out a possible link between PM_{2.5}-exposure and the antiapoptotic effect observed herein, as also suggested by Hung *et al.* [39]. The harmful health impacts of PAH are well-known, like the promotion of cancers. B(a)P-diones, which are photomodified by the sunlight, were also found in air particulate matter. In agreement with our results, a recent work demonstrated that sunlight-exposed B(a)P inhibits apoptosis induced by cell detachment [40]. B(a)P is metabolized by cells, transformed into a reactive intermediate (anti-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxy-benzo[a]pyrene, BPDE) that causes DNA damage and mutations in tumor suppressor genes, such as p53 [41]. This toxic metabolite BPDE is also capable to suppress apoptosis of mammary epithelial cells [42].

The main cellular target of PAH adsorbed on PM is the aryl hydrocarbon receptor (AhR), thus we addressed the question of AhR involvement in the antiapoptotic effect after PM_{2.5} exposure. We showed here that the activation of AhR by the agonist beta-naphthoflavone improves the antiapoptotic effect. On the contrary, the inhibition of AhR (using a specific inhibitor or RNA

silencing) diminished the antiapoptotic effect suggesting that AhR is involved in this process. An additional argument is brought by the absence of antiapoptotic activity when we tested light PAH, which were previously shown to poorly promote AhR activation [43]. AhR is a cytoplasmic ligand-dependent transcription factor which translocates to the nucleus in order to bind specific Xenobiotic Responsive Elements in the promoter of its target genes, leading to the activation of phase I and II metabolizing enzymes and thus contributing to detoxification [44]. But in the absence of ligand, many data suggest other roles than detoxification [45] and recent evidences suggest that AhR inactivation could modify the expression of numerous genes, including those involved in cell cycle regulation [46]. In accordance with our results, other publications suggest an antiapoptotic activity of AhR by a direct interaction with E2F1 leading to the reduction of E2F1-mediated pro-apoptotic genes expression [47]. This is consistent with the idea that the AhR might modulate cell death at the mitochondrial checkpoint, for instance by upregulating the expression of antiapoptotic *bcl-2*, *bcl-xL*, *mcl-1* or *agr2* genes [48,49] or by repressing the pro-apoptotic *apaf-1* [47]. Moreover, AhR might indirectly regulate apoptosis through the MMP step by increasing the expression of the anti-apoptotic protein VDAC2 [50] which is known to participate to the permeability transition pore (PTP) and which also bind to and inhibit the apoptotic protein Bak [51]. In the light of our observations, it will be interesting to find out the genes encoding mitochondrial regulators which are modulated by AhR and involved in the protection observed after PM_{2.5}-exposure or B(a)P treatment. It is also important to point out that both A23187 and STS could induce apoptosis *via* a Ca²⁺-dependent pathway through mitochondrial PTP opening and that VDAC plays a crucial role in the transport of Ca²⁺ into this organelle [52].

Conclusion

In summary, Parisian PM_{2.5} are not cytotoxic in four cellular models of bronchial epithelial cells. However, PM_{2.5} exposure rapidly triggers an antiapoptotic effect at the mitochondrial level, which seems to be linked to the water-soluble and some PAH components adsorbed on particles. Finally, the AhR pathway partially contributes to the antiapoptotic effect of fine particles. Altogether, our results allow us to propose the hypothetical model in which desorbed PAH may activate the AhR leading to the regulation of genes involved in the mitochondrial checkpoint of apoptosis (Figure 8). In parallel, the water-soluble fraction seems to have similar effect on mitochondria by regulating unknown pathways. Our results are the first evidence of a missing link in the connection between adverse health effects of fine

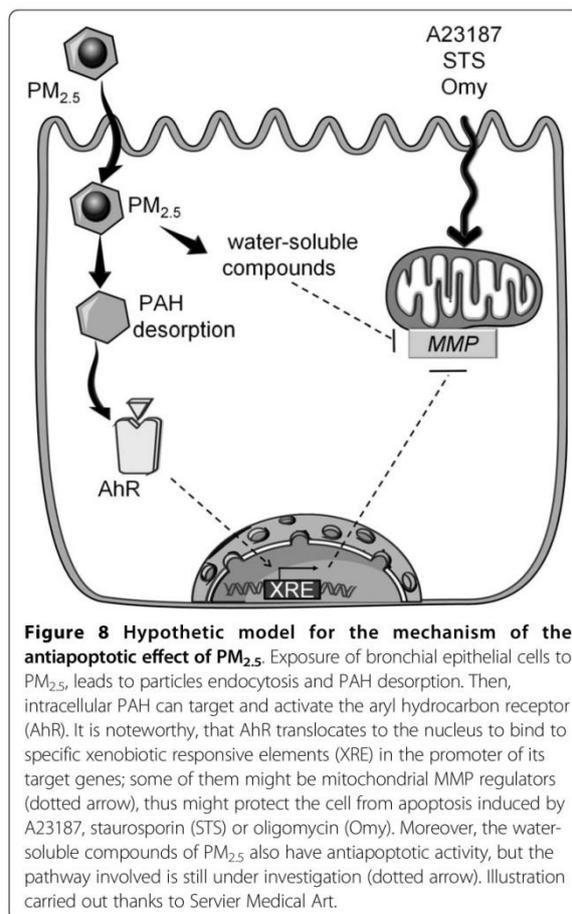


Figure 8 Hypothetic model for the mechanism of the antiapoptotic effect of PM_{2.5}. Exposure of bronchial epithelial cells to PM_{2.5} leads to particles endocytosis and PAH desorption. Then, intracellular PAH can target and activate the aryl hydrocarbon receptor (AhR). It is noteworthy, that AhR translocates to the nucleus to bind to specific xenobiotic responsive elements (XRE) in the promoter of its target genes; some of them might be mitochondrial MMP regulators (dotted arrow), thus might protect the cell from apoptosis induced by A23187, staurosporin (STS) or oligomycin (Omy). Moreover, the water-soluble compounds of PM_{2.5} also have antiapoptotic activity, but the pathway involved is still under investigation (dotted arrow). Illustration carried out thanks to Servier Medical Art.

particles and exacerbation of cancerous pathologies, via the cell death impediment in their presence. Furthermore, the antiapoptotic effect of PM_{2.5} associated with the well-documented inflammatory response might also explain the maintenance of a prolonged inflammation state *in vivo* induced after pollution exposure.

Materials and methods

Particles collection

Urban atmospheric PM_{2.5} were collected during winter or summer 2003 at two locations in Paris: an urban background station at Vitry-sur-Seine (VW: Vitry winter and VS: Vitry summer), a suburb of Paris; and a curbside station at Porte d'Auteuil bordering the highway ring road of Paris (AW: Auteuil winter and AS: Auteuil summer). Particles were recovered on 150 mm diameter nitrocellulose filters (HAWP, Millipore, Saint-Quentin-en-Yvelines, France) with a high volume sampler machine (DA-80 Digital, Switzerland, flowrate: 30 m³/h, [6]). Their PAH and metal content have been previously described [2]. PM_{2.5}-AW organic extracts (Oex) were obtained after

extraction by dichloromethane, then dried and redissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma). Oex were used at the concentration found on particles according to the soluble organic fraction (SOF) determined for PM_{2.5}-AW particle sample (10%). The aqueous extract of PM_{2.5}-AW (Aex) containing hydrosoluble components was obtained after the washing of the particle suspension and two centrifugations at 10,000 g, followed by filtration of the supernatant through a 0.22 µm Durapore® filter (polyvinylidene difluoride) (Millex® GV, Carrigtohill, Cork, Ireland). Cells were exposed to a volume of aqueous extract equivalent to the volume of particle suspension used. Particles collected after the two centrifugations constitute the washed PM_{2.5}-AW (wash) devoid of hydrosoluble components. Carbon black particles (CB, Fr101, 95 nm, 20 m²/g) were purchased from Degussa (Frankfurt, Germany). All particles were stored in DMEM medium and used at standard dose 10 µg/cm² (40 µg/ml). For treatment, after thawing, particles were sonicated three times for 20 s at 70W (Vibracell, Bioblock Scientific, Illkrich, France) and added directly onto the cells. Purified PAH, B(a)P, DB(a,h)A, B(g,h,i)P, iP, B(b)F, PA, FA and vehicle cyclohexane were purchased from Sigma.

Cell culture conditions

Human bronchial epithelial cells 16HBE14o- kindly provided by Dr. D.C. Gruenert (Colchester, VT, USA [53], were cultured in DMEM/F12 medium (Invitrogen) supplemented with 2 mM GlutaMAX™-I, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 1.25 µg/ml fungizone and 2% UltrosorG (UG, BioSeptra, France). Cells were grown to subconfluence on bovine collagen (Purecol Natucan, 0.5 mg/cm²) and human fibronectin coating (Sigma, 4 µg/cm²). Prior to particle treatment, UG was removed. BEAS-2B human bronchial epithelial cells (provided by Dr. J. Boczkowski, Faculté de Médecine Xavier Bichat, Université Paris 7, France) were cultured in LHC-9 medium containing retinoic acid (33 nM). The human lung mucoepidermoid carcinoma cells (NCI-H292) were purchased from the American Type Culture Collection (Rockville, MD) and cultured in RPMI-1640 medium (Invitrogen) supplemented with 1% GlutaMAX™-I and 10% fetal calf serum. Primary cultures of normal human bronchial epithelial (NHBE) cells were obtained from Lonza and cultured for in Clonetics® BEGM medium (Cambrex, Walkersville, MD, USA) supplemented with EGF 25 ng/ml. During treatment NHBE cells were grown in DMEM/F12 without growth factors.

Chemicals and apoptosis measurement

Cells were exposed 4 h to PM_{2.5} (1-50 µg/cm²) prior to addition of apoptotic inducers for additional 20 hours: rotenone (Rot, 5 µM), antimycin (AMA, 25 µg/ml), oligomycin (Omy, 5 µM), ionomycin (Iono, 0.5 µM), A23187

(3 µM), staurosporine (STS, 1 µM) and hydrogen peroxide (H₂O₂, 500 µM). All drugs were purchased from Sigma. Apoptotic parameters were quantified by flow cytometry performed on CyAn ADP LX (Dako Cytometry) funded by the Ligue Nationale contre le Cancer R03/75-79) using 3, 3 dihexyloxycarbocyanine iodide (DiOC₆ (3), 2 nM) for ΔΨ_m quantification, 10 µg/ml propidium iodide (PI) for determination of plasma membrane permeabilization, 2 µM hydroethidine (HE, Molecular Probes) for superoxide anion generation, and Annexin V conjugated with fluorescein isothiocyanate (FITC, Sigma) for the assessment of phosphatidylserine (PS) exposure [54]. Percentage of induction of apoptosis is calculated according to the following formula: % = 100 × (% of apoptotic treated cells - % of apoptotic control cells)/(100 - % of apoptotic control cells). Recombinant EGF (rEGF) and EGFR inhibitor (AG1478) are from Sigma. The specific AhR antagonist alpha-naphthoflavone (alpha-NF, 10 µg/ml, Sigma) or agonist beta-naphthoflavone (beta-NF, 20 µg/ml, Sigma) were used for 1 h prior to PM_{2.5} exposure and/or apoptosis induction.

Electron Microscopy

Cells were fixed 1 h by immersion at 4°C in 2.5% glutaraldehyde and 1% tannic acid in 0.1 M sodium cacodylate buffer, washed, postfixed in 2% osmium tetroxide deshydrated before embedding in Epon. Electron microscopy was performed with a transmission electron microscope (model Philips TECNAI 12), at 80 kV on ultrathin sections (60 nm).

Amphiregulin and GM-CSF secretion

Subconfluent 16HBE cells were exposed to PM_{2.5}-AW for 4 h or 24 h and supernatants were recovered, centrifuged at 15,000 × g for 15 min at 4°C to pellet particles, and then frozen at -80°C until further analysis. The concentrations of Amphiregulin (AR) and GM-CSF released were evaluated with an enzyme-linked immunosorbent assay kit (ELISA, R&D Systems Europe; Abingdon, UK) according to the manufacturer's recommendations.

AhR gene silencing

16HBE cells were simultaneously seeded at 2 × 10⁴ cells/cm² either in T25 dishes (for Western Blot) or in a P24 well plate (for flow cytometry) and incubated under normal cell culture conditions overnight. Then, 10 nM of AhR siRNA (Hs_AHR_6 AlexaFluor-647, Ref SI03043971, Qiagen) or control non-silencing siRNA (AllStars Neg AlexaFluor-647, Ref 1027287, Qiagen) and HiPerFect Transfection Reagent (Qiagen) were mixed separately in medium and the formed-complexes were then added drop-wise onto the cells, according to the manufacturer's recommendations. At 48 h after transfection, the cells were subjected to our usual protocol: 4 h

PM_{2.5} pretreatment and/or A23187 (3 μM) for additional 20 h.

Western Blots

Western Blots were performed according to the method previously described [55] and the primary antibodies used were: mouse-monoclonal anti-AhR (WH0000196M2, Sigma) and anti-Actin (A5441, Sigma). The secondary antibodies (peroxidase-conjugated) were anti-mouse immunoglobulin (A9044, Sigma). Immunoreactive bands were detected by chemiluminescence using a Chemiluminescent Sensitive HRP Substrate (BioFX Laboratories) using a FujiFilm LAS 4000 camera system.

Statistical analysis

All results are presented as the mean +/- standard deviation of three independent experiments. Data were analyzed using one-way ANOVA analysis of variance. The Dunnett's test was performed for all multiple comparisons versus control group. Moreover, the Student-Newman-Keuls test was used for all pairwise comparisons of mean responses among the different treatment groups (SigmaStat). Differences between groups were considered significant if the *p* value was less than 0.05.

Funding information

This work was supported by Agence Nationale de la Recherche [0599-5 SET 024-01], Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Université Paris Diderot-Paris 7 (Bourse de Master, Melanie Leroux), Région Ile de France (Allocation post-doctorale, Ioana Ferecatu [F-08-1261/R]), ADEME-Primequal [0462C0056], CAMPLP (Caisse d'Assurance Maladie des Professions Liberales de Province, Paris, France), Renault (DIMAT, for the supply and chemical analysis of PM_{2.5} and PM organic extracts) and Legs Poix.

Additional material

Additional file 1: Figure S1: The antiapoptotic effect of PM_{2.5} is not related to light three-rings PAH. Figure S2: The antiapoptotic effect of PM_{2.5} is not related to the adsorbed endotoxins. Figure S3: Higher amounts of AhR siRNA do not completely abolish the antiapoptotic effect of PM_{2.5} exposure.

Abbreviations

A23187: calcium ionophore (calcimycin); Aex: aqueous extracts; AhR: aryl hydrocarbon receptor; alpha-NF: alpha-naphthoflavone; AMA: antimycin A; AR: Amphiregulin; B(a)P: benzo[a]pyrene; B(b)F: benzo[b]fluoranthrene; B(g,h,i)P: benzo[g,h,i]perylene; beta-NF: beta-naphthoflavone; COPD: chronic obstructive pulmonary diseases; DB(a,h)A: dibenzo[a,h]anthracene; DEP: Diesel exhaust particles; DiOC₆(3): 3, 3 dihexyloxacarbocyanine iodide; EGF: epidermal growth factor; FA: fluoranthene; FITC: fluorescein isothiocyanate; GM-CSF: granulocyte monocyte colony-stimulating factor; H₂O₂: hydrogen peroxide; HE: hydroethidine; Iono: ionomycin; iP: indeo[1,2,3-cd]pyrene; LPS: lipopolysaccharide; MMP: mitochondrial membrane permeabilization; Oex:

organic extracts; Omy: oligomycin; PA: phenanthren; PAH: polycyclic aromatic hydrocarbons; PI: propidium iodide; PM: particulate matter; PM_{2.5}-AS: Auteuil summer; PM_{2.5}-AW: Auteuil winter; PM_{2.5}-VS: Vitry summer; PM_{2.5}-VW: Vitry winter; PS: phosphatidylserine; ROS: reactive oxygen species; Rot: rotenone; siRNA: small interfering RNA; STS: staurosporine; wash: washed particles; ΔΨ_m: mitochondrial transmembrane potential.

Acknowledgements

We thank Annie Jaeger and Marie Claude Gendron for their technical assistance and Emeline Assémat for advice on NHBE culture. We thank Mabel Jouve-San Roman from the Jacques Monod Institute (Paris, France) for help in electron microscopy. We also thank Sonja Boland, Martine Aggerbeck and Christophe Lemaire for their critical reading of the manuscript.

Author details

¹Université Paris Diderot-Paris 7. Unit of Functional and Adaptive Biology (BFA) CNRS EAC 4413, Laboratory of Molecular and Cellular Responses to Xenobiotics, Bâtiment Buffon, case courrier 7073, 5 rue Thomas Mann, 75013 Paris, France. ²Université Paris Diderot-Paris 7. Flow Cytometry Unit, Jacques Monod Institute, 75013 Paris, France.

Authors' contributions

IF and KA designed the research, analyzed the data and drafted the paper. IF, MCB, CB, ML, NB and KA performed the experiments. AB and FM contributed to the interpretation of the data and helped improving the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 30 April 2010 Accepted: 21 July 2010 Published: 21 July 2010

References

1. Boland S, Baeza-Squiban A, Marano F: **Toxicité respiratoire des particules Diesel: les mécanismes cellulaires et moléculaires.** *Médecine Sciences* 2001, **17**:596-603.
2. Baulig A, Poirault JJ, Ausset P, Schins R, Shi T, Baralle D, Dorlhene P, Meyer M, Lefevre R, Baeza-Squiban A, Marano F: **Physicochemical characteristics and biological activities of seasonal atmospheric particulate matter sampling in two locations of Paris.** *Environ Sci Technol* 2004, **38**:5985-5992.
3. Baulig A, Garlatti M, Bonvallet V, Marchand A, Barouki R, Marano F, Baeza-Squiban A: **Involvement of reactive oxygen species in the metabolic pathways triggered by diesel exhaust particles in human airway epithelial cells.** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003, **285**:L671-679.
4. Boland S, Baeza-Squiban A, Fournier T, Houcine O, Gendron MC, Chevrier M, Jouvenot G, Coste A, Aubier M, Marano F: **Diesel exhaust particles are taken up by human airway epithelial cells in vitro and alter cytokine production.** *Am J Physiol* 1999, **276**:L604-613.
5. Calcabrini A, Meschini S, Marra M, Falzano L, Colone M, De Berardis B, Paoletti L, Arancia G, Fiorentini C: **Fine environmental particulate engenders alterations in human lung epithelial A549 cells.** *Environ Res* 2004, **95**:82-91.
6. Baulig A, Blanchet S, Rumelhard M, Lacroix G, Marano F, Baeza-Squiban A: **Fine urban atmospheric particulate matter modulates inflammatory gene and protein expression in human bronchial epithelial cells.** *Front Biosci* 2007, **12**:771-782.
7. Hetland RB, Cassee FR, Lag M, Refsnæs M, Dybing E, Schwarze PE: **Cytokine release from alveolar macrophages exposed to ambient particulate matter: heterogeneity in relation to size, city and season.** *Part Fibre Toxicol* 2005, **2**:4.
8. Gualtieri M, Mantecchia P, Cetta F, Camatini M: **Organic compounds in tire particle induce reactive oxygen species and heat-shock proteins in the human alveolar cell line A549.** *Environ Int* 2008, **34**:437-442.
9. Rumelhard M, Ramgolam K, Hamel R, Marano F, Baeza-Squiban A: **Expression and role of EGFR ligands induced in airway cells by PM_{2.5} and its components.** *Eur Respir J* 2007, **30**:1064-1073.
10. Pope CA, Burnett RT, Thun MJ, Calle EE, Krewski D, Ito K, Thurston GD: **Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long-term exposure to fine particulate air pollution.** *JAMA* 2002, **287**:1132-1141.

11. 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.** *Clin Immunol* 2003, **109**:250-265.
12. Hertz-Picciotto I, Baker RJ, Yap PS, Dostal M, Joad JP, Lipsett M, Greenfield T, Herr CE, Benes I, Shumway RH, et al: **Early childhood lower respiratory illness and air pollution.** *Environ Health Perspect* 2007, **115**:1510-1518.
13. Sint T, Donohue JF, Ghio AJ: **Ambient air pollution particles and the acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease.** *Inhal Toxicol* 2008, **20**:25-29.
14. Norman R, Cairncross E, Witi J, Bradshaw D: **Estimating the burden of disease attributable to urban outdoor air pollution in South Africa in 2000.** *S Afr Med J* 2007, **97**:782-790.
15. Chung A, Brauer M, del Carmen Avila-Casado M, Fortoul T, Wright JL: **Chronic exposure to high levels of particulate air pollution and small airway remodeling.** *Environ Health Perspect* 2003, **111**:714-718.
16. Tagaya E, Tamaoki J: **Mechanisms of airway remodeling in asthma.** *Allergol Int* 2007, **56**:331-340.
17. Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, El-Deiry WS, Golstein P, Green DR, et al: **Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009.** *Cell Death Differ* 2009, **16**:3-11.
18. Zhang J, Ghio AJ, Chang W, Kamdar O, Rosen GD, Upadhyay D: **Bim mediates mitochondria-regulated particulate matter-induced apoptosis in alveolar epithelial cells.** *FEBS Lett* 2007, **581**:4148-4152.
19. Dagher Z, Garcon G, Billet S, Gosset P, Ledoux F, Courcot D, Aboukais A, Shirali P: **Activation of different pathways of apoptosis by air pollution particulate matter (PM2.5) in human epithelial lung cells (L132) in culture.** *Toxicology* 2006, **225**:12-24.
20. Agopyan N, Head J, Yu S, Simon SA: **TRPV1 receptors mediate particulate matter-induced apoptosis.** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004, **286**:L563-572.
21. Franco R, Sanchez-Olea R, Reyes-Reyes EM, Panayiotidis Ml: **Environmental toxicity, oxidative stress and apoptosis: menage a trois.** *Mutat Res* 2009, **674**:3-22.
22. Pulido MD, Parrish AR: **Metal-induced apoptosis: mechanisms.** *Mutat Res* 2003, **533**:227-241.
23. Soukup JM, Becker S: **Human alveolar macrophage responses to air pollution particulates are associated with insoluble components of coarse material, including particulate endotoxin.** *Toxicol Appl Pharmacol* 2001, **171**:20-26.
24. Deniaud A, Sharaf el dein O, Maillier E, Poncet D, Kroemer G, Lemaire C, Brenner C: **Endoplasmic reticulum stress induces calcium-dependent permeability transition, mitochondrial outer membrane permeabilization and apoptosis.** *Oncogene* 2008, **27**:285-299.
25. 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.** *Inhal Toxicol* 2009, **21**:115-122.
26. Rumelhard M, Ramgolam K, Auger F, Dazy AC, Blanchet S, Marano F, Baeza-Squiban A: **Effects of PM2.5 components in the release of amphiregulin by human airway epithelial cells.** *Toxicol Lett* 2007, **168**:155-164.
27. Hiura TS, Kaszubowski MP, Li N, Nel AE: **Chemicals in diesel exhaust particles generate reactive oxygen radicals and induce apoptosis in macrophages.** *J Immunol* 1999, **163**:5582-5591.
28. Sanchez-Perez Y, Chirino Yi, Osornio-Vargas AR, Morales-Barcenas R, Gutierrez-Ruiz C, Vazquez-Lopez I, Garcia-Cuellar CM: **DNA damage response of A549 cells treated with particulate matter (PM10) of urban air pollutants.** *Cancer Lett* 2009, **278**:192-200.
29. Kuwano K: **Involvement of epithelial cell apoptosis in interstitial lung diseases.** *Intern Med* 2008, **47**:345-353.
30. Hamahata K, Adachi S, Matsubara H, Okada M, Imai T, Watanabe K, Toyokuni SY, Ueno M, Wakabayashi S, Katanosaka Y, et al: **Mitochondrial dysfunction is related to necrosis-like programmed cell death induced by A23187 in CEM cells.** *Eur J Pharmacol* 2005, **516**:187-196.
31. Liu C, Hermann TE: **Characterization of ionomycin as a calcium ionophore.** *J Biol Chem* 1978, **253**:5892-5894.
32. Irigoien F, Inada NM, Fernandes MP, Piacenza L, Gadelha FR, Vercesi AE, Radi R: **Mitochondrial calcium overload triggers complement-dependent superoxide-mediated programmed cell death in Trypanosoma cruzi.** *Biochem J* 2009, **418**:595-604.
33. Orrenius S, Zhivotovsky B, Nicotera P: **Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003, **4**:552-565.
34. Mattson MP, Chan SL: **Calcium orchestrates apoptosis.** *Nat Cell Biol* 2003, **5**:1041-1043.
35. Brand MD: **Electroneutral efflux of Ca2+ from liver mitochondria.** *Biochem J* 1985, **225**:413-419.
36. Reed PW, Lardy HA: **A23187: a divalent cation ionophore.** *J Biol Chem* 1972, **247**:6970-6977.
37. Zhang QH, Sheng HP, Loh TT: **bcl-2 protects HL-60 cells from apoptosis by stabilizing their intracellular calcium pools.** *Life Sci* 2001, **68**:2873-2883.
38. Xia T, Korge P, Weiss JN, Li N, Venkatesen MI, Sioutas C, Nel A: **Quinones and aromatic chemical compounds in particulate matter induce mitochondrial dysfunction: implications for ultrafine particle toxicity.** *Environ Health Perspect* 2004, **112**:1347-1358.
39. Hung HS, Wu WJ, Cheng YW, Wu TC, Chang KL, Lee H: **Association of cooking oil fumes exposure with lung cancer: involvement of inhibitor of apoptosis proteins in cell survival and proliferation in vitro.** *Mutat Res* 2007, **628**:107-116.
40. Teranishi M, Toyooka T, Ohura T, Masuda S, Ibuki Y: **Benzo[a]pyrene exposed to solar-simulated light inhibits apoptosis and augments carcinogenicity.** *Chem Biol Interact* 2010.
41. Conney AH, Chang RL, Jerina DM, Wei SJ: **Studies on the metabolism of benzo[a]pyrene and dose-dependent differences in the mutagenic profile of its ultimate carcinogenic metabolite.** *Drug Metab Rev* 1994, **26**:125-163.
42. Burdick AD, Ivnitski-Steele ID, Lauer FT, Burchiel SW: **PYK2 mediates anti-apoptotic AKT signaling in response to benzo[a]pyrene diol epoxide in mammary epithelial cells.** *Carcinogenesis* 2006, **27**:2331-2340.
43. Willett KL, Randerath K, Zhou GD, Safe SH: **Inhibition of CYP1A1-dependent activity by the polynuclear aromatic hydrocarbon (PAH) fluoranthene.** *Biochem Pharmacol* 1998, **55**:831-839.
44. Hankinson O: **The aryl hydrocarbon receptor complex.** *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1995, **35**:307-340.
45. Puga A, Ma C, Marlowe JL: **The aryl hydrocarbon receptor cross-talks with multiple signal transduction pathways.** *Biochem Pharmacol* 2009, **77**:713-722.
46. Fan Y, Boivin GP, Knudsen ES, Nebert DW, Xia Y, Puga A: **The aryl hydrocarbon receptor functions as a tumor suppressor of liver carcinogenesis.** *Cancer Res* 2010, **70**:212-220.
47. Marlowe JL, Fan Y, Chang X, Peng L, Knudsen ES, Xia Y, Puga A: **The aryl hydrocarbon receptor binds to E2F1 and inhibits E2F1-induced apoptosis.** *Mol Biol Cell* 2008, **19**:3263-3271.
48. Vogel CF, Li W, Sciallo E, Newman J, Hammock B, Reader JR, Tuscano J, Matsumura F: **Pathogenesis of aryl hydrocarbon receptor-mediated development of lymphoma is associated with increased cyclooxygenase-2 expression.** *Am J Pathol* 2007, **171**:1538-1548.
49. Ambolet-Camoit A, Bui LC, Pierre S, Chevallier A, Marchand A, Coumoul X, Garlatti M, Andreau K, Barouki R, Aggerbeck M: **2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin counteracts the p53 response to a genotoxicant by up-regulating expression of the metastasis marker AGR2 in the hepatocarcinoma cell line HepG2.** *Toxicol Sci* 2010.
50. Sarioglu H, Brandner S, Habberger M, Jacobsen C, Lichtmanegger J, Wormke M, Andrae U: **Analysis of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced proteome changes in 5L rat hepatoma cells reveals novel targets of dioxin action including the mitochondrial apoptosis regulator VDAC2.** *Mol Cell Proteomics* 2008, **7**:394-410.
51. Cheng EH, Sheiko TV, Fisher JK, Craigen WJ, Korsmeyer SJ: **VDAC2 inhibits BAK activation and mitochondrial apoptosis.** *Science* 2003, **301**:513-517.
52. Bathori G, Csordas G, Garcia-Perez C, Davies E, Hajnoczky G: **Ca2+-dependent control of the permeability properties of the mitochondrial outer membrane and voltage-dependent anion-selective channel (VDAC).** *J Biol Chem* 2006, **281**:17347-17358.
53. Cozens AL, Yezzi MJ, Kunzelmann K, Ohnri T, Chin L, Eng K, Finkbeiner WE, Widdicombe JH, Gruenert DC: **CFTR expression and chloride secretion in polarized immortal human bronchial epithelial cells.** *Am J Respir Cell Mol Biol* 1994, **10**:38-47.
54. Andreau K, Castedo M, Perfettini JL, Roumier T, Pichart E, Souquere S, Vivet S, Larochette N, Kroemer G: **Preapoptotic chromatin condensation upstream of the mitochondrial checkpoint.** *J Biol Chem* 2004, **279**:55937-55945.

55. Ferecatu I, Bergeaud M, Rodriguez-Enfedaque A, Le Floch N, Oliver L, Rincheval V, Renaud F, Vallette FM, Mignotte B, Vayssiere JL: **Mitochondrial localization of the low level p53 protein in proliferative cells.** *Biochem Biophys Res Commun* 2009, **387**:772-777.

doi:10.1186/1743-8977-7-18

Cite this article as: Ferecatu *et al.*: Polycyclic aromatic hydrocarbon components contribute to the mitochondria-antiapoptotic effect of fine particulate matter on human bronchial epithelial cells *via* the aryl hydrocarbon receptor. *Particle and Fibre Toxicology* 2010 **7**:18.

**Submit your next manuscript to BioMed Central
and take full advantage of:**

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



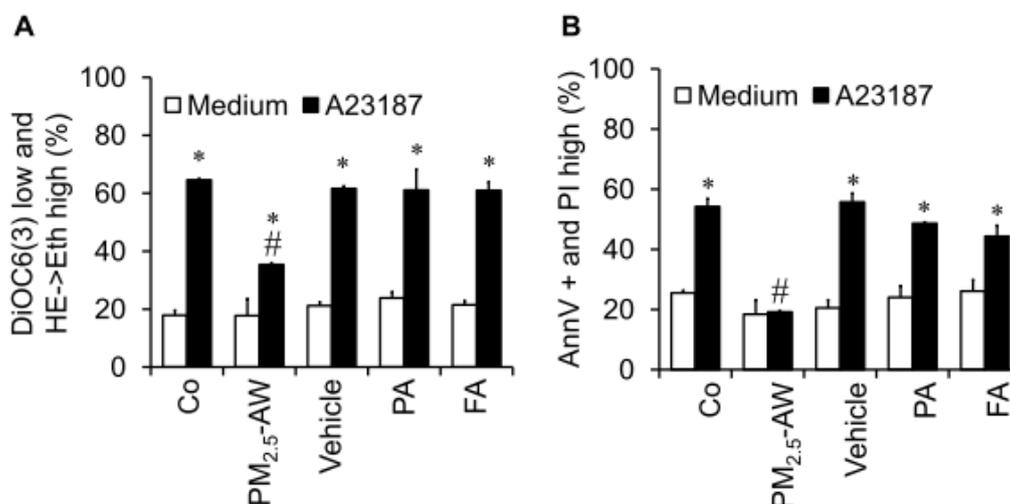


Figure S1: The antiapoptotic effect of PM_{2.5} is not related to light three-rings PAH. Epithelial 16HBE cells were pretreated with PM_{2.5}-AW (10 µg/cm²), the vehicle (Cyclohexane, 1%), Phenanthrene (PA, 124 nM), and Fluoranthene (FA, 268 nM) 4 h prior to apoptotic induction by A23187 (3 µM) and before flow cytometric analysis of cells presenting simultaneously DiOC6(3) low and HE high staining (A) or an Annexin V+ and PI high (B). Results are mean ± SD (n=4). Significance was calculated with respect to control (*, p<0.001) or with respect to A23187 alone (#, p<0.001).

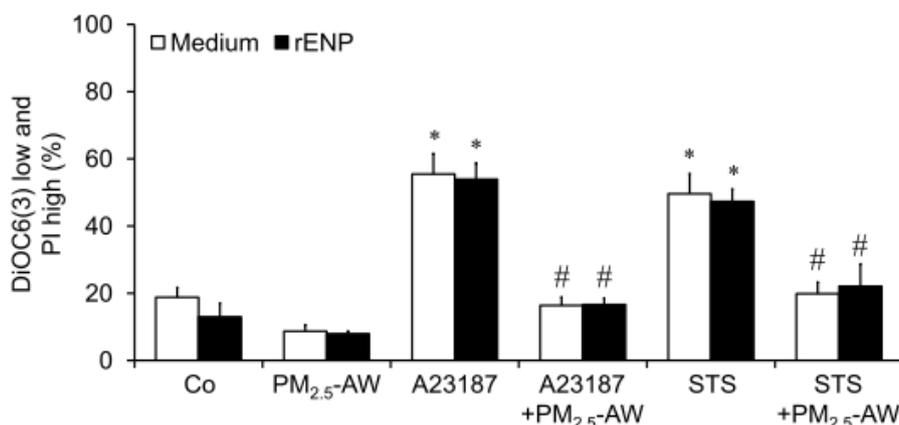


Figure S2: The antiapoptotic effect of PM_{2.5} is not related to the adsorbed endotoxins. Epithelial 16HBE cells were pretreated 1 h with rENP (endotoxin neutralizing protein, 2 µg/µl) before the usual 4 h exposure to PM_{2.5}-AW (10 µg/cm²) and treated 20 h with A23187(3 µM) or staurosporine (STS, 1µM). Apoptosis was assessed by flow cytometry with the measurement of DiOC(6)3 low and PI high. Results are mean ± SD (n=3). Significance was calculated vs control (*, p<0.001), vs apoptosis inducer alone (#, p<0.001).

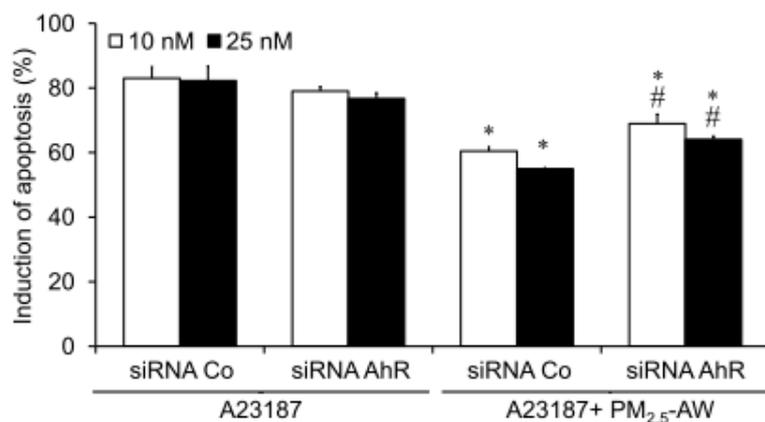


Figure S3: Higher amounts of siRNA AhR do not completely abolish the antiapoptotic effect of PM_{2.5} exposure. 16HBE cells were incubated during 48 h with either 10 nM or with 25 nM of siRNA for control (siRNA Co) or AhR (siRNA AhR). Cells were then pretreated 4 h with PM_{2.5}-AW before induction of apoptosis with A23187 for additional 20 h. Results of flow cytometry (DiOC(6)3 low) are from Alexa Fluor 647 positive transfected cells, illustrated as mean \pm SD (n=3). Significance was calculated with respect to A23187 siRNA Co (*, p<0.001), and with respect to siRNA Co for the A23187 + PM_{2.5} condition (#, p<0.01).

Annexe 2 :

**“Health and cellular impacts of air pollutants:
from cytoprotection to cytotoxicity”.**

Karine Andreau, Melanie Leroux and Aïda Bouharrou

Biochemistry Research International 2012, 493894

Review Article

Health and Cellular Impacts of Air Pollutants: From Cytoprotection to Cytotoxicity

Karine Andreau, Melanie Leroux, and Aida Bouharrou

*Laboratory of Molecular and Cellular Responses to Xenobiotics, Unit of Functional and Adaptive Biology (BEA),
CNRS EAC 4413, University of Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, 75013 Paris, France*

Correspondence should be addressed to Karine Andreau, karine.andreau@univ-paris-diderot.fr

Received 17 November 2011; Revised 17 January 2012; Accepted 18 January 2012

Academic Editor: Etienne Jacotot

Copyright © 2012 Karine Andreau et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Air pollution as one of the ravages of our modern societies is primarily linked to urban centers, industrial activities, or road traffic. These atmospheric pollutants have been incriminated in deleterious health effects by numerous epidemiological and *in vitro* studies. Environmental air pollutants are a heterogeneous mixture of particles suspended into a liquid and gaseous phase which trigger the disruption of redox homeostasis—known under the term of cellular oxidative stress—in relation with the establishment of inflammation and cell death *via* necrosis, apoptosis, or autophagy. Activation or repression of the apoptotic process as an adaptative response to xenobiotics might lead to either acute or chronic toxicity. The purpose of this paper is to highlight the central role of oxidative stress induced by air pollutants and to focus on the subsequent cellular impacts ranging from cytoprotection to cytotoxicity by decreasing or stimulating apoptosis, respectively.

1. Introduction

The air is fundamental and essential for living beings but epidemiological studies provide evidences of the harmful impacts of air pollution by increased cardiopulmonary morbidity and mortality as well as reproductive disorders and cancers [1, 2]. Some air toxics are released from natural sources but most are originated from anthropogenic sources, such as road traffic, construction, industrial, and agricultural activities [3]. Among almost two hundred hazardous air pollutants—mainly corresponding to suspended particulate matter and gases—only six are monitored by the Environmental Protection Agency (EPA) which sets the National Ambient Air Quality Standards (NAAQSs) for air particles, ozone, carbon monoxide, sulfur oxides, nitrogen oxides, and lead (Table 1). In addition, some other air pollutants are subjected to a specific attention because of their deleterious health impacts, like asbestos, mercury, chlorofluorocarbons, and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) [4].

At the present time, air pollution is considered as a major inducer of harmful health effects, especially due to solids or liquid droplets suspended in air and termed particulate

matter (PM). PMs are usually defined as PM₁₀, PM_{2.5} and PM_{0.1} that correspond to airborne particles with an aerodynamic diameter equal or less than 10, 2.5 and 0.1 microns, respectively. PM₁₀ and PM_{2.5} are often classified as the “coarse” fraction; PM_{2.5}–PM_{0.1} as the “fine” fraction of particles (FP) and PM_{0.1} correspond to the “ultrafine” fraction of particles (UFP). Although the transition from gasoline to diesel fuel has reduced emissions of carbon monoxide (CO), this has revealed new problems related to the emission of FP, UFP, and diesel exhaust particles (DEP). Engineered nanoparticles (NP), defined as particles having at least one dimension less than 100 nm, are in the same scale in size than atmospheric UFP, but NPs possess specific properties regarding their atomic scale capable of interacting directly with biological molecules. The surface parameter of PM is essential for understanding the biological effects of particulate pollution because size decrease is inversely correlated with the percentage of molecules on the surface and therefore with the surface reactivity. Thus, UFP and NP have a high surface reactivity that is responsible for the production of free radicals, for instance [5].

TABLE 1: Air pollutants. The National Ambient Air Quality Standards (NAAQSs) are set by the Environmental Protection Agency under authority of the Clean Air Act and define the maximum allowable concentrations of outdoor air pollutants in the USA. Units of NAAQS are parts per million (ppm) by volume, parts per billion (ppb-1 part in 1,000,000,000) by volume, milligrams per cubic meter of air (mg/m^3), and micrograms per cubic meter of air ($\mu\text{g}/\text{m}^3$). Average time refers to time for which the values of NAAQS should not be exceeded in the ambient air [14–16].

Pollutants	Main sources	NAAQS	
		Level	Average time
Asbestos	Electrical and building insulation (fiber cement)		
Carbon dioxide (CO_2)	Fossil fuel combustion		
Carbon monoxide (CO)	Incomplete combustion, exhaust from motor vehicles, emissions from certain industrial processes (agglomeration of ore, steel, waste incineration)	35 ppm ($10 \text{ mg}/\text{m}^3$) 9 ppm ($10 \text{ mg}/\text{m}^3$)	1 hour 8 hours
Chlorofluorocarbons (CFCs)	Use in consumer goods (aerosol propellants, foams, fire extinguishers, refrigerants)		
<i>Dioxins and dioxin-like compounds</i>	Byproducts of various industrial processes		
Polychlorinated dibenzo-p-dioxins (PCDDs)	Waste incineration, metal smelting and refining, chlorinated pesticides, and herbicides		
Polychlorinated dibenzofurans (PCDFs)	Environmental accidents contamination, waste incineration, chlorinated pesticides, and herbicides		
Polychlorinated biphenyls (PCBs)	Used as coolants and insulating fluids for transformers and capacitors, and as plasticizers in paints and cements, additives in flexible PVC coatings		
Hydrogen sulfide (H_2S)	Paper pulp production and oil refineries		
Methane (CH_4)	Coal mines exploitation, garbage landfills, livestock, gas distribution		
Nitrogen dioxide (NO_2)		100 ppb 53 ppb	1 hour Annual
Nitrogen monoxide (NO)			
<i>Nitrogen oxides (NOx)</i>	Fossil fuel combustion, industrial processes (nitric acid production, fertilizer manufacturing, surface treatment)		
Nitrous oxide (N_2O)	Fossil fuel combustion, some industrial processes, motor vehicles, soils, and oceans		
Ozone (O_3)	Tropospheric ozone formed from reaction between UV, NOx, and VOC	0.12 ppm ($235 \mu\text{g}/\text{m}^3$) 0.075 ppm ($150 \mu\text{g}/\text{m}^3$)	1 hour 8 hours
<i>Particulate matter (PM)</i>			
PM ₁₀	Natural dust, sea salt, industrial, agriculture, and forestry activities	150 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	24 hours
PM _{2.5}	Fossil fuel combustion, road traffic, and other transports, agriculture, and manufacturing	35 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 15.0 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	24 hours Annual
PM _{0.1}	Residential heating, road transport, manufacturing, agriculture, waste processing plants		
Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)	Incomplete combustion of organic material (wood burning, fossil fuel combustion, etc.)		
Sulfur dioxide (SO_2)	Sulfur-containing fossil fuel combustion (coal, lignite, petroleum coke, heavy fuel oil, heating oil, diesel),	75 ppb 0.14 ppm ($365 \mu\text{g}/\text{m}^3$) 0.030 ppm ($80 \mu\text{g}/\text{m}^3$)	1 hour 24 hours Annual

TABLE 1: Continued.

Pollutants	Main sources	NAAQS	
		Level	Average time
<i>Toxic metals</i>			
Antimony (Sb)	miscellaneous plastics manufacturing, petroleum products, and fabricated structural metal products, thermal power generation		
Arsenic (As)	Heavy fuel oil combustion		
Cadmium (Cd)	Waste incineration, heavy fuel oil, and biomass burning		
Chromium (Cr)	Production of glass, cement, ferrous metallurgy, and foundries		
Cobalt (Co)	Nuclear facilities, production of steel and alloys		
Copper (Cu)	Combustion and waste treatment, processes of ferrous and nonferrous metallurgy		
Lead (Pb)	Road transport, electric batteries production	0.15 µg/m ³	Rolling 3 Months
Mercury (Hg)	Coal and oil burning, chlorine production, incineration of household, and industrial waste		
Nickel (Ni)	Heavy fuel oil combustion		
Selenium (Se)	Glass production, heavy fuel oil combustion		
Vanadium (V)	Oil refineries, combustion of fossil fuels		
Zinc (Zn)	Coal and heavy fuel combustion, ferrous and nonferrous metallurgy, waste incineration		
Volatile organic compounds (VOCs)	Road transport, industrial processes involving the use (basic and fine chemicals, metal degreasing, paint application, printing, adhesives, rubber, etc.), or not of solvents (petroleum refining, use of CFCs, production of alcoholic beverages), household products		

The chemical composition of PM varies according to environmental parameters (weather, continental, and/or regional influences) as well as to size. Indeed, PM₁₀ are fragments from other larger particles observed during localized pollution episodes in urban areas and that may also include some pollen, spore, and plant. PM₁₀ come from several sources like road transport, industrial, or construction activities [6] (Table 1). The urban aerosol mainly contains fine and ultrafine particles which consist of a core of elemental carbon from fossil fuel combustion and termed soots. Some inorganic components (ammonium, chloride, sulfates, nitrates, and metals), organic compounds—such as alkan, alkanolic acid, aliphatic acid, quinone, and PAHs—and biological species are adsorbed onto this carbon core [7].

The size of particles is directly linked to their deleterious potential on health. Indeed, FP, UFP, and DEP are inhaled with the air, penetrate deeply into the respiratory tract, and are mainly deposited in tracheobronchial and alveolar regions [5]. Industrial air pollution was clearly related to increased mortality and morbidity from respiratory and cardiovascular origin during episodes of heavily polluted fog (smog) in London in 1952 and the Ruhr in 1985 associated with 4,000 to 120,000 premature deaths, respectively, and an 8% increase in daily mortality. In addition, exposure to PM_{2.5}, PM₁₀, SO₂, and black smoke has been shown as being responsible for asthma exacerbation in both adults

and children [8]. The International Agency for Research on Cancer (IARC) classifies DEP as a possible carcinogen (Group 2A) [9]. Thus, epidemiological studies show that occupational exposure of truck drivers is associated with an increased incidence of lung cancer [10]. Based on the statistical model of an American study, the French Agency of Environmental and Occupational Health Safety (AFSSET) estimated in 2002 that 1117 lung cancer deaths were caused by PM_{2.5} exposure, a fraction of 11% [11]. Unlike the short-term effects linked to an inflammatory response, impacts of PM on carcinogenesis come from prolonged exposure. When mucociliary and alveolar clearance functions are exceeded, PM persist into lungs, leading to thickening of bronchial walls, an airway remodeling characterized by the hyperplasia of goblet and smooth muscle cells and a subepithelial fibrosis, as has been demonstrated in asthma and COPD (Chronic Obstructive Pulmonary Disease) [12]. Thereby, PM may act directly on the respiratory epithelium causing a range of various deteriorations to the total desquamation. To overcome this, the self-renewal of stem cells is accelerated, but proliferation and differentiation processes may escape to control and these adult lung stem cells are now considered as lung tumor initiators (see for review [13]). Given that the modulation of apoptotic cell death is an essential step in tumor initiation and promotion, this paper will focus on the molecular mechanisms of both induction and resistance

to apoptosis with a particular attention to mitochondria, the main executor (or executioner) of apoptosis.

2. Apoptosis

Since the remarkable scientific advances on the knowledge of cell death process, necrosis is not anymore considered as the only consequence of exposure to the toxic air pollutants. Indeed, impacts on activation or repression of apoptosis are now better described [17] and numerous *in vitro* studies demonstrated the modulation of apoptosis by environmental air pollutants including heavy or transition metals [18–20], carbon monoxide [21], and nondioxin-like PCBs (polychlorinated biphenyls) [22]. Apoptosis is a programmed cell death defined by morphological alterations (for review see [23]) leading to the progressive condensation of the cell into apoptotic bodies containing organelles or cytoplasmic fragments that are rapidly recognized and engulfed by neighboring cells and macrophages. The late-morphological changes are accompanied by biological alterations, such as the modification of lipid composition of the plasma membrane and permeability [24, 25], or the activation of various enzymes (e.g., phospholipase A2, DNase II, the caspase-activated DNase (CAD) [26], endonuclease G (EndoG) [27], the apoptosis-inducing factor (AIF) [28, 29]) leading to DNA fragmentation. All these apoptotic features may require activation of specific proteases called Caspases—for “cysteinyI aspartate-cleaving protease”—a family of proteins containing at least fourteen members in mammals, eight of them actively participate to the execution of apoptosis while the others are involved in inflammation [30]. Under normal conditions, initiator Caspases-2, -8, -9, and -10 are expressed as inactive zymogens with a large N-terminal prodomain required for their autocatalytic activation into a tetrameric enzyme. When activated, the initiator caspase activates some executioner Caspases-3, -6, and -7, which in turn cleave specific substrates thus modifying multiple cellular functions such as DNA repair (DNA-PK, U1–70 kD, PARP), chromatin condensation (inhibitor of Caspase-Activated DNase), or cytoskeleton stability (α -Fodrin, Lamin A, Actin); for review see [31].

The apoptotic cell death and caspases activation are mainly elicited by extrinsic and intrinsic pathways which are initiated by death receptors and intracellular events leading to mitochondrial dysfunction, respectively. In the extrinsic pathway, ligands of death receptors belonging to “tumour necrosis factor receptor” family (TNFR) promote formation of the multimolecular complex termed DISC (death-inducing signalling complex) [32] through the recruitment of adaptor proteins FADD (Fas-associated protein with death domain) and/or TRADD (TNF-receptor-associated death domain protein) and the subsequent activation of Caspase-8 and executive caspases.

In the intrinsic pathway (also called “mitochondrial pathway”), stimuli from different intracellular pathways (e.g., withdrawal of growth factors, exposure to toxins, hypoxia, bacterial or viral infections, physical or chemical stressors) converge on mitochondrial alterations that are the

point of no return in apoptotic cell death. As reviewed elsewhere, permeabilization of outer and inner mitochondrial membranes (MMP) constitutes the limited and controlled step of the executive phase of apoptosis [33, 34]. In healthy cells, inner membrane (IM) is impermeable to protons in order to maintain the H^+ gradient necessary to oxidative phosphorylations (OXPHOS) and mitochondrial transmembrane potential ($\Delta\Psi_m$). In dying cells, the IM's permeability increases to solutes less than 1.5 kDa and leads to the permeability transition caused by the opening of permeability transition pore complex (PTP) [35]. Despite a lack of consensus on the exact composition of the PTP, several proteins directly or indirectly constitute this complex such as the outer membrane- (OM-) inserted voltage-dependent anion channel (VDAC), the IM-located ANT (adenine nucleotide translocator), and the cyclophilin D in the mitochondrial matrix [36]. There is four isoforms of ANT (ANT 1–4) and three isoforms of VDAC (VDAC 1–3) that have antagonist effects on apoptosis, since VDAC1, ANT1, and ANT3 are proapoptotic proteins, while VDAC2, ANT2, and ANT4 are able to protect cells from death. In addition, several regulators interact closely with the PTP core proteins, in particular Hexokinase II, the translocator protein (TSPO), and Creatine Kinase which interact with VDAC in cytosol, outer membrane, and intermembrane space (IMS), respectively [35, 37, 38]. PTP opening can also be modulated *via* chemical modifications of PTP partners or through interaction with several pro- or antiapoptotic proteins. Indeed, thiols oxidation of ANT protein or proapoptotic members of the Bcl-2 family (i.e., Bax, Bak, and t-Bid) are well-known inducers of MMP [39, 40]. Generally, PTP opening and subsequent MMP results in $\Delta\Psi_m$ dissipation associated with superoxide anion's production, swelling of the mitochondrial matrix as a consequence of the massive entry of water and solutes, and the release of many proapoptotic proteins from the IMS to the cytoplasm including Cytochrome *c*, Smac/DIABLO, and Omi/HtrA2 which participate to the caspase-dependent apoptotic pathway [41, 42]. Released Cytochrome *c* participates to the formation of a multiprotein complex termed “apoptosome” *via* physical interaction with the adaptor molecule Apaf-1 (apoptosis protease activating factor 1), the executioner procaspase-9, and ATP/dATP [43–46]. Furthermore, a caspase-independent apoptotic pathway can be activated by mitochondrial proteins AIF and EndoG that migrate towards nucleus to perform DNA fragmentation [33].

This mitochondrial central step may be positively or negatively modulated by Bcl-2 family proteins which mainly act through regulation of OM's permeabilization and Cytochrome *c* release. The Bcl-2 family contains three groups corresponding to prosurvival proteins (Bcl-2, Bcl- x_L , Bcl-w, Mcl-1, and A1/Bfl1), proapoptotic effectors (Bax, Bak), and a third subfamily called BH3-only proteins (Bad, Bik, Hrk, Bid, Bim, Bmf, Noxa, and Puma) which modulates activation of both first groups. The upregulation of Bcl-2 or other antiapoptotic members and/or the downregulation of Bax/Bak proteins have been reported to impair MMP and apoptosis underlying their fundamental role in the state of life *versus* cell death [47]. Thereby, Strasser et al. proposed a new mechanistic model of how Bax and Bak could promote

MMP, directly or indirectly; for review see [48]. Otherwise, the antiapoptotic proteins of the Bcl-2 family might inhibit cell death and MMP through two additional mechanisms: (i) the potential interaction with Apaf-1 protein leading to diminution of apoptosome formation or (ii) the direct inhibition of mitochondrial permeabilization. However the fact that Bcl-x_L might neutralize Apaf-1's function is still controversial, since data from different studies showing an inhibitory interaction between Bcl-x_L, Caspase-9, and Apaf-1 [49, 50] were rapidly refuted [51, 52]. Bcl-2 and Bcl-x_L are related to some bacterial proteins and data demonstrated their ability to form pores into membranes, to prevent the proton efflux triggered by calcium or reactive oxygen species (ROS) and the maintenance of mitochondrial ADP/ATP exchange [53, 54]. Bcl-2 also prevents excessive ROS production and impacts of the subsequent oxidative stress [55].

As a source and a cellular target of ROS, mitochondria regulate glucose metabolism, differentiation, or cell death and might play an important role in tumorigenesis. Currently, a new emerging concept considers mitochondrion as a ROS-signaling integrator [56, 57]. Mitochondrion is the site of OXPHOS by which ATP is formed by coupling with the electrons' transfer from a donor (NADH or FADH₂) to the final acceptor oxygen of the mitochondrial respiratory chain. However, about 2% of the electrons escape from sites in complex I and/or complex III to react directly with oxygen thus generating superoxide anion (O₂^{•-}) [56]. This leakage of electrons may appear in hypoxia conditions but could also participate under physiological conditions to various signaling pathways, since O₂^{•-}, H₂O₂ (hydrogen peroxide) and HO[•] (hydroxyl radical) are considered as intracellular messengers. Mitochondria seem to be the most potent intracellular source of ROS since the mitochondrial matrix concentration of O₂^{•-} was estimated to be 5- to 10-fold higher than that in the cytosol [58]. The Mn-superoxide dismutase (SOD) localized in the mitochondrial matrix rapidly dismutates O₂^{•-} in H₂O₂ which in turn can be decomposed by Catalase or may interact with O₂^{•-} by the Haber-Weiss reaction, or with Fe²⁺ (or Cu⁺) by the Fenton reaction, leading to the generation of HO[•]. The mitochondrial ROS generation can be responsible for activation of death pathways by inducing (i) nuclear and mitochondrial DNA damages (i.e., formation of 8-hydroxydeoxyguanosine) leading to p53-dependent cell death [59], (ii) activation of signaling pathways involving NF-κB, JNK, or p38 MAPK [60, 61], (iii) MMP increase and Ca²⁺-induced PTP opening [39, 62], and (iv) Cytochrome *c* release by oxidation of the anionic phospholipid cardiolipin [63, 64]. Nevertheless, mitochondrial ROS can also participate to protection against apoptosis by activation of antioxidant systems such as GSH (L-γ-glutamyl-L-cysteinylglycine) and multiple GSH-linked antioxidant enzymes (i.e., Glutathione Peroxidases 1 and 4 [65, 66], Glutaredoxin 2 [67, 68], Glutathione S-transferase α [69]).

3. Air Pollutants and Cytotoxic Cell Death

Apoptosis is one of the possible consequences of acute or chronic exposure to air pollutants and various toxicants—

such as PM, metals, and pesticides—are capable to target mitochondria, directly or indirectly [70–72]. For instance, rotenone which is used as pesticide inhibits the mitochondrial complex I. In addition, other pesticides such as pentachlorophenol and 2,4-dinitrophenol (DNP) induce cytotoxicity by uncoupling ATP synthesis and the mitochondrial H⁺ gradient. Indeed, the small lipophilic molecule DNP captures and carries protons out of the IMS leading to the H⁺ accumulation into the matrix and the disruption of the pH/H⁺ gradient [73].

Although many studies describe the ability of air pollutants to trigger some characteristic features of apoptosis, only few detailed mechanistic studies have been published, the majority focusing solely on the oxidative stress emergence as a result of the unbalance between ROS production and activation of antioxidant defenses. Indeed, publications dealing with the cytotoxic consequences of airborne particles showed an induction of apoptosis associated with cellular stress, ROS production [74], ΔΨ_m drop, caspases activation [75], and DNA fragmentation [70, 76, 77]. The cell death often demonstrated in experiments performed with PM in normal human lung tissue or airway epithelial cells was a mitochondria-mediated apoptosis, characterized by a marked reduction of mitochondrial dehydrogenase activity and the cytoprotective effects of mitochondrial inhibitors (e.g., rotenone, DIDS) [78, 79]. Cytochrome *c* release, activation of caspases-9 and -3, and PARP-1 cleavage were also observed after exposure to urban and industrial PM_{2.5} in correlation with the induction of an oxidative stress studied by formation of 8-hydroxy-2'-desoxyguanosine (8-OHdG) [78, 80]. Thus, short-term exposure studies performed in respiratory cells with high doses of PM or its components led to a consensus that health effects as well as cytotoxic impacts of particulate pollution mainly involve ROS production and oxidative stress (Figure 1) [81, 82].

Increased production of ROS was first clearly identified as the central step of the proinflammatory response (GM-CSF, IL-6, IL-8, TNF-α) induced upon exposure to air pollutants *via* ROS-sensitive transcription factors such as NF-κB and AP-1 [82, 85]. Actually, particulate pollutants are considered as potent oxidants, and the induced intrinsic pathway of apoptosis may be associated with oxidative stress generated from organic (i.e., PAHs, nitro-PAHs/ketones/quinones) as well as inorganic compounds adsorbed on the surface of particles [84, 86–88]. Thus, PAHs induced-apoptosis is mainly mediated *via* the mitochondrial pathway (Caspase-3 activation, AIF, and EndoG release) in a p53-dependent manner in hepatic cells and macrophages [89–91], even if the causal relationship between genotoxic effects of BaP and induction of apoptosis is not established for all cell types [92]. Organic components are able to mimic the apoptogenic impact of PM in various cell types through activation of the aryl hydrocarbon receptor (AhR). AhR is a cytoplasmic ligand-dependent transcription factor which translocates to the nucleus in order to bind specific Xenobiotic Responsive Elements in target genes promoters, leading to activation of phase I and II metabolizing enzymes and contributing to detoxification. For instance, phase I enzymes such as cytochrome P450 oxidase 1A1 produce

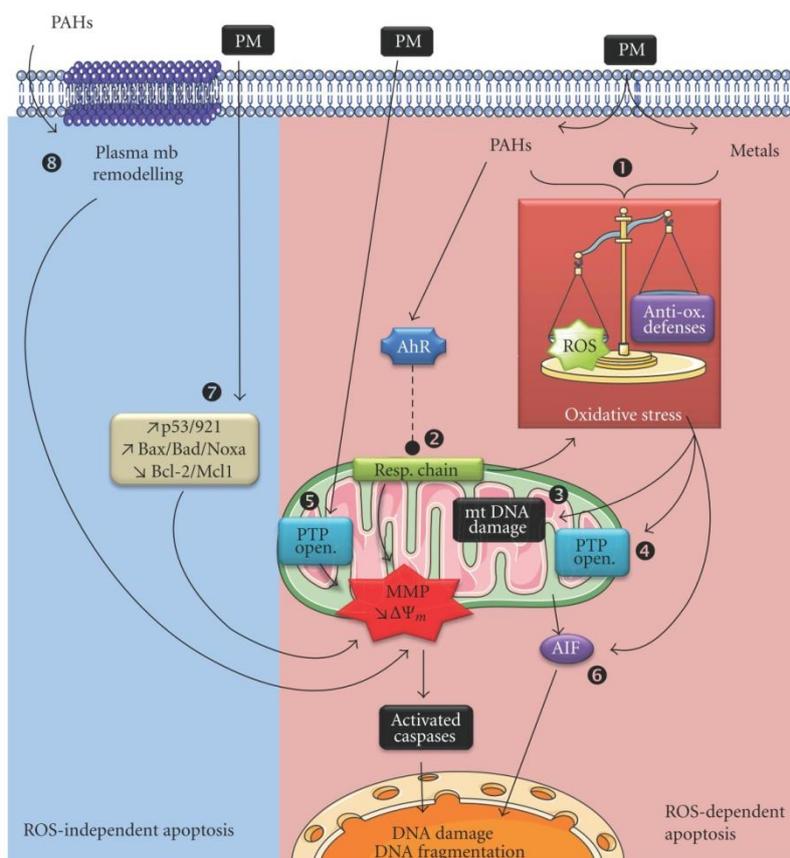


FIGURE 1: ROS-dependent and -independent apoptosis induced by particulate pollutants. Particulate matter (PM) or their compounds (PAHs and metals) provoke apoptotic cell death through ROS-dependent (pink zone) or ROS-independent (blue zone) pathways. Actually, particulate pollutants are considered as potent ROS generators from organic (i.e., PAHs) or metallic compounds (1) and leading to oxidative stress as the result of the unbalance between ROS production and activation of antioxidant defenses. Senft et al. demonstrated that AhR activation might regulate the mitochondrial respiratory chain function and induce production of $O_2^{\bullet-}$ and H_2O_2 from mitochondria ([83], (2)). As a consequence of oxidative stress, mitochondria are harmed by ROS that are responsible for damage of mitochondrial DNA (3), mitochondrial lipid peroxidation, and opening of PTP complex (PTP open.) (4). Mitochondrial membrane permeabilization (MMP) and PTP opening might also be a direct effect of diesel particles on isolated mitochondria ([84], (5)). As an additional pathway of the ROS-dependant apoptosis induced by air pollutants, the apoptogenic activity of AIF might be enhanced by xenobiotics, air pollutants, or their ROS derivatives (6). Some other ROS-independent signaling pathways have been identified such as the upregulation of proapoptotic proteins and/or the repression of prosurvival Bcl-2 family proteins (7). Recent publications also demonstrated a new mechanism of apoptosis triggered by PAHs through alterations of lipid rafts' composition and remodeling of the plasma membrane (8). Illustrations carried out thanks to Servier Medical Art.

H_2O_2 by metabolizing benzo(a)pyrene (BaP) [93] into a reactive intermediate (anti-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxy-benzo(a)pyrene, BPDE) [94] known to trigger DNA damage and carcinogenesis [95]. *In vivo* studies performed in mice exposed to TCDD (2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin) showed an important oxidative response in correlation with the high affinity of the TCDD-AhR binding, suggesting a strong link between oxidative stress, Ah receptor, and its target genes CYP1A1 and 1A2 [96].

In this context, Senft et al. were interested to understand the involvement of AhR in mechanisms responsible for

the dioxin-induced mitochondrial oxidative stress. These authors reported that liver mitochondria from mice exposed to TCDD (15 mg/kg) during three consecutive days showed a decrease of aconitase activity as a marker of mitochondrial ROS production, a mitochondrial generation of $O_2^{\bullet-}$ and H_2O_2 in the presence of succinate, as well as an activation of glutathione peroxidase-1 and glutathione reductases [83]. Interestingly, AhR knockout mice are protected from TCDD-induced ATP depletion, production of ROS, and the resultant oxidative stress response, suggesting that AhR might regulate the activity of mitochondrial electron transport

chain, especially the complexes III (stimulation) and IV (inhibition), and that the major source of the direct AhR-mediated oxidative stress response has a mitochondrial origin.

Furthermore, mitochondrion may be a site of ROS generation also in response to metallic environmental pollutants, as shown with cadmium or hexavalent chromium that trigger ROS production from the electron transfer chain as well as from the NADPH oxidase activity [97, 98]. In addition to organic compounds, heavy and transition metals such as vanadium, cadmium, mercury, lead, aluminum, titanium, chromium, iron, cobalt, nickel, copper, and zinc are often found in atmospheric pollutants and measured as adsorbed inorganic compounds on FP and UFP. Metals affect human health, especially when these toxicants compete with essential elements and thus modify many cellular processes [99]. Some metals are janus elements since they are both prominent inducers of ROS and essential cofactors for some antioxidant enzymes. As reviewed by Pulido and Parrish, transition metals promote apoptosis through ROS generation, mitochondria dysfunction, activation of MAPK, p53 and caspases, or downregulation of antiapoptotic proteins of Bcl-2 family [100]. Metals and the water-soluble fractions of PM are also known to cause inflammation and cancer mostly due to DNA damage as a consequence of ROS generation by Fenton reaction (see Section 2). Indeed, carcinogenic metals (i.e., As, Cd, Cr, Ni) promote apoptosis with DNA-base modifications, strand breaks and rearrangements [101]. Generation of ROS, decrease of intracellular GSH, accumulation of Ca^{2+} , loss of $\Delta\Psi\text{m}$, upregulation of Caspase-3, downregulation of Bcl-2, and deficiency of p53 protein led to arsenic-induced apoptosis [102, 103]. In case of cadmium, metallothionein expression determines the cell death fate (between apoptosis and necrosis), but Cd-induced apoptosis is due to inhibition of antioxidant enzymes, mitochondrial dysfunction [104], and PTP opening, probably through its interaction with thiol groups of ANT [105], whereas ROS and p53 contribute to apoptosis caused by chromium and selenium [106–108]. In addition, PM containing high levels of noncarcinogenic metals (i.e., cobalt, lead, iron, and zinc) were often shown to provoke ROS production (e.g., H_2O_2) leading to apoptosis through the mitochondrial pathway [109–113]. Under apoptotic conditions, zinc is also able to increase p53 expression and function probably by stabilizing this protein which contains a tightly bound zinc atom necessary for its DNA binding activity [114, 115].

As a consequence of oxidative stress, mitochondria are often damaged by ROS and experiments performed on HepG2 cells and liposomes clearly showed that $\text{O}_2^{\bullet-}$ alone seems to elicit apoptosis and a rapid and massive release of Cytochrome *c* independently of PTP opening but rather through a VDAC-dependent permeabilization of the outer mitochondrial membrane [116]. These results are in contradiction with those obtained by Xia et al. which performed, to the best of our knowledge, the only study of the prospective direct effect of Diesel particles on mouse liver-isolated mitochondria [84]. Xia et al. showed that the aromatic fraction of DEP can directly induce mitochondria swelling and depolarization leading to calcium overload in

matrix [84]; this might be related to the massive decrease of the content in cardiolipin published earlier [117]. As mitochondrial swelling can be due to the long-lasting opening of PTP or the closure of VDAC, Xia et al. assessed the effect of the PTP inhibitor cyclosporine A (CsA) and demonstrated its ability to counteract DEP-induced swelling, suggesting that these organic compounds may directly promote PTP-mediated MMP [84]. In addition, oxidation of cardiolipin may be a crucial event of cell death triggered by xenobiotics as demonstrated by *in vivo* inhalation exposure to single-walled carbon nanotubes and *in vitro* experiments of LPS-induced apoptosis on pulmonary artery endothelial cells. Indeed, cardiolipin hydroperoxides and their hydroxy-derivatives are prominently accumulated in inflammatory, apoptotic, and oxidative stress conditions [118]. However, mitochondrial lipid peroxidation is not the only oxidative stress consequence responsible for mitochondria-driven apoptosis since $\text{O}_2^{\bullet-}$ and H_2O_2 can damage proteins as well as mitochondrial DNA. Mitochondrial DNA (mtDNA) is one of the main targets of mitochondrial ROS due to the close proximity of site production and the lack of protective histones. TCDD at low doses was shown to induce preferentially mitochondrial *versus* nuclear genotoxicity as assessed by 8-OHdG, reduction in mtDNA number, and increase in mtDNA deletions [119, 120].

As an additional pathway of the ROS-dependent apoptosis induced by air pollutants, the apoptogenic activity of AIF is controlled by the redox status as oxidized monomers have higher DNA affinity than NADH-reduced dimers [121]. Mitochondrial AIF is a NADH-dependent oxidoreductase containing a flavin adenine dinucleotide (FAD) and which is tethered to the inner membrane of mitochondria and participates to the caspase-independent pathway of apoptosis. However, a recent published data demonstrated that AIF has a quinone reductase activity that is around thousand-fold lower than Cytochrome P450 or NADPH:quinone oxidoreductase (NQO1) normally involved in the phases I and II of the xenobiotic detoxification processes [122]. This suggests that interaction of AIF with xenobiotics, air pollutants, or their ROS derivatives might promote its oxidized form and enhance its apoptogenic activity. Thereby, apoptosis induced by PM or wood smoke extracts on human alveolar macrophages and pulmonary artery endothelial cells was associated with AIF upregulation and its translocation to nucleus [123, 124]. In addition to the mitochondrial pathway, different studies also demonstrated that the extrinsic pathway of apoptosis (with TNF- α secretion, caspases-8 and -3 activation) is involved in the cytotoxic impacts of FP, UFP, and NP [125–127]. Data published in 2006 showed that apoptosis induced by fine particles in the lung epithelial cells has taken place in parallel with the induction of proliferation and that the two antagonistic phenomena appear to be induced by oxidative stress or EGFR [127, 128]. Finally, posttranslational oxidative modifications of proteins (i.e., nitrosylation, hydroxylation, glutathionylation of cystein residues) have been shown to promote aberrant activation of signal transduction cascades. Among these pathways, modulation of kinases ASK/JNK, Akt, or MAPK, or transcription factors Nrf2, NF κ B, AP-1, and p53 was clearly

demonstrated following exposure to various environmental pollutants whose cellular effects are establishment of both an inflammatory and an apoptotic response [80, 129–132].

Through all examples cited previously, it is clear that cytotoxicity of air pollutants (PM, PAHs, metals, or herbicides) in various cells [70, 78, 133] mainly incriminates the excessive production of ROS capable of targeting mitochondria by different mechanisms (Figure 1) [83, 134]. At the same time as the ROS-dependent apoptosis, some other oxidative stress-independent signaling pathways have been identified. For instance, different PM were shown to upregulate the expression of potent regulators of the mitochondrial checkpoint such as p53 and its targets p21, Noxa, Bax, Bad, and Bim in parallel to the repression of Bcl-2 and Mcl-1 [70, 78, 125, 135]. Moreover, recent publications also demonstrated a new mechanism of apoptosis triggered by 1-Nitropyrene and BaP through lipid accumulation [136], alterations of plasma membrane microstructures, especially modulation of the Na⁺/H⁺ exchanger, inhibition of the gap junctional intercellular communication [137], and alteration of lipid rafts' composition [138]. These interesting outcomes emphasize the possible dialogue between plasma membrane alterations and cell death. Impacts on the plasma membrane remodeling might provide additional mechanistic explanations of how some chemicals exert their carcinogenic effect [25].

4. Cytoprotective Effects of Air Pollutants

Since mid-twentieth century, the incidence in lung cancer had rapidly increased and, in addition to cigarette smoke, indoor and outdoor air pollution was also questioned through epidemiological studies. The earliest studies underlined the higher incidence of lung cancer in urban *versus* rural areas, in relation to the nature or concentration of airborne particles. The IARC classified several air pollutants as human carcinogens (group 1, e.g., BaP, Chromium VI compounds, tobacco smoking), probably carcinogens (group 2A, e.g., dibenzo(a,h)anthracene, engine diesel exhaust, lead compounds), possibly carcinogens (group 2B, e.g., benzo(k)fluoranthene, gasoline exhaust, lead), not classifiable as to its carcinogenicity to humans (group 3, e.g., benzo(g,h,i)perylene, chromium III compounds), or probably not carcinogenic to humans (group 4) [9, 139, 140]. In particular, extracts of PM, BaP, and 1,6-dinitropyrene provoke DNA adducts, mutagenic effects in bacterial and mammalian cells, chromosomal damages, and cell transformation. Most of human cancers are carcinoma derived from epithelial cells, and in the case of lung cancers, the most common are squamous cell carcinoma (epidermoid carcinoma), large cell carcinoma, small cell carcinoma, and adenocarcinoma [141]. All cancerous cells have acquired six capabilities during the multistage process of tumorigenesis: (i) self-sufficiency in growth signals, (ii) insensitivity to growth-inhibitory signals leading to (iii) limitless replicative potential, (iv) evasion to apoptotic cell death, (v) sustained angiogenesis, and (vi) tissue invasion and metastasis [142]. During chronic exposure to air pollutants, acquisition of

resistance towards apoptosis might be a significant step of the molecular mechanisms involved in the initiation and promotion of tumors as demonstrated by Teranishi et al. [143]. Unfortunately, too few toxicological studies have investigated this phenomenon of apoptosis resistance induced possibly by air pollutants and have tried to decipher in detail the underlying molecular mechanisms. In order to delineate mechanisms leading to lung cancers due to exposure to cooking oil fumes (COFs) and its main aldehyde component 2,4-decadienal (2,4-DDE), Hung et al. reported that these pollutants promote survival and proliferation of alveolar cancer cells A549 through increased expression of IAP1, IAP2, Survivin, and Cyclin D1 and the concomitant decrease of XIAP, Caspase-3, and p21 level [144].

As described previously, particulate pollutants or their components may induce cytotoxicity following high-concentrations exposure. Ferecatu et al. initiated studies to determine the specific effect of low doses of airborne particles on different bronchial epithelial cells (tumoral, immortalized, and primary cells) regarding induction or reduction of the apoptotic process. The authors demonstrated that PM_{2.5} are not cytotoxic but rather trigger a resistance to mitochondrial apoptosis towards well-known cell death inducers (calcimycin (A23187), staurosporine, and oligomycin) [145]. The reduction of apoptosis observed after particle exposure is not related to the proinflammatory response and EGF pathway but is mediated by water-soluble as well as organic components such as heavy PAHs. Among all the water-soluble compounds of PM, a possible candidate responsible for the cytoprotective effect is zinc (Zn), already known to inhibit apoptosis and minimize the oxidative stress (e.g., lipid peroxidation) [146]. Zn may protect cells both directly by stabilizing lipids and proteins of cellular and organelles membranes and indirectly *via* the maintenance of glutathione levels [147]. The protective effect of Zn was also assigned to the reduction of DNA fragmentation, processing of procaspase-3 [148] and activation of cytoprotective signaling pathways (including Akt, ERK). In addition, some divalent transition metals (Mg²⁺, Sr²⁺, and Mn²⁺) can competitively inhibit the calcium-induced PTP opening through a still-unknown mechanism, suggesting a possible direct and protective effect of metallic compounds on mitochondria [149].

Several studies have reported the cytoprotective effects of organic compounds of PM such as PAHs [145, 150] or their metabolites [143, 151], TCDD [152], non-Dioxin-like PCBs [153], and DEP [154]. The exact mechanisms of apoptosis inhibition are not fully understood but *in vitro* studies have shown the necessity of protein synthesis [155], p53 modulation [153, 156], and AhR activation [145]. Indeed, exposure of human bronchial epithelial cells for 4 hours with different PAHs, prior to A23187-treatment, showed a marked resistance to mitochondria-driven apoptosis only with PAHs containing at least five-aromatic rings, which are the most toxic and potent inducers of receptor Ah (Table 2) [157]. The need of protein synthesis and AhR activation might be linked to the transcription factor function of AhR that could either induce antiapoptotic genes or inhibit proapoptotic ones. This assumption is based on results which have shown

TABLE 2: The cytoprotective effect of PM_{2.5} is related to PAHs with five-aromatics rings. Epithelial 16 HBE cells were pretreated during 4 hours with phenanthrene (124 nM), fluoranthene (268 nM), benzo(b)fluoranthene (333 nM), benzo(k)fluoranthene (333 nM), benzo(a)pyrene (270 nM), dibenzo(a,h)anthracene (35 nM), benzo(g,h,i)perylene (443 nM), and indeno(1,2,3-cd)pyrene (217 nM) prior to induction of apoptosis by A23187 (3 μM) for 20 supplementary hours. Results are mean ± SD (*n* = 6). Significance was calculated with Dunnett's test (**P* < 0.01 versus vehicle cyclohexane 1%). Percentages of DiOC low and PI high refer to cells showing either a drop of ΔΨ_m or a permeabilization of the plasma membrane measured using DiOC and propidium iodide (PI) probes, respectively. Note that a 4 h vehicle pretreatment provides 93.00 ± 3.31% DiOC low and 96.97 ± 7.18% PI high of A23-induced apoptosis, respectively. Moreover, a 4 h PM_{2.5} exposure (10 μg/cm²) provides 64.33 ± 9.89% DiOC low and 39.45 ± 8.50% PI high of A23-induced apoptosis, respectively. The relative toxic potency of individual PAH compared to BaP is given as the toxic equivalency factor (TEF).

PAHs	TEF	Structure	A23187-induced apoptosis (% of control)	
			DiOC low	PI high
Phenanthrene	0.001–0.01		88.96 ± 5.00	94.43 ± 6.33
Fluoranthene	0.001–0.05		86.22 ± 7.13	87.37 ± 10.79
Benzo(b)fluoranthene	0.06–0.14		91.17 ± 3.62	99.17 ± 8.41
Benzo(k)fluoranthene	0.03–0.1		96.41 ± 6.56	104.09 ± 11.45
Benzo(a)pyrene	1		70.27 ± 5.60*	34.55 ± 3.68*
Dibenzo(a,h)anthracene	0.69–5		80.69 ± 1.26*	80.10 ± 5.37*
Benzo(g,h,i)perylene	0.01–0.03		75.49 ± 2.94*	75.91 ± 3.31*
Indeno(1,2,3-cd)pyrene	0.017–0.232		79.38 ± 4.43*	80.24 ± 10.38*

that AhR directly interacts with E2F1 leading to the reduction of E2F1-mediated proapoptotic genes such as *apaf-1* [158]. Moreover, the cytoprotective effect of AhR ligands is effective at the mitochondrial checkpoint of apoptosis by upregulating expression of antiapoptotic genes such as *bcl-2*, *bcl-xL*, *mcl-1*, *agr2*, or *vdac2* [159–161].

Signaling pathways other than AhR were also found in the cytoprotective effects of air pollutants, especially protein kinases (e.g., Akt [162], ERK [163], JNK, PKA [164]), or the transcription factor Nrf2 (nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2). PI3K/Akt and AhR pathways seem to be interdependent for the cellular response to xenobiotics, since the presence of AhR is required for the cytoprotective

function of Akt [165]. In addition, the antiapoptotic effect of DEP and BPDE (a BaP genotoxic metabolite) was linked to phosphorylation and activation of Akt [151], with the possible involvement of Thioredoxin-1 as demonstrated *in vivo* [166]. Furthermore, Akt promotes type II Hexokinase (HK II) phosphorylation and binding to the OM leading to the stabilization of PTP complex in closed conformation and the inhibition of Ca²⁺-induced Cytochrome *c* release. Akt-dependent phosphorylation of mitochondrial HK II is further favored when glycogen synthase kinase 3β (GSK3β) is inactivated by Akt phosphorylation [167]. Finally, activation of NF-κB and AP-1 by exposure to airborne PM or cigarette smoke is well documented and admitted as being part of

inflammatory or proliferative response [168, 169], but their role in the modulation of apoptotic cell death remains unclear.

As recently reviewed, air pollutants are also inducers of Nrf2 which regulates the expression of phase II detoxifying enzymes as well as cytoprotective antioxidants [170]. Under normal conditions, Nrf2 is a cytoplasmic protein linked to its repressor Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein) but exposure to low levels of electrophiles and ROS causes the nuclear translocation of Nrf2 and the subsequent expression of target genes containing antioxidant response elements (ARE). Indeed, numerous published studies have reported activation of Nrf2 after exposure of murine macrophages or human bronchial epithelial cells to DEP, PAHs, and UFP [81, 171, 172]. Among the antiapoptotic target proteins of Nrf2, two antioxidant enzymes are of particular interest because of their location and action on the mitochondria: Heme Oxygenase-1 (HO-1) and Glutathione S-transferase (GST) isoenzymes. Expression and activity of HO-1 are dramatically increased in mitochondrial fractions of human alveolar and bronchial cells exposed to cigarette smoke extract as an attempt to counteract its toxic effects, since the overexpression of HO-1 inhibits cell death and maintains ATP levels [173]. The cytoprotective mechanism of HO-1 involves its enzymatic reaction products such as biliverdin, carbon monoxide (CO), and ferrous iron [174]. In response to Fe^{2+} production, ferritin protein stability is increased and may protect cells from oxidative and Fas-induced apoptosis. However, biliverdin and free iron do not have any protective activity against oxidative stress-induced hepatic apoptosis, suggesting that CO may be the key molecule [175]. Indeed, CO protects against oxidative injuries and cell death, since in addition to limiting the translocation of Bcl-2 family proteins to mitochondria and the Cytochrome *c* release, Queiroga et al. proposed a new cytoprotective effect of CO directly on mitochondria [176]. They observed that a fifteen-minute pretreatment with low doses of CO was able to prevent the calcium-induced swelling and depolarization of liver isolated mitochondria. Otherwise, GST enzymes are involved in detoxification of endogenous toxic metabolites, superoxide radicals, and xenobiotics. Cytosolic and mitochondrial GST (α , μ , π , and θ) were shown to be upregulated by numerous xenobiotics and some AhR ligands (TCDD, β -naphthoflavone) [177]. However, effect of mitochondrial GST on the direct control of this organelle is still subject of controversy: on the one hand, these enzymes are assumed to prevent cardiolipin oxidation and MMP [178], while on the other hand, Aniya's team demonstrated that the mitochondrial membrane-bound GST1 is activated by S-glutathionylation and contributes to Cytochrome *c* release through PTP opening [179].

ROS are possibly involved in tumor progression, metastasis, and multiple signaling pathways elicited by atmospheric xenobiotics. The correlation of intracellular oxidation—due to light-modified derivatives of BaP (BaP-1,6-dione, BaP-3,6-dione, BaP-4,5-dihydrodiol and 2-hydroxy-BaP-1,6-dione)—with the protection against serum withdrawal-induced apoptosis has clearly suggested that a certain dose of ROS enhances cell proliferation and survival [143].

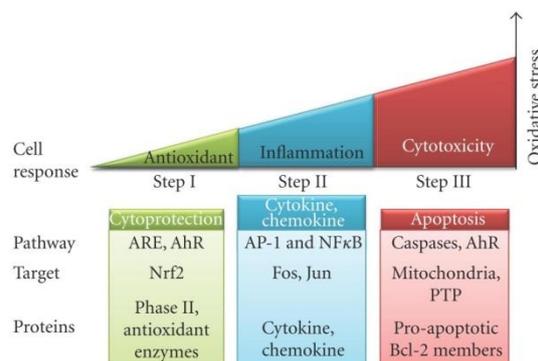


FIGURE 2: Hierarchical oxidative stress model in response to air pollutants. Low ROS production (Step I) induces activation of cellular antioxidant systems to restore redox homeostasis. If this protection is insufficient, the increased stress (Step II) triggers an inflammatory response through MAPK and NFκB pathways. At a final stage (Step III), all the defense systems are overwhelmed and high ROS levels lead to PTP opening and cell death by apoptosis. These responses depend on the pro/antioxidant balance which varies from one living being to another (adapted from [180]).

Under physiological conditions, cell viability is critically dependent on the maintenance of functional antioxidant systems especially in lung cells which are regularly exposed to air pollutants. GSH is one of the most abundant antioxidant found in the extracellular epithelial lining fluid and into respiratory cells from trachea to alveoli [181]. According to this preponderant role of GSH, administration of antioxidants, such as N-acetylcysteine (NAC), effectively prevents air pollutant-induced apoptosis [126, 171, 182] and *in vivo* exposure to dioxin increases levels of mitochondrial glutathione in wt, *cyp1a1*^{-/-} and *cyp1a2*^{-/-} mice, but not in *ahr*^{-/-} mice [83].

5. Conclusion

In conclusion, impacts of air pollutants are mainly related to the redox status and the mitochondrial function of target cells. As described in this paper, proteins and signaling pathways involved in both cytoprotective and cytotoxic effects converge to the pro/antioxidant balance which determines the cellular response to environmental aggressions according to the hierarchical model proposed by Li et al. [180] (see Figure 2). Exposure to environmental pollutants may result in cellular disorders responsible for tissue damage and is therefore perceived as a cellular stress. A minor stress will induce a cellular response characterized by metabolic, morphological, or signaling alterations in order to deal with it. This phenomenon, termed adaptation, involves several processes such as hypertrophy, hyperplasia, or atrophy of the cells. Persistent exposures may also result in metaplasia (replacement of one by another cell type as is the case for the ciliated columnar cells that are replaced by squamous cells in the cigarette smokers' epithelium). In case of severe

injuries, adaptative processes are overwhelmed leading to cell death by necrosis, apoptosis, or autophagy. Air pollutants can directly affect the respiratory epithelium and cause transient damages (i.e., loss of cilia and tight junctions) until total desquamation. Thus, cellular adaptation allows tissue remodeling required for the repair/regeneration of the damaged lung epithelium.

In this context, the cytoprotective effects demonstrated for some xenobiotics might reflect the setting up of an adaptative mechanism converging to the inhibition of cell death deleterious for the lung tissue. However, as it was well described by Barouki [183], some adaptative mechanisms necessary to inhibit direct toxicity may have side effects that accumulate during repeated exposures. A plausible assumption for the exacerbation of lung cancers would be that resistance to apoptosis might occur into self-renewing stem cells known to be involved in physiological regeneration of the epithelium and suspected of being initiators of lung tumors [13].

Despite the latest significant advances, the specific mechanisms responsible for cytotoxic effects of air pollutants remain to be deciphered in more detail, mostly on the issues of chronic as well as multiple exposures to low concentrations of pollutants. Moreover, understanding the adaptive cytoprotective process is an important issue that should be considered in the risk assessment of air pollution.

Abbreviations

2,4-DDE:	2,4-decadienal	DiOC:	3, 3 dihexyloxacarbocyanine iodide
8-OHdG:	8-hydroxy-2'-desoxyguanosine	DISC:	Death-inducing signalling complex
A23187:	Calcium ionophore (calcimycin)	DNP:	2,4-dinitrophenol
AFSSET:	French Agency of Environmental and Occupational Health Safety	EGFR:	Epidermal growth factor receptor
AhR:	Aryl hydrocarbon receptor	EndoG:	Endonuclease G
AIF:	Apoptosis-inducing factor	EPA:	Environmental Protection Agency
ANT:	Adenine nucleotide translocator	FAD:	Flavin adenine dinucleotide
Apaf-1:	Apoptosis protease activating factor 1	FADD:	Fas-associated protein with death domain
ARE:	Antioxidant response elements	FP:	Fine particles
As:	Arsenic	GSH:	L- γ -glutamyl-L-cysteinyglycine
BaP:	Benzo(a)pyrene	GSK3 β :	Glycogen synthase kinase 3 β
BPDE:	anti-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxy-benzo(a)pyrene4	GST:	Glutathione S-transferase
CAD:	Caspase-activated DNase	H ₂ O ₂ :	Hydrogen peroxide
Cd:	Cadmium	H ₂ S:	Hydrogen sulfide
CFCs:	Chlorofluorocarbons	Hg:	Mercury
CH ₄ :	Methane	HK II:	Hexokinase type II
CO:	Carbon monoxide	HO \cdot :	Hydroxyl radical
Co:	Cobalt	HO-1:	Heme oxygenase-1
CO ₂ :	Carbon dioxide	IAP1:	Inhibitors of apoptosis
COF:	Cooking oil fumes	IARC:	International Agency for Research on Cancer
COPD:	Chronic obstructive pulmonary disease	IM:	Mitochondrial inner membrane
Cr:	Chromium	IMS:	Mitochondrial intermembrane space
CsA:	Cyclosporine A	Keap1:	Kelch-like ECH-associated protein
Cu:	Copper	MMP:	Mitochondrial membranes permeabilization
DEP:	Diesel exhaust particles	mtDNA:	Mitochondrial DNA
DIDS:	4,4-diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonic acid	N ₂ O:	Nitrous oxide
		NAAQS:	National Ambient Air Quality Standards
		NAC:	N-acetylcysteine
		Ni:	Nickel
		NO:	Nitrogen monoxide
		NO ₂ :	Nitrogen dioxide
		NOx:	Nitrogen oxides
		NP:	Nanoparticles
		NQO1:	NADPH : quinone oxidoreductase
		Nrf2:	Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2
		O ₂ \cdot^- :	Superoxide anion
		O ₃ :	Ozone
		OM:	Mitochondrial outer membrane
		OXPPOS:	Oxidative phosphorylations
		PAHs:	Polycyclic aromatic hydrocarbons
		PARP-1:	Poly (ADP-ribose) polymerase 1
		Pb:	Lead
		PCBs:	Polychlorinated biphenyls
		PCDDs:	Polychlorinated dibenzo- <i>p</i> -dioxins
		PCDFs:	Polychlorinated dibenzofurans
		PI:	Propidium iodide
		PM:	Particulate matter
		ppb:	parts per billion
		ppm:	Parts per million
		PTP:	Permeability transition pore complex
		ROS:	Reactive oxygen species
		Sb:	Antimony
		Se:	Selenium
		SO ₂ :	Sulfur dioxide
		SOD:	Mn-superoxide dismutase
		TCDD:	2,3,7,8-tetrachlorodibenzo- <i>p</i> -dioxin
		TEF:	Toxic equivalency factor

TNFR: Tumour necrosis factor receptor
 TRADD: TNF-receptor-associated death domain protein
 TSPO: Translocator protein
 UFP: Ultrafine particles
 V: Vanadium
 VDAC: Voltage-dependent anion channel
 VOC: Volatile organic compounds
 XIAP: X-linked inhibitor of apoptosis protein
 Zn: Zinc
 $\Delta\Psi_m$: Mitochondrial transmembrane potential.

Acknowledgments

Support for this paper was from the French Agence Nationale de la Recherche (ANR), Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Université Paris Diderot-Paris 7 (Ph.D. grant of Mélanie Leroux), Région Ile de France, and DIM SEnT (postdoctoral grant of Aïda Bouharrou). The authors particularly thank Dr. Christophe Lemaire, Dr. Ioana Ferecatu, and Dr. Armelle Baeza-Squiban for their critical reading of the paper.

References

- [1] C. A. Pope III, R. T. Burnett, M. J. Thun et al., "Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long-term exposure to fine particulate air pollution," *JAMA*, vol. 287, no. 9, pp. 1132–1141, 2002.
- [2] J. Lewtas, "Air pollution combustion emissions: characterization of causative agents and mechanisms associated with cancer, reproductive, and cardiovascular effects," *Mutation Research*, vol. 636, no. 1–3, pp. 95–133, 2007.
- [3] P. Borm and K. K. Donaldson, "An Introduction to Particle Toxicology; from coal mining to nanotechnology," in *Particle Toxicology*, P. Borm and K. K. Donaldson, Eds., pp. 1–12, CRC Press, 2007.
- [4] B. Ostro et al., *The Effects of Particulate Matter Sources on Daily Mortality: A Case-Crossover Study of Barcelona*, Environ Health Perspect, Barcelona, Spain, 2011.
- [5] G. Oberdörster, E. Oberdörster, and J. Oberdörster, "Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles," *Environmental Health Perspectives*, vol. 113, no. 7, pp. 823–839, 2005.
- [6] T. Jones and K. Bérubé, "Mineralogy an structure of pathogenic particles," in *Particle Toxicology*, P. Borm and K. K. Donaldson, Eds., pp. 13–45, CRC Press, 2007.
- [7] F. Marano, S. Boland, V. Bonvallot, A. Baulig, and A. Baeza-Squiban, "Human airway epithelial cells in culture for studying the molecular mechanisms of the inflammatory response triggered by diesel exhaust particles," *Cell Biology and Toxicology*, vol. 18, no. 5, pp. 315–320, 2002.
- [8] W. Roemer, G. Hoek, and B. Brunekreef, "Effect of ambient winter air pollution on respiratory health of children with chronic respiratory symptoms," *American Review of Respiratory Disease*, vol. 147, no. 1, pp. 118–124, 1993.
- [9] International Agency for Research on Cancer (IARC), <http://www.iarc.fr/>.
- [10] P. Boffetta, S. D. Stellman, and L. Garfinkel, "Diesel exhaust exposure and mortality among males in the American Cancer Society prospective study," *American Journal of Industrial Medicine*, vol. 14, no. 4, pp. 403–415, 1988.
- [11] French Agency of Environmental and Occupational Health Safety (AFSSET), "Estimation de l'impact lié à l'exposition chronique aux particules fines sur l'espérance de vie," in *Impact Sanitaire de la Pollution Atmosphérique Urbaine*, 2005.
- [12] "Particulate air pollutants and small airway remodeling," in *Particle Toxicology*, A. Churg, Ed. P. Borm and K. K. Donaldson, Eds., pp. 75–87, CRC Press, 2007.
- [13] J. P. Sullivan, J. D. Minna, and J. W. Shay, "Evidence for self-renewing lung cancer stem cells and their implications in tumor initiation, progression, and targeted therapy," *Cancer and Metastasis Reviews*, vol. 29, no. 1, pp. 61–72, 2010.
- [14] Environmental Protection Agency (EPA), <http://epa.gov/air/criteria.html>.
- [15] Centre Interprofessionnel Technique d'Etudes de la Pollution Atmosphérique (CITEPA), <http://www.citepa.org/pollution/sources.htm>.
- [16] "Sources of air pollution," in *Air Pollution and Health*, C. Holman, Ed. S. T. Holgate et al., Ed., pp. 115–148, Academic Press, 1999.
- [17] S. Orrenius, P. Nicotera, and B. Zhivotovsky, "Cell death mechanisms and their implications in toxicology," *Toxicological Sciences*, vol. 119, no. 1, pp. 3–19, 2011.
- [18] D. K. Dhawan and V. D. Chadha, "Zinc: a promising agent in dietary chemoprevention of cancer," *Indian Journal of Medical Research*, vol. 132, no. 12, pp. 676–682, 2010.
- [19] G. Gobe and D. Crane, "Mitochondria, reactive oxygen species and cadmium toxicity in the kidney," *Toxicology Letters*, vol. 198, no. 1, pp. 49–55, 2010.
- [20] J. M. Matés, J. A. Segura, F. J. Alonso, and J. Márquez, "Roles of dioxins and heavy metals in cancer and neurological diseases using ROS-mediated mechanisms," *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 49, no. 9, pp. 1328–1341, 2010.
- [21] H. T. Chung, B. M. Choi, Y. G. Kwon, and Y. M. Kim, "Interactive relations between nitric oxide (NO) and carbon monoxide (CO): heme oxygenase-1/CO pathway is a key modulator in NO-mediated antiapoptosis and anti-inflammation," *Methods in Enzymology*, vol. 441, pp. 329–338, 2008.
- [22] M. C. Ferrante, G. Mattace Raso, E. Esposito et al., "Effects of non-dioxin-like polychlorinated biphenyl congeners (PCB 101, PCB 153 and PCB 180) alone or mixed on J774A.1 macrophage cell line: modification of apoptotic pathway," *Toxicology Letters*, vol. 202, no. 1, pp. 61–68, 2011.
- [23] G. Kroemer, L. Galluzzi, P. Vandenabeele et al., "Classification of cell death: recommendations of the nomenclature committee on cell death 2009," *Cell Death and Differentiation*, vol. 16, no. 1, pp. 3–11, 2009.
- [24] D. Wlodkovic, W. Telford, J. Skommer, and Z. Darzynkiewicz, "Apoptosis and beyond: cytometry in studies of programmed cell death," *Methods in Cell Biology*, vol. 103, pp. 55–98, 2011.
- [25] X. Tekpli, J. A. Holme, O. Sergent, and D. Lagadic-Gossman, "Importance of plasma membrane dynamics in chemical-induced carcinogenesis," *Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery*, vol. 6, no. 3, pp. 347–353, 2011.
- [26] D. Chen, R. A. Stetler, G. Cao et al., "Characterization of the rat DNA fragmentation factor 35/inhibitor of caspase-activated DNase (short form): the endogenous inhibitor of caspase-dependent DNA fragmentation in neuronal

- apoptosis," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 275, no. 49, pp. 38508–38517, 2000.
- [27] Y. Ishihara and N. Shimamoto, "Involvement of endonuclease G in nucleosomal DNA fragmentation under sustained endogenous oxidative stress," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 281, no. 10, pp. 6726–6733, 2006.
- [28] Y. Harihara, K. Sanjo, and Y. Idezuki, "A modified cuff technique for suprahepatic vena cava anastomosis in rat liver transplantation," *Transplantation*, vol. 53, no. 3, pp. 707–709, 1992.
- [29] E. Norberg, S. Orrenius, and B. Zhivotovskiy, "Mitochondrial regulation of cell death: processing of apoptosis-inducing factor (AIF)," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 396, no. 1, pp. 95–100, 2010.
- [30] T.-J. Fan, L.-H. Han, R.-S. Cong, and J. Liang, "Caspase family proteases and apoptosis," *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, vol. 37, no. 11, pp. 719–727, 2005.
- [31] F. Q. Alenzi, M. Lotfy, and R. K. Wyse, "Swords of cell death: caspase activation and regulation," *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, vol. 11, no. 2, pp. 271–280, 2010.
- [32] M. Paulsen and O. Janssen, "Pro- and anti-apoptotic CD95 signaling in T cells," *Cell Communication and Signaling*, vol. 9, article 7, 2011.
- [33] G. Kroemer, L. Galluzzi, and C. Brenner, "Mitochondrial membrane permeabilization in cell death," *Physiological Reviews*, vol. 87, no. 1, pp. 99–163, 2007.
- [34] L. Galluzzi, N. Zamzami, T. De La Motte Rouge, C. Lemaire, C. Brenner, and G. Kroemer, "Methods for the assessment of mitochondrial membrane permeabilization in apoptosis," *Apoptosis*, vol. 12, no. 5, pp. 803–813, 2007.
- [35] O. Sharaf El Dein, C. Gallerne, A. Deniaud, C. Brenner, and C. Lemaire, "Role of the permeability transition pore complex in lethal inter-organelle crosstalk," *Frontiers in Bioscience*, vol. 14, pp. 3465–3482, 2009.
- [36] V. Shoshan-Barmatz and D. Ben-Hail, "VDAC, a multifunctional mitochondrial protein as a pharmacological target," *Mitochondrion*, vol. 12, no. 1, pp. 24–34, 2012.
- [37] F. Verrier, B. Mignotte, G. Jan, and C. Brenner, "Study of PTPC composition during apoptosis for identification of viral protein target," *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 1010, pp. 126–142, 2003.
- [38] F. Verrier, A. Deniaud, M. LeBras et al., "Dynamic evolution of the adenine nucleotide translocase interactome during chemotherapy-induced apoptosis," *Oncogene*, vol. 23, no. 49, pp. 8049–8064, 2004.
- [39] G. P. McStay, S. J. Clarke, and A. P. Halestrap, "Role of critical thiol groups on the matrix surface of the adenine nucleotide translocase in the mechanism of the mitochondrial permeability transition pore," *Biochemical Journal*, vol. 367, no. 2, pp. 541–548, 2002.
- [40] P. Costantini, A. S. Belzacq, H. L. A. Vieira et al., "Oxidation of a critical thiol residue of the adenine nucleotide translocator enforces Bcl-2-independent permeability transition pore opening and apoptosis," *Oncogene*, vol. 19, no. 2, pp. 307–314, 2000.
- [41] A. Philchenkov, M. Zavelevich, T. J. Krocak, and M. Los, "Caspases and cancer: mechanisms of inactivation and new treatment modalities," *Experimental Oncology*, vol. 26, no. 2, pp. 82–97, 2004.
- [42] G. Martinez-Ruiz, V. Maldonado, G. Ceballos-Cancino, J. P. R. Grajeda, and J. Melendez-Zajgla, "Role of Smac/DIABLO in cancer progression," *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, vol. 27, no. 1, article 48, 2008.
- [43] D. Acehan, X. Jiang, D. G. Morgan, J. E. Heuser, X. Wang, and C. W. Akey, "Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation," *Molecular Cell*, vol. 9, no. 2, pp. 423–432, 2002.
- [44] T. F. Reubold, S. Wohlgemuth, and S. Eschenburg, "A new model for the transition of APAF-1 from inactive monomer to caspase-activating apoptosome," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 284, no. 47, pp. 32717–32724, 2009.
- [45] S. Qi, Y. Pang, Q. Hu et al., "Crystal structure of the *Caenorhabditis elegans* apoptosome reveals an octameric assembly of CED-4," *Cell*, vol. 141, no. 3, pp. 446–457, 2010.
- [46] X. Teng and J. M. Hardwick, "The apoptosome at high resolution," *Cell*, vol. 141, no. 3, pp. 402–404, 2010.
- [47] K. Andreau, M. Castedo, J. L. Perfettini et al., "Preapoptotic chromatin condensation upstream of the mitochondrial checkpoint," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 279, no. 53, pp. 55937–55945, 2004.
- [48] A. Strasser, S. Cory, and J. M. Adams, "Deciphering the rules of programmed cell death to improve therapy of cancer and other diseases," *The EMBO Journal*, vol. 30, no. 18, pp. 3667–3683, 2011.
- [49] Y. Hu, M. A. Benedict, D. Wu, N. Inohara, and G. Núñez, "Bcl-XL interacts with Apaf-1 and inhibits Apaf-1-dependent caspase-9 activation," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 95, no. 8, pp. 4386–4391, 1998.
- [50] G. Pan, K. O'Rourke, and V. M. Dixit, "Caspase-9, Bcl-X(L), and Apaf-1 form a ternary complex," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 273, no. 10, pp. 5841–5845, 1998.
- [51] S. Conus, T. Rosse, and C. Borner, "Failure of Bcl-2 family members to interact with Apaf-1 in normal and apoptotic cells," *Cell Death and Differentiation*, vol. 7, no. 10, pp. 947–954, 2000.
- [52] G. Hausmann, L. A. O'Reilly, R. Van Driel et al., "Proapoptotic apoptosis protease-activating factor 1 (Apaf-1) has a cytoplasmic localization distinct from Bcl-2 or Bcl-x(L)," *Journal of Cell Biology*, vol. 149, no. 3, pp. 623–633, 2000.
- [53] S. Shimizu, Y. Eguchi, W. Kamiike et al., "Bcl-2 prevents apoptotic mitochondrial dysfunction by regulating proton flux," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 95, no. 4, pp. 1455–1459, 1998.
- [54] M. G. Vander Heiden, N. S. Chandel, P. T. Schumacker, and C. B. Thompson, "Bcl-x(L) prevents cell death following growth factor withdrawal by facilitating mitochondrial ATP/ADP exchange," *Molecular Cell*, vol. 3, no. 2, pp. 159–167, 1999.
- [55] M. Wierzbicka, "Morphology of gingival epithelium in the light of modern research," *Czasopismo Stomatologiczne*, vol. 28, no. 10, pp. 969–972, 1975.
- [56] I. Al Ghoul, N. K. H. Khoo, U. G. Knaus et al., "Oxidases and peroxidases in cardiovascular and lung disease: new concepts in reactive oxygen species signaling," *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 51, no. 7, pp. 1271–1288, 2011.
- [57] V. C. Fogg, N. J. Lanning, and J. P. MacKeigan, "Mitochondria in cancer: at the crossroads of life and death," *Chinese Journal of Cancer*, vol. 30, no. 8, pp. 526–539, 2011.
- [58] E. Cadenas and K. J. A. Davies, "Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging," *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 29, no. 3–4, pp. 222–230, 2000.
- [59] S. Macip, M. Igarashi, P. Berggren, J. Yu, S. W. Lee, and S. A. Aaronson, "Influence of induced reactive oxygen species

- in p53-mediated cell fate decisions," *Molecular and Cellular Biology*, vol. 23, no. 23, pp. 8576–8585, 2003.
- [60] S.-Y. Ho, W. Wu Jr., H.-W. Chiu et al., "Arsenic trioxide and radiation enhance apoptotic effects in HL-60 cells through increased ROS generation and regulation of JNK and p38 MAPK signaling pathways," *Chemico-Biological Interactions*, vol. 193, no. 2, pp. 162–171, 2011.
- [61] B. M. Emerling, L. C. Platanius, E. Black, A. R. Nebreda, R. J. Davis, and N. S. Chandel, "Mitochondrial reactive oxygen species activation of p38 mitogen-activated protein kinase is required for hypoxia signaling," *Molecular and Cellular Biology*, vol. 25, no. 12, pp. 4853–4862, 2005.
- [62] A. J. Kowaltowski, R. F. Castilho, and A. E. Vercesi, "Opening of the mitochondrial permeability transition pore by uncoupling or inorganic phosphate in the presence of Ca²⁺ is dependent on mitochondrial-generated reactive oxygen species," *FEBS Letters*, vol. 378, no. 2, pp. 150–152, 1996.
- [63] G. Paradies, G. Petrosillo, M. Pistolesi, and F. M. Ruggiero, "The effect of reactive oxygen species generated from the mitochondrial electron transport chain on the cytochrome c oxidase activity and on the cardiolipin content in bovine heart submitochondrial particles," *FEBS Letters*, vol. 466, no. 2–3, pp. 323–326, 2000.
- [64] S. Orrenius, V. Gogvadze, and B. Zhivotovsky, "Mitochondrial oxidative stress: implications for cell death," *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, vol. 47, pp. 143–183, 2007.
- [65] T. R. Pushpa-Rekha, A. L. Burdsall, L. M. Oleksa, G. M. Chisolm, and D. M. Driscoll, "Rat phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase. cDNA cloning and identification of multiple transcription and translation start sites," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 270, no. 45, pp. 26993–26999, 1995.
- [66] J. Legault, C. Carrier, P. Petrov, P. Renard, J. Remacle, and M. E. Mirault, "Mitochondrial GPx1 decreases induced but not basal oxidative damage to mtDNA in T47D cells," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 272, no. 2, pp. 416–422, 2000.
- [67] M. Lundberg, C. Johansson, J. Chandra et al., "Cloning and expression of a novel human glutaredoxin (Grx2) with mitochondrial and nuclear isoforms," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 276, no. 28, pp. 26269–26275, 2001.
- [68] H. Wu, K. Xing, and M. F. Lou, "Glutaredoxin 2 prevents H₂O₂-induced cell apoptosis by protecting complex I activity in the mitochondria," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1797, no. 10, pp. 1705–1715, 2010.
- [69] Y. Aniya and N. Imaizumi, "Mitochondrial glutathione transferases involving a new function for membrane permeability transition pore regulation," *Drug Metabolism Reviews*, vol. 43, no. 2, pp. 292–299, 2011.
- [70] J. Zhang, A. J. Ghio, W. Chang, O. Kamdar, G. D. Rosen, and D. Upadhyay, "Bim mediates mitochondria-regulated particulate matter-induced apoptosis in alveolar epithelial cells," *FEBS Letters*, vol. 581, no. 22, pp. 4148–4152, 2007.
- [71] W. Y. Wani, S. Gudup, A. Sunkaria et al., "Protective efficacy of mitochondrial targeted antioxidant MitoQ against dichlorvos induced oxidative stress and cell death in rat brain," *Neuropharmacology*, vol. 61, no. 8, pp. 1193–1201, 2011.
- [72] R. Franco, R. Sánchez-Olea, E. M. Reyes-Reyes, and M. I. Panayiotidis, "Environmental toxicity, oxidative stress and apoptosis: manage a trois," *Mutation Research*, vol. 674, no. 1–2, pp. 3–22, 2009.
- [73] V. N. Samartsev, O. V. Markova, I. P. Zeldi, and A. V. Smirnov, "Role of the ADP/ATP and aspartate/glutamate antiporters in the uncoupling effect of fatty acids, lauryl sulfate, and 2, 4-dinitrophenol in liver mitochondria," *Biochemistry*, vol. 64, no. 8, pp. 901–911, 1999.
- [74] M. Gualtieri, P. Mantecca, F. Cetta, and M. Camatini, "Organic compounds in tire particle induce reactive oxygen species and heat-shock proteins in the human alveolar cell line A549," *Environment International*, vol. 34, no. 4, pp. 437–442, 2008.
- [75] F. Farina, G. Sancini, P. Mantecca, D. Gallinotti, M. Camatini, and P. Palestini, "The acute toxic effects of particulate matter in mouse lung are related to size and season of collection," *Toxicology Letters*, vol. 202, no. 3, pp. 209–217, 2011.
- [76] E. Alfaro-Moreno, L. Martínez, C. García-Cuellar et al., "Biologic effects induced in vitro by PM10 from three different zones of Mexico City," *Environmental Health Perspectives*, vol. 110, no. 7, pp. 715–720, 2002.
- [77] J. H. Choi, J. S. Kim, Y. C. Kim, Y. S. Kim, N. H. Chung, and M. H. Cho, "Comparative study of PM_{2.5}—and PM₁₀—induced oxidative stress in rat lung epithelial cells," *Journal of Veterinary Science*, vol. 5, no. 1, pp. 11–18, 2004.
- [78] O. Kamdar, W. Le, J. Zhang, A. J. Ghio, G. D. Rosen, and D. Upadhyay, "Air pollution induces enhanced mitochondrial oxidative stress in cystic fibrosis airway epithelium," *FEBS Letters*, vol. 582, no. 25–26, pp. 3601–3606, 2008.
- [79] G. Garçon, Z. Dagher, F. Zerimech et al., "Dunkerque City air pollution particulate matter-induced cytotoxicity, oxidative stress and inflammation in human epithelial lung cells (L132) in culture," *Toxicology in Vitro*, vol. 20, no. 4, pp. 519–528, 2006.
- [80] Z. Dagher, G. Garçon, S. Billet et al., "Role of nuclear factor-kappa B activation in the adverse effects induced by air pollution particulate matter (PM_{2.5}) in human epithelial lung cells (L132) in culture," *Journal of Applied Toxicology*, vol. 27, no. 3, pp. 284–290, 2007.
- [81] A. Baulig, M. Garlatti, V. Bonvallot et al., "Involvement of reactive oxygen species in the metabolic pathways triggered by diesel exhaust particles in human airway epithelial cells," *American Journal of Physiology*, vol. 285, no. 3, pp. L671–L679, 2003.
- [82] M. Lodovici and E. Bigagli, "Oxidative stress and air pollution exposure," *Journal of Toxicology*, vol. 2011, Article ID 487074, 9 pages, 2011.
- [83] A. P. Senft, T. P. Dalton, D. W. Nebert et al., "Mitochondrial reactive oxygen production is dependent on the aromatic hydrocarbon receptor," *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 33, no. 9, pp. 1268–1278, 2002.
- [84] T. Xia, P. Korge, J. N. Weiss et al., "Quinones and aromatic chemical compounds in particulate matter induce mitochondrial dysfunction: implications for ultrafine particle toxicity," *Environmental Health Perspectives*, vol. 112, no. 14, pp. 1347–1358, 2004.
- [85] A. Baeza-Squiban, V. Bonvallot, S. Boland, and F. Marano, "Airborne particles evoke an inflammatory response in human airway epithelium. Activation of transcription factors," *Cell Biology and Toxicology*, vol. 15, no. 6, pp. 375–380, 1999.
- [86] D. Upadhyay, V. Panduri, A. Ghio, and D. W. Kamp, "Particulate matter induces alveolar epithelial cell DNA damage and apoptosis role of free radicals and the mitochondria," *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, vol. 29, no. 2, pp. 180–187, 2003.

- [87] C. J. Obot, M. T. Morandi, T. P. Beebe, R. F. Hamilton, and A. Holian, "Surface components of airborne particulate matter induce macrophage apoptosis through scavenger receptors," *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 184, no. 2, pp. 98–106, 2002.
- [88] H. Andersson, E. Piras, J. Demma, B. Hellman, and E. Brittebo, "Low levels of the air pollutant 1-nitropyrene induce DNA damage, increased levels of reactive oxygen species and endoplasmic reticulum stress in human endothelial cells," *Toxicology*, vol. 262, no. 1, pp. 57–64, 2009.
- [89] N. Asare, X. Tekpli, M. Rissel et al., "Signalling pathways involved in 1-nitropyrene (1-NP)-induced and 3-nitrofluoranthene (3-NF)-induced cell death in Hepa1c7 cells," *Mutagenesis*, vol. 24, no. 6, pp. 481–493, 2009.
- [90] K. Chramostová, J. Vondráček, L. Šindlerová, B. Vojtěšek, A. Kozubík, and M. Machala, "Polycyclic aromatic hydrocarbons modulate cell proliferation in rat hepatic epithelial stem-like WB-F344 cells," *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 196, no. 1, pp. 136–148, 2004.
- [91] J. Van Grevenynghe, L. Sparfel, M. L. Vee et al., "Cytochrome P450-dependent toxicity of environmental polycyclic aromatic hydrocarbons towards human macrophages," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 317, no. 3, pp. 708–716, 2004.
- [92] E. Hrubá, L. Trilecová, S. Marvanová et al., "Genotoxic polycyclic aromatic hydrocarbons fail to induce the p53-dependent DNA damage response, apoptosis or cell-cycle arrest in human prostate carcinoma LNCaP cells," *Toxicology Letters*, vol. 197, no. 3, pp. 227–235, 2010.
- [93] R. Barouki and Y. Morel, "Repression of cytochrome P450 IA1 gene expression by oxidative stress: mechanisms and biological implications," *Biochemical Pharmacology*, vol. 61, no. 5, pp. 511–516, 2001.
- [94] E. Hodgson, "Phase 1 metabolism of toxicants and metabolic interactions," in *Molecular and Biochemical Toxicology*, R. C. Smart and E. Hodgson, Eds., pp. 173–203, John Wiley & Sons, 4th edition, 2008.
- [95] A. H. Conney, R. L. Chang, D. M. Jerina, and S. J. C. Wei, "Studies on the metabolism of benzo[a]pyrene and dose-dependent differences in the mutagenic profile of its ultimate carcinogenic metabolite," *Drug Metabolism Reviews*, vol. 26, no. 1–2, pp. 125–163, 1994.
- [96] A. G. Smith, B. Clothier, S. Robinson et al., "Interaction between iron metabolism and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in mice with variants of the Ahr gene: a hepatic oxidative mechanism," *Molecular Pharmacology*, vol. 53, no. 1, pp. 52–61, 1998.
- [97] A. Cuypers, M. Plusquin, T. Remans et al., "Cadmium stress: an oxidative challenge," *BioMetals*, vol. 23, no. 5, pp. 927–940, 2010.
- [98] X. Wang, Y.-O. Son, Q. Chang et al., "NADPH oxidase activation is required in reactive oxygen species generation and cell transformation induced by hexavalent chromium," *Toxicological Sciences*, vol. 123, no. 2, pp. 399–410, 2011.
- [99] D. B. Buchwalter, "Metals," in *Molecular and Biochemical Toxicology*, R. C. Smart and E. Hodgson, Eds., pp. 413–439, John Wiley & Sons, 2008.
- [100] M. D. Pulido and A. R. Parrish, "Metal-induced apoptosis: mechanisms," *Mutation Research*, vol. 533, no. 1–2, pp. 227–241, 2003.
- [101] D. Beyersmann and A. Hartwig, "Carcinogenic metal compounds: recent insight into molecular and cellular mechanisms," *Archives of Toxicology*, vol. 82, no. 8, pp. 493–512, 2008.
- [102] S. V. S. Rana, "Metals and apoptosis: recent developments," *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, vol. 22, no. 4, pp. 262–284, 2008.
- [103] J. J. Li, Q. Tang, Y. Li et al., "Role of oxidative stress in the apoptosis of hepatocellular carcinoma induced by combination of arsenic trioxide and ascorbic acid," *Acta Pharmacologica Sinica*, vol. 27, no. 8, pp. 1078–1084, 2006.
- [104] J. P. Bebear, V. Calas, and B. Lablache Combier, "Carbocysteine in catarrhal ORL diseases," *Revue de Laryngologie-Otologie-Rhinologie*, vol. 111, no. 5, pp. 499–501, 1990.
- [105] M. Li, T. Xia, C. S. Jiang, L. J. Li, J. L. Fu, and Z. C. Zhou, "Cadmium directly induced the opening of membrane permeability pore of mitochondria which possibly involved in cadmium-triggered apoptosis," *Toxicology*, vol. 194, no. 1–2, pp. 19–33, 2003.
- [106] J. Ye, S. Wang, S. S. Leonard et al., "Role of reactive oxygen species and p53 in chromium(VI)-induced apoptosis," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 274, no. 49, pp. 34974–34980, 1999.
- [107] P. Russo, A. Catassi, A. Cesario et al., "Molecular mechanisms of hexavalent chromium-induced apoptosis in human bronchoalveolar cells," *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, vol. 33, no. 6, pp. 589–600, 2005.
- [108] R. Zhao, N. Xiang, F. E. Domann, and W. Zhong, "Expression of p53 enhances selenite-induced superoxide production and apoptosis in human prostate cancer cells," *Cancer Research*, vol. 66, no. 4, pp. 2296–2304, 2006.
- [109] K. Donaldson, V. Stone, P. J. A. Borm et al., "Oxidative stress and calcium signaling in the adverse effects of environmental particles (PM10)," *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 34, no. 11, pp. 1369–1382, 2003.
- [110] J. Araya, M. Maruyama, A. Inoue et al., "Inhibition of proteasome activity is involved in cobalt-induced apoptosis of human alveolar macrophages," *American Journal of Physiology*, vol. 283, no. 4, pp. L849–L858, 2002.
- [111] H. Geng, Z. Meng, and Q. Zhang, "In vitro responses of rat alveolar macrophages to particle suspensions and water-soluble components of dust storm PM2.5," *Toxicology in Vitro*, vol. 20, no. 5, pp. 575–584, 2006.
- [112] D. W. Kamp, V. Panduri, S. A. Weitzman, and N. Chandel, "Asbestos-induced alveolar epithelial cell apoptosis: role of mitochondrial dysfunction caused by iron-derived free radicals," *Molecular and Cellular Biochemistry*, vol. 234–235, pp. 153–160, 2002.
- [113] M. Jiménez Del Río and C. Vélez-Pardo, "Transition metal-induced apoptosis in lymphocytes via hydroxyl radical generation, mitochondria dysfunction, and caspase-3 activation: an *in vitro* model for neurodegeneration," *Archives of Medical Research*, vol. 35, no. 3, pp. 185–193, 2004.
- [114] M. Provinciali, A. Donnini, K. Argentati, G. Di Stasio, B. Bartozzi, and G. Bernardini, "Reactive oxygen species modulate Zn²⁺-induced apoptosis in cancer cells," *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 32, no. 5, pp. 431–445, 2002.
- [115] Y. Cho, S. Gorina, P. D. Jeffrey, and N. P. Pavletich, "Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations," *Science*, vol. 265, no. 5170, pp. 346–355, 1994.
- [116] M. Madesh and G. Hajnóczky, "VDAC-dependent permeabilization of the outer mitochondrial membrane by superoxide induces rapid and massive cytochrome c release," *Journal of Cell Biology*, vol. 155, no. 6, pp. 1003–1015, 2001.
- [117] T. S. Hiura, N. Li, R. Kaplan, M. Horwitz, J. C. Seagrave, and A. E. Nel, "The role of a mitochondrial pathway in the

- induction of apoptosis by chemicals extracted from diesel exhaust particles," *Journal of Immunology*, vol. 165, no. 5, pp. 2703–2711, 2000.
- [118] V. A. Tyurin, Y. Y. Tyurina, M.-Y. Jung et al., "Mass-spectrometric analysis of hydroperoxy- and hydroxy-derivatives of cardiolipin and phosphatidylserine in cells and tissues induced by pro-apoptotic and pro-inflammatory stimuli," *Journal of Chromatography B*, vol. 877, no. 26, pp. 2863–2872, 2009.
- [119] D. Shen, T. P. Dalton, D. W. Nebert, and H. G. Shertzer, "Glutathione redox state regulates mitochondrial reactive oxygen production," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 280, no. 27, pp. 25305–25312, 2005.
- [120] S. C. Chen, T. L. Liao, Y. H. Wei, C. R. Tzeng, and S. H. Kao, "Endocrine disruptor, dioxin (TCDD)-induced mitochondrial dysfunction and apoptosis in human trophoblast-like JAR cells," *Molecular Human Reproduction*, vol. 16, no. 5, Article ID gaq004, pp. 361–372, 2010.
- [121] I. F. Sevrioukova, "Redox-linked conformational dynamics in apoptosis-inducing factor," *Journal of Molecular Biology*, vol. 390, no. 5, pp. 924–938, 2009.
- [122] L. Misevičienė, Z. Anusevičius, J. Šarlauskas, I. F. Sevrioukova, and N. Čnas, "Redox reactions of the FAD-containing apoptosis-inducing factor (AIF) with quinoidal xenobiotics: a mechanistic study," *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 512, no. 2, pp. 183–189, 2011.
- [123] Y. C. T. Huang, Z. Li, S. D. Harder, and J. M. Soukup, "Apoptotic and inflammatory effects induced by different particles in human alveolar macrophages," *Inhalation Toxicology*, vol. 16, no. 14, pp. 863–878, 2004.
- [124] P. L. Liu, Y. L. Chen, Y. H. Chen, S. J. Lin, and Y. R. Kou, "Wood smoke extract induces oxidative stress-mediated caspase-independent apoptosis in human lung endothelial cells: role of AIF and EndoG," *American Journal of Physiology*, vol. 289, no. 5, pp. L739–L749, 2005.
- [125] Z. Dagher, G. Garçon, S. Billet et al., "Activation of different pathways of apoptosis by air pollution particulate matter (PM2.5) in human epithelial lung cells (L132) in culture," *Toxicology*, vol. 225, no. 1, pp. 12–24, 2006.
- [126] S. Hussain, L. C. J. Thomassen, I. Ferecatu et al., "Carbon black and titanium dioxide nanoparticles elicit distinct apoptotic pathways in bronchial epithelial cells," *Particle and Fibre Toxicology*, vol. 7, article 10, 2010.
- [127] U. Sydlík, K. Bierhals, M. Soufi, J. Abel, R. P. F. Schins, and K. Unfried, "Ultrafine carbon particles induce apoptosis and proliferation in rat lung epithelial cells via specific signaling pathways both using EGF-R," *American Journal of Physiology*, vol. 291, no. 4, pp. L725–L733, 2006.
- [128] I. Abbas, G. Garçon, F. Saint-Georges et al., "Occurrence of molecular abnormalities of cell cycle in L132 cells after in vitro short-term exposure to air pollution PM2.5," *Chemico-Biological Interactions*, vol. 188, no. 3, pp. 558–565, 2010.
- [129] S. Shishodia and B. B. Aggarwal, "Cyclooxygenase (COX)-2 inhibitor celecoxib abrogates activation of cigarette smoke-induced nuclear factor (NF)- κ B by suppressing activation of I κ B α kinase in human non-small cell lung carcinoma: correlation with suppression of cyclin D1, COX-2, and matrix metalloproteinase-9," *Cancer Research*, vol. 64, no. 14, pp. 5004–5012, 2004.
- [130] W. H. Kuo, J. H. Chen, H. H. Lin, B. C. Chen, J. D. Hsu, and C. J. Wang, "Induction of apoptosis in the lung tissue from rats exposed to cigarette smoke involves p38/JNK MAPK pathway," *Chemico-Biological Interactions*, vol. 155, no. 1–2, pp. 31–42, 2005.
- [131] S. Soberanes, D. Urich, C. M. Baker 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*, vol. 284, no. 4, pp. 2176–2186, 2009.
- [132] B. Y. Chin, M. E. Choi, M. D. Burdick, R. M. Strieter, T. H. Risby, and A. M. K. Choi, "Induction of apoptosis by particulate matter: role of TNF- α and MAPK," *American Journal of Physiology*, vol. 275, no. 5, pp. L942–L949, 1998.
- [133] F. Peixoto, J. A. F. Vicente, and V. M. C. Madeira, "Comparative effects of herbicide dicamba and related compound on plant mitochondrial bioenergetics," *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, vol. 17, no. 3, pp. 185–192, 2003.
- [134] I. O. Kurochkin, M. Etkorn, D. Buchwalter, L. Leamy, and I. M. Sokolova, "Top-down control analysis of the cadmium effects on molluscan mitochondria and the mechanisms of cadmium-induced mitochondrial dysfunction," *American Journal of Physiology*, vol. 300, no. 1, pp. R21–R31, 2011.
- [135] D. Urich, S. Soberanes, Z. Burgess et al., "Proapoptotic Noxa is required for particulate matter-induced cell death and lung inflammation," *The FASEB Journal*, vol. 23, no. 7, pp. 2055–2064, 2009.
- [136] N. Podechard, X. Tekpli, D. Catheline et al., "Mechanisms involved in lipid accumulation and apoptosis induced by 1-nitropyrene in Hepa1c1c7 cells," *Toxicology Letters*, vol. 206, no. 3, pp. 289–299, 2011.
- [137] X. Tekpli, E. Rivedal, M. Gorria et al., "The B[a]P-increased intercellular communication via translocation of connexin-43 into gap junctions reduces apoptosis," *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 242, no. 2, pp. 231–240, 2010.
- [138] X. Tekpli, M. Rissel, L. Huc et al., "Membrane remodeling, an early event in benzo[a]pyrene-induced apoptosis," *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 243, no. 1, pp. 68–76, 2010.
- [139] "Air pollution and lung cancer," in *Air Pollution and Health*, J. M. Samet and A. J. Cohen, Eds. S. T. Holgate et al., Ed., pp. 841–564, Academic Press, 1999.
- [140] "Carcinogenic responses to air pollutants," in *Air Pollution and Health*, R. O. McClellan and T. E. Jackson, Eds. S. T. Holgate et al., Ed., pp. 382–413, Academic Press, 1999.
- [141] "Carcinogenesis," in *Molecular and Biochemical Toxicology*, R. C. Smart, S. J. Ewing, and K. D. Loomis, Eds. R. C. Smart and E. Hodgson, Eds., pp. 537–586, John Wiley & Sons, 1999.
- [142] D. Hanahan and R. A. Weinberg, "The hallmarks of cancer," *Cell*, vol. 100, no. 1, pp. 57–70, 2000.
- [143] M. Teranishi, T. Toyooka, T. Ohura, S. Masuda, and Y. Ibuki, "Benzo[a]pyrene exposed to solar-simulated light inhibits apoptosis and augments carcinogenicity," *Chemico-Biological Interactions*, vol. 185, no. 1, pp. 4–11, 2010.
- [144] H. S. Hung, W. J. Wu, Y. W. Cheng, T. C. Wu, K. L. Chang, and H. Lee, "Association of cooking oil fumes exposure with lung cancer: involvement of inhibitor of apoptosis proteins in cell survival and proliferation in vitro," *Mutation Research*, vol. 628, no. 2, pp. 107–116, 2007.
- [145] I. Ferecatu, M. C. Borot, C. Bossard et al., "Polycyclic aromatic hydrocarbon components contribute to the mitochondria-antiapoptotic effect of fine particulate matter on human bronchial epithelial cells via the aryl hydrocarbon receptor," *Particle and Fibre Toxicology*, vol. 7, article 18, 2010.
- [146] A. Q. Truong-Tran, J. Carter, R. E. Ruffin, and P. D. Zalewski, "The role of zinc in caspase activation and apoptotic cell death," *BioMetals*, vol. 14, no. 3–4, pp. 315–330, 2001.
- [147] A. Szuster-Ciesielska, K. Plewka, J. Daniluk, and M. Kandefers-Szerszeń, "Zinc inhibits ethanol-induced HepG2

- cell apoptosis," *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 229, no. 1, pp. 1–9, 2008.
- [148] J. E. Carter, A. Q. Truong-Tran, D. Grosser, L. Ho, R. E. Ruffin, and P. D. Zalewski, "Involvement of redox events in caspase activation in zinc-depleted airway epithelial cells," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 297, no. 4, pp. 1062–1070, 2002.
- [149] P. Bernardi, A. Krauskopf, E. Basso et al., "The mitochondrial permeability transition from in vitro artifact to disease target," *The FEBS Journal*, vol. 273, no. 10, pp. 2077–2099, 2006.
- [150] C. E. Rexroad and A. M. Powell, "Effect of serum-free co-culture and synchrony of recipients on development of cultured sheep embryos to fetuses," *Journal of Animal Science*, vol. 69, no. 5, pp. 2066–2072, 1991.
- [151] A. D. Burdick, I. D. Ivnitiski-Steele, F. T. Lauer, and S. W. Burchiel, "PYK2 mediates anti-apoptotic AKT signaling in response to benzo[a]pyrene diol epoxide in mammary epithelial cells," *Carcinogenesis*, vol. 27, no. 11, pp. 2331–2340, 2006.
- [152] M. Chopra, A. M. Dharmarajan, G. Meiss, and D. Schrenk, "Inhibition of UV-C light-induced apoptosis in liver cells by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin," *Toxicological Sciences*, vol. 111, no. 1, pp. 49–63, 2009.
- [153] L. Al-Anati, J. Högberg, and U. Stenius, "Non-dioxin-like PCBs interact with benzo[a]pyrene-induced p53-responses and inhibit apoptosis," *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 249, no. 2, pp. 166–177, 2010.
- [154] H. Bayram, K. Ito, R. Issa, M. Ito, M. Sukkar, and K. F. Chung, "Regulation of human lung epithelial cell numbers by diesel exhaust particles," *European Respiratory Journal*, vol. 27, no. 4, pp. 705–713, 2006.
- [155] M. Chopra, M. Gährs, M. Haben, C. Michels, and D. Schrenk, "Inhibition of apoptosis by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin depends on protein biosynthesis," *Cell Biology and Toxicology*, vol. 26, no. 4, pp. 391–401, 2010.
- [156] J. J. Mukherjee, S. Kumar, R. Gocinski, and J. Williams, "Phenolic fraction of tobacco smoke inhibits BPDE-induced apoptosis response and potentiates cell transformation: role of attenuation of p53 response," *Chemical Research in Toxicology*, vol. 24, no. 5, pp. 698–705, 2011.
- [157] M. Hailwood, D. King, and E. Leoz, "Ambient air pollution by polycyclic aromatic hydrocarbons PAH," in *Position Paper Annexes*, European Commission, 2001.
- [158] J. L. Marlowe, Y. Fan, X. Chang et al., "The aryl hydrocarbon receptor binds to E2F1 and inhibits E2F1-induced apoptosis," *Molecular Biology of the Cell*, vol. 19, no. 8, pp. 3263–3271, 2008.
- [159] C. F. A. Vogel, W. Li, E. Sciuillo et al., "Pathogenesis of aryl hydrocarbon receptor-mediated development of lymphoma is associated with increased cyclooxygenase-2 expression," *American Journal of Pathology*, vol. 171, no. 5, pp. 1538–1548, 2007.
- [160] A. Ambolet-Camoit, L. C. Bui, S. Pierre et al., "2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin counteracts the p53 response to a genotoxicant by upregulating expression of the metastasis marker AGR2 in the hepatocarcinoma cell line HepG2," *Toxicological Sciences*, vol. 115, no. 2, pp. 501–512, 2010.
- [161] H. Sarioglu, S. Brandner, M. Haberberger et al., "Analysis of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced proteome changes in 5L rat hepatoma cells reveals novel targets of dioxin action including the mitochondrial apoptosis regulator VDAC2," *Molecular and Cellular Proteomics*, vol. 7, no. 2, pp. 394–410, 2008.
- [162] E. A. Ostrakhovitch, M. R. Lordnejad, F. Schliess, H. Sies, and L.-O. Klotz, "Copper ions strongly activate the phosphoinositide-3-kinase/Akt pathway independent of the generation of reactive oxygen species," *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 397, no. 2, pp. 232–239, 2002.
- [163] J. J. Mukherjee, S. K. Gupta, and S. Kumar, "Inhibition of benzo[a]pyrene-diol-epoxide (BPDE)-induced bax and caspase-9 by cadmium: role of mitogen activated protein kinase," *Mutation Research*, vol. 661, no. 1–2, pp. 41–46, 2009.
- [164] N. Agopyan, J. Head, S. Yu, and S. A. Simon, "TRPV1 receptors mediate particulate matter-induced apoptosis," *American Journal of Physiology*, vol. 286, no. 3, pp. L563–L572, 2004.
- [165] R. Wu, L. Zhang, M. S. Hoagland, and H. I. Swanson, "Lack of the aryl hydrocarbon receptor leads to impaired activation of AKT/protein kinase B and enhanced sensitivity to apoptosis induced via the intrinsic pathway," *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, vol. 320, no. 1, pp. 448–457, 2007.
- [166] M. Kaimul Ahsan, H. Nakamura, M. Tanito, K. Yamada, H. Utsumi, and J. Yodoi, "Thioredoxin-1 suppresses lung injury and apoptosis induced by diesel exhaust particles (DEP) by scavenging reactive oxygen species and by inhibiting DEP-induced downregulation of Akt," *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 39, no. 12, pp. 1549–1559, 2005.
- [167] A. Rasola, M. Sciacovelli, B. Pantic, and P. Bernardi, "Signal transduction to the permeability transition pore," *FEBS Letters*, vol. 584, no. 10, pp. 1989–1996, 2010.
- [168] A. Baeza-Squiban, V. Bonvallot, S. Boland, and F. Marano, "Diesel exhaust particles increase NF- κ B DNA binding activity and c-fos proto-oncogene expression in human bronchial epithelial cells," *Toxicology in Vitro*, vol. 13, no. 4–5, pp. 817–822, 1999.
- [169] S. Shishodia, P. Potdar, C. G. Gairola, and B. B. Aggarwal, "Curcumin (diferuloylmethane) down-regulates cigarette smoke-induced NF- κ B activation through inhibition of I κ B α kinase in human lung epithelial cells: correlation with suppression of COX-2, MMP-9 and cyclin D1," *Carcinogenesis*, vol. 24, no. 7, pp. 1269–1279, 2003.
- [170] V. Rubio, M. Valverde, and E. Rojas, "Effects of atmospheric pollutants on the Nrf2 survival pathway," *Environmental Science and Pollution Research*, vol. 17, no. 2, pp. 369–382, 2010.
- [171] N. Li, M. I. Venkatesan, A. Miguel et al., "Induction of heme oxygenase-1 expression in macrophages by diesel exhaust particle chemicals and quinones via the antioxidant-responsive element," *Journal of Immunology*, vol. 165, no. 6, pp. 3393–3401, 2000.
- [172] N. Li, J. Alam, M. I. Venkatesan et al., "Nrf2 is a key transcription factor that regulates antioxidant defense in macrophages and epithelial cells: protecting against the proinflammatory and oxidizing effects of diesel exhaust chemicals," *Journal of Immunology*, vol. 173, no. 5, pp. 3467–3481, 2004.
- [173] D. J. Slebos, S. W. Ryter, M. Van Der Toorn et al., "Mitochondrial localization and function of heme oxygenase-1 in cigarette smoke-induced cell death," *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, vol. 36, no. 4, pp. 409–417, 2007.
- [174] D. Morse and A. M. K. Choi, "Heme oxygenase-1: from bench to bedside," *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, vol. 172, no. 6, pp. 660–670, 2005.
- [175] B. M. Choi, H. O. Pae, Y. M. Kim, and H. T. Chung, "Nitric oxide-mediated cytoprotection of hepatocytes from

- glucose deprivation-induced cytotoxicity: involvement of heme oxygenase-1," *Hepatology*, vol. 37, no. 4, pp. 810–823, 2003.
- [176] C. S. F. Queiroga, A. S. Almeida, P. M. Alves, C. Brenner, and H. L. A. Vieira, "Carbon monoxide prevents hepatic mitochondrial membrane permeabilization," *BMC Cell Biology*, vol. 12, article 10, 2011.
- [177] L. G. Higgins and J. D. Hayes, "Mechanisms of induction of cytosolic and microsomal glutathione transferase (GST) genes by xenobiotics and pro-inflammatory agents," *Drug Metabolism Reviews*, vol. 43, no. 2, pp. 92–137, 2011.
- [178] H. Raza, "Dual localization of glutathione S-transferase in the cytosol and mitochondria: implications in oxidative stress, toxicity and disease," *The FEBS Journal*, vol. 278, no. 22, Article ID 10.1111/j.1742-4658.2011.08358.x, pp. 4243–4251, 2011.
- [179] K. K. Lee, M. Shimoji, Q. S. Hossain, H. Sunakawa, and Y. Aniya, "Novel function of glutathione transferase in rat liver mitochondrial membrane: role for cytochrome c release from mitochondria," *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 232, no. 1, pp. 109–118, 2008.
- [180] N. Li, M. Hao, R. F. Phalen, W. C. Hinds, and A. E. Nel, "Particulate air pollutants and asthma: a paradigm for the role of oxidative stress in PM-induced adverse health effects," *Clinical Immunology*, vol. 109, no. 3, pp. 250–265, 2003.
- [181] "Particle-mediated extracellular oxidative stress in the lung," in *Particle Toxicology*, F. J. Kelly and I. S. Mudway, Eds. K. Donaldson and P. Borm, Eds., pp. 89–117, CRC Press, 2007.
- [182] N. Li, M. Wang, T. D. Oberley, J. M. Sempf, and A. E. Nel, "Comparison of the pro-oxidative and proinflammatory effects of organic diesel exhaust particle chemicals in bronchial epithelial cells and macrophages," *Journal of Immunology*, vol. 169, no. 8, pp. 4531–4541, 2002.
- [183] R. Barouki, "Linking long-term toxicity of xeno-chemicals with short-term biological adaptation," *Biochimie*, vol. 92, no. 9, pp. 1222–1226, 2010.

VII. BIBLIOGRAPHIE

- Abbas, I., F. Saint-Georges, S. Billet, A. Verdin, et al. (2009).** "Air pollution particulate matter (PM2.5)-induced gene expression of volatile organic compound and/or polycyclic aromatic hydrocarbon-metabolizing enzymes in an in vitro coculture lung model." *Toxicol In Vitro* 23(1): 37-46.
- AFNOR (1985).** Air ambiant - Concepts relatifs à l'échantillonnage des matières particulaires en suspension Norme AFNOR X43-022.
- AFSSE (2005).** Impact sanitaire de la pollution atmosphérique urbaine - Estimation de l'impact lié à l'exposition chronique aux particules fines sur l'espérance de vie, Agence Française de Sécurité Sanitaire Environnementale
- Agopyan, N., J. Head, S. Yu and S. A. Simon (2004).** "TRPV1 receptors mediate particulate matter-induced apoptosis." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 286(3): L563-572.
- AirParif. (2010).** www.airparif.asso.fr "
- Al-Anati, L., J. Hogberg and U. Stenius (2010).** "Non-dioxin-like PCBs interact with benzo[a]pyrene-induced p53-responses and inhibit apoptosis." *Toxicol Appl Pharmacol* 249(2): 166-177.
- An, W. L., J. J. Pei, T. Nishimura, B. Winblad, et al. (2005).** "Zinc-induced anti-apoptotic effects in SH-SY5Y neuroblastoma cells via the extracellular signal-regulated kinase 1/2." *Brain Res Mol Brain Res* 135(1-2): 40-47.
- Andre, V., S. Billet, D. Pottier, J. Le Goff, et al. (2011).** "Mutagenicity and genotoxicity of PM2.5 issued from an urbano-industrialized area of Dunkerque (France)." *J Appl Toxicol* 31(2): 131-138.
- Andreau, K., M. Leroux and A. Bouharrou (2012).** "Health and cellular impacts of air pollutants: from cytoprotection to cytotoxicity." *Biochem Res Int* 2012: 493894.
- Aslan, J. E. and G. Thomas (2009).** "Death by committee: organellar trafficking and communication in apoptosis." *Traffic* 10(10): 1390-1404.
- Atkinson, R. W., H. R. Anderson, J. Sunyer, J. Ayres, et al. (2001).** "Acute effects of particulate air pollution on respiratory admissions: results from APHEA 2 project. Air Pollution and Health: a European Approach." *Am J Respir Crit Care Med* 164(10 Pt 1): 1860-1866.
- Aung, H. H., M. W. Lame, K. Gohil, G. He, et al. (2011).** "Comparative gene responses to collected ambient particles in vitro: endothelial responses." *Physiol Genomics* 43(15): 917-929.
- Balashazy, I., W. Hofmann and T. Heistracher (2003).** "Local particle deposition patterns may play a key role in the development of lung cancer." *J Appl Physiol* (1985) 94(5): 1719-1725.
- Ball, J. C., A. M. Straccia, W. C. Young and A. E. Aust (2000).** "The formation of reactive oxygen species catalyzed by neutral, aqueous extracts of NIST ambient particulate matter and diesel engine particles." *J Air Waste Manag Assoc* 50(11): 1897-1903.
- Barouki, R. (2010).** "Linking long-term toxicity of xeno-chemicals with short-term biological adaptation." *Biochimie* 92(9): 1222-1226.
- Batinic-Haberle, I., S. Cuzzocrea, J. S. Reboucas, G. Ferrer-Sueta, et al. (2009).** "Pure MnTBAP selectively scavenges peroxynitrite over superoxide: comparison of pure and commercial MnTBAP samples to MnTE-2-PyP in two models of oxidative stress injury, an SOD-specific *Escherichia coli* model and carrageenan-induced pleurisy." *Free Radic Biol Med* 46(2): 192-201.
- Bauer, A. K., T. Hill, 3rd and C. M. Alexander (2013).** "The involvement of NRF2 in lung cancer." *Oxid Med Cell Longev* 2013: 746432.
- Baulig, A., M. Garlatti, V. Bonvallot, A. Marchand, et al. (2003).** "Involvement of reactive oxygen species in the metabolic pathways triggered by diesel exhaust particles in human airway epithelial cells." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 285(3): L671-679.

- Baulig, A., J. J. Poirault, P. Ausset, R. Schins, et al. (2004).** "Physicochemical characteristics and biological activities of seasonal atmospheric particulate matter sampling in two locations of Paris." *Environ Sci Technol* 38(22): 5985-5992.
- Baulig, A., S. Singh, A. Marchand, R. Schins, et al. (2009).** "Role of Paris PM(2.5) components in the pro-inflammatory response induced in airway epithelial cells." *Toxicology* 261(3): 126-135.
- Bayram, H., J. L. Devalia, R. J. Sapsford, T. Ohtoshi, et al. (1998).** "The effect of diesel exhaust particles on cell function and release of inflammatory mediators from human bronchial epithelial cells in vitro." *Am J Respir Cell Mol Biol* 18(3): 441-448.
- Bayram, H., K. Ito, R. Issa, M. Ito, et al. (2006).** "Regulation of human lung epithelial cell numbers by diesel exhaust particles." *Eur Respir J* 27(4): 705-713.
- Becks, L., M. Prince, H. Burson, C. Christophe, et al. (2010).** "Aggressive mammary carcinoma progression in Nrf2 knockout mice treated with 7,12-dimethylbenz[a]anthracene." *BMC Cancer* 10: 540.
- Begleiter, A. and L. Lange (2002).** "Lack of NQO1 induction in human tumor cells is not due to changes in the promoter region of the gene." *Int J Oncol* 20(4): 835-838.
- Bekki, K., A. Toriba, N. Tang, T. Kameda, et al. (2013).** "Biological effects of polycyclic aromatic hydrocarbon derivatives." *J UOEH* 35(1): 17-24.
- Belade, E., L. Armand, L. Martinon, L. Kheuang, et al. (2012).** "A comparative transmission electron microscopy study of titanium dioxide and carbon black nanoparticles uptake in human lung epithelial and fibroblast cell lines." *Toxicol In Vitro* 26(1): 57-66.
- Bennett, W. D., K. L. Zeman and A. M. Jarabek (2003).** "Nasal contribution to breathing with exercise: effect of race and gender." *J Appl Physiol* 95(2): 497-503.
- Bennett, W. D., K. L. Zeman and A. M. Jarabek (2008).** "Nasal contribution to breathing and fine particle deposition in children versus adults." *J Toxicol Environ Health A* 71(3): 227-237.
- Biswas, S., V. Verma, J. J. Schauer, F. R. Cassee, et al. (2009).** "Oxidative potential of semi-volatile and non volatile particulate matter (PM) from heavy-duty vehicles retrofitted with emission control technologies." *Environ Sci Technol* 43(10): 3905-3912.
- Boland, S., A. Baeza-Squiban, T. Fournier, O. Houcine, et al. (1999).** "Diesel exhaust particles are taken up by human airway epithelial cells in vitro and alter cytokine production." *Am J Physiol* 276(4 Pt 1): L604-613.
- Boland, S., A. Baeza-Squiban and F. Marano (2001).** "Toxicité respiratoire des particules diesel : les mécanismes cellulaires et moléculaires." *MS. Médecine sciences* 17(5): 596-603.
- Bonneau, B., J. Prudent, N. Popgeorgiev and G. Gillet (2013).** "Non-apoptotic roles of Bcl-2 family: the calcium connection." *Biochim Biophys Acta* 1833(7): 1755-1765.
- Bonvallot, V., A. Baeza-Squiban, A. Baulig, S. Brulant, et al. (2001).** "Organic compounds from diesel exhaust particles elicit a proinflammatory response in human airway epithelial cells and induce cytochrome p450 1A1 expression." *Am J Respir Cell Mol Biol* 25(4): 515-521.
- Brauer, M., C. Avila-Casado, T. I. Fortoul, S. Vedal, et al. (2001).** "Air pollution and retained particles in the lung." *Environ Health Perspect* 109(10): 1039-1043.
- Burdick, A. D., I. D. Ivnitski-Steele, F. T. Lauer and S. W. Burchiel (2006).** "PYK2 mediates anti-apoptotic AKT signaling in response to benzo[a]pyrene diol epoxide in mammary epithelial cells." *Carcinogenesis* 27(11): 2331-2340.
- Carter, J. E., A. Q. Truong-Tran, D. Grosser, L. Ho, et al. (2002).** "Involvement of redox events in caspase activation in

- zinc-depleted airway epithelial cells." *Biochem Biophys Res Commun* 297(4): 1062-1070.
- Carvalho, T. C., J. I. Peters and R. O. Williams, 3rd (2011).** "Influence of particle size on regional lung deposition--what evidence is there?" *Int J Pharm* 406(1-2): 1-10.
- Charrier, J. G. and C. Anastasio (2012).** "On dithiothreitol (DTT) as a measure of oxidative potential for ambient particles: evidence for the importance of soluble transition metals." *Atmos Chem Phys* 12(5): 11317-11350.
- Chaudhuri, D., Y. Sancak, V. K. Mootha and D. E. Clapham (2013).** "MCU encodes the pore conducting mitochondrial calcium currents." *Elife* 2: e00704.
- Cheung, K. L., J. H. Lee, T. O. Khor, T.-Y. Wu, et al. (2014).** "Nrf2 knockout enhances intestinal tumorigenesis in Apcmin/+ mice due to attenuation of anti-oxidative stress pathway while potentiates inflammation." *Molecular Carcinogenesis* 53(1): 77-84.
- Cho, A. K., C. Sioutas, A. H. Miguel, Y. Kumagai, et al. (2005).** "Redox activity of airborne particulate matter at different sites in the Los Angeles Basin." *Environ Res* 99(1): 40-47.
- Choi, J. H., J. S. Kim, Y. C. Kim, Y. S. Kim, et al. (2004).** "Comparative study of PM2.5 - and PM10 - induced oxidative stress in rat lung epithelial cells." *J Vet Sci* 5(1): 11-18.
- Chopra, M., A. M. Dharmarajan, G. Meiss and D. Schrenk (2009).** "Inhibition of UV-C light-induced apoptosis in liver cells by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin." *Toxicol Sci* 111(1): 49-63.
- Chopra, M., M. Gahrs, M. Haben, C. Michels, et al. (2010).** "Inhibition of apoptosis by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin depends on protein biosynthesis." *Cell Biol Toxicol* 26(4): 391-401.
- Chuang, H. C., T. Jones, T. T. Chen and K. BeruBe (2013).** "Cytotoxic effects of incense particles in relation to oxidative stress, the cell cycle and F-actin assembly." *Toxicol Lett* 220(3): 229-237.
- Churg, A. (1996).** "The uptake of mineral particles by pulmonary epithelial cells." *Am J Respir Crit Care Med* 154(4 Pt 1): 1124-1140.
- Churg, A. and M. Brauer (1997).** "Human lung parenchyma retains PM2.5." *Am J Respir Crit Care Med* 155(6): 2109-2111.
- Churg, A., M. Brauer, M. del Carmen Avila-Casado, T. I. Fortoul, et al. (2003).** "Chronic exposure to high levels of particulate air pollution and small airway remodeling." *Environ Health Perspect* 111(5): 714-718.
- CITEPA (2013).** Inventaire des émissions de polluants atmosphériques et de gaz à effet de serre en France - Séries sectorielles et analyses étendues.
- Collège Français des Pathologistes (2011).** La réaction inflammatoire. Les inflammations. . http://lyon-sud.univ-lyon1.fr/servlet/com.univ.collaboratif_utils.LectureFichiergw?ID_FICHER=1320402934250.
- Comhair, S. A., W. Xu, S. Ghosh, F. B. Thunnissen, et al. (2005).** "Superoxide dismutase inactivation in pathophysiology of asthmatic airway remodeling and reactivity." *Am J Pathol* 166(3): 663-674.
- Cummings, B. S., G. R. Kinsey, L. J. Bolchoz and R. G. Schnellmann (2004).** "Identification of caspase-independent apoptosis in epithelial and cancer cells." *J Pharmacol Exp Ther* 310(1): 126-134.
- D'Mello, S. R., C. Y. Kuan, R. A. Flavell and P. Rakic (2000).** "Caspase-3 is required for apoptosis-associated DNA fragmentation but not for cell death in neurons deprived of potassium." *J Neurosci Res* 59(1): 24-31.
- Dagher, Z., G. Garcon, S. Billet, P. Gosset, et al. (2006).** "Activation of different pathways of apoptosis by air pollution particulate matter (PM2.5) in human epithelial lung cells (L132) in culture." *Toxicology* 225(1): 12-24.
- Danielsen, P. H., P. Moller, K. A. Jensen, A. K. Sharma, et al. (2011).** "Oxidative stress, DNA damage, and inflammation induced by ambient air and wood smoke particulate matter

- in human A549 and THP-1 cell lines." *Chem Res Toxicol* 24(2): 168-184.
- Darquenne, C. (2012).** "Aerosol deposition in health and disease." *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv* 25(3): 140-147.
- Davenport, S. J. and G. G. Morgis (1954).** "Air pollution : A bibliography." United States government printing office, Washington.
- Davis, J. M. G. and M.-C. Jaurand (1994).** Cellular and molecular effects of mineral and synthetic dusts and fibres. Berlin New York, Springer-Verlag.
- Deby, C. and G. Deby-Dupont.** "L'oxygène et la vie: tome 1 - Initiation au métabolisme de l'oxygène." from <http://www2.ulg.ac.be/cord/initiation%20au%20met%20oxygene/propriete.html#peroxygni>.
- Delgado-Buenrostro, N. L., V. Freyre-Fonseca, C. M. Cuellar, Y. Sanchez-Perez, et al. (2013).** "Decrease in respiratory function and electron transport chain induced by airborne particulate matter (PM10) exposure in lung mitochondria." *Toxicol Pathol* 41(4): 628-638.
- Deng, X., W. Rui, F. Zhang and W. Ding (2013).** "PM2.5 induces Nrf2-mediated defense mechanisms against oxidative stress by activating PIK3/AKT signaling pathway in human lung alveolar epithelial A549 cells." *Cell Biol Toxicol* 29(3): 143-157.
- depoussierage.fr. (2008).** "www.depoussierage.fr/dossiers_tech_niques/67-depot-des-particules-dans-les-poumons.html."
- Dergham, M., C. Lepers, A. Verdin, S. Billet, et al. (2012).** "Prooxidant and proinflammatory potency of air pollution particulate matter (PM_{2.5}(-)(0).(3)) produced in rural, urban, or industrial surroundings in human bronchial epithelial cells (BEAS-2B)." *Chem Res Toxicol* 25(4): 904-919.
- Di Giampaolo, L., C. Quecchia, C. Schiavone, E. Cavallucci, et al. (2011).** "Environmental pollution and asthma." *Int J Immunopathol Pharmacol* 24(1 Suppl): 31S-38S.
- Diabate, S., B. Bergfeldt, D. Plaumann, C. Ubel, et al. (2011).** "Anti-oxidative and inflammatory responses induced by fly ash particles and carbon black in lung epithelial cells." *Anal Bioanal Chem* 401(10): 3197-3212.
- Diaz-Sanchez, D., A. Tsien, J. Fleming and A. Saxon (1997).** "Combined diesel exhaust particulate and ragweed allergen challenge markedly enhances human in vivo nasal ragweed-specific IgE and skews cytokine production to a T helper cell 2-type pattern." *J Immunol* 158(5): 2406-2413.
- DiStefano, E., A. Eiguren-Fernandez, R. J. Delfino, C. Sioutas, et al. (2009).** "Determination of metal-based hydroxyl radical generating capacity of ambient and diesel exhaust particles." *Inhal Toxicol* 21(9): 731-738.
- Donaldson, K. and P. Borm (2007).** Particle toxicology. Boca Raton, CRC Press/Taylor & Francis Group.
- Ebner, P., Y. Le Moullec and A. Weill (2005).** Pollution par les particules atmosphériques : état des connaissances et perspectives de recherche, La Documentation française.
- Elder, A., R. Gelein, V. Silva, T. Feikert, et al. (2006).** "Translocation of inhaled ultrafine manganese oxide particles to the central nervous system." *Environ Health Perspect* 114(8): 1172-1178.
- Enomoto, Y., K. Orihara, T. Takamasu, A. Matsuda, et al. (2009).** "Tissue remodeling induced by hypersecreted epidermal growth factor and amphiregulin in the airway after an acute asthma attack." *J Allergy Clin Immunol* 124(5): 913-920 e911-917.
- Evelyn, J. (1661).** Fumifugium - Les inconvénients de la propagation des miasmes et des fumées de Londres.
- Farhadi Ghalati, P., E. Keshavarzian, O. Abouali, A. Faramarzi, et al. (2012).** "Numerical analysis of micro- and nano-particle deposition in a realistic human upper airway." *Comput Biol Med* 42(1): 39-49.

- Ferecatu, I., M. C. Borot, C. Bossard, M. Leroux, et al. (2010).** "Polycyclic aromatic hydrocarbon components contribute to the mitochondria-antiapoptotic effect of fine particulate matter on human bronchial epithelial cells via the aryl hydrocarbon receptor." *Part Fibre Toxicol* 7: 18.
- Fernandez Tena, A. and P. Casan Clara (2012).** "Deposition of inhaled particles in the lungs." *Arch Bronconeumol* 48(7): 240-246.
- Friket, J. (1931).** "The cause of the symptoms found in the Meuse Valley during the fog of December, 1930." *Bulletin Academy Royal Medical Belgium* 11683-741.
- Furuyama, A., S. Kanno, T. Kobayashi and S. Hirano (2009).** "Extrapulmonary translocation of intratracheally instilled fine and ultrafine particles via direct and alveolar macrophage-associated routes." *Arch Toxicol* 83(5): 429-437.
- Gaillard, D., C. Plotkowski and E. Puchelle (1992),** "Mucus et protection de la muqueuse respiratoire" Paris Ed. et communication médicales Le Plessis-Robinson Laboratoires Synthelabo France 1992
- Galluzzi, L., K. Blomgren and G. Kroemer (2009).** "Mitochondrial membrane permeabilization in neuronal injury." *Nat Rev Neurosci* 10(7): 481-494.
- Galluzzi, L., I. Vitale, J. M. Abrams, E. S. Alnemri, et al. (2012).** "Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012." *Cell Death Differ* 19(1): 107-120.
- Gan, W. Q., J. M. FitzGerald, C. Carlsten, M. Sadatsafavi, et al. (2013).** "Associations of ambient air pollution with chronic obstructive pulmonary disease hospitalization and mortality." *Am J Respir Crit Care Med* 187(7): 721-727.
- Ganan-Gomez, I., Y. Wei, H. Yang, M. C. Boyano-Adanez, et al. (2013).** "Oncogenic functions of the transcription factor Nrf2." *Free Radic Biol Med* 65: 750-764.
- Garcon, G., F. Zerimech, M. Hannotiaux, P. Gosset, et al. (2001).** "Antioxidant defense disruption by polycyclic aromatic hydrocarbons-coated onto Fe(2)O(3) particles in human lung cells (A549)." *Toxicology* 166(3): 129-137.
- Gehr, P. (2010).** Particle-lung interactions. New York, Informa Healthcare.
- Gilmour, M. I., M. Daniels, R. C. McCrillis, D. Winsett, et al. (2001).** "Air pollutant-enhanced respiratory disease in experimental animals." *Environ Health Perspect* 109 Suppl 4: 619-622.
- Girodet, P. O., A. Ozier, I. Bara, J. M. Tunon de Lara, et al. (2011).** "Airway remodeling in asthma: new mechanisms and potential for pharmacological intervention." *Pharmacol Ther* 130(3): 325-337.
- Gobe, G. and D. Crane (2010).** "Mitochondria, reactive oxygen species and cadmium toxicity in the kidney." *Toxicol Lett* 198(1): 49-55.
- Greenburg, L., F. Field, J. I. Reed and M. Glasser (1967).** "Air pollution and cancer mortality. Study on Staten Island (Borough of Richmond), New York." *Arch Environ Health* 15(3): 356-361.
- Gualtieri, M., J. Ovrevik, S. Mollerup, N. Asare, et al. (2011).** "Airborne urban particles (Milan winter-PM2.5) cause mitotic arrest and cell death: Effects on DNA, mitochondria, AhR binding and spindle organization." *Mutat Res* 713(1-2): 18-31.
- Hail, N., Jr., B. Z. Carter, M. Konopleva and M. Andreeff (2006).** "Apoptosis effector mechanisms: a requiem performed in different keys." *Apoptosis* 11(6): 889-904.
- Hajnoczky, G., G. Csordas, S. Das, C. Garcia-Perez, et al. (2006).** "Mitochondrial calcium signalling and cell death: approaches for assessing the role of mitochondrial Ca²⁺ uptake in apoptosis." *Cell Calcium* 40(5-6): 553-560.
- Haldane, J. S. (1931).** "Atmospheric Pollution and Fogs." *Br Med J* 1(3660): 366-367.

- Halliday, E. C. (1961).** "A historical review of atmospheric pollution." *Monogr Ser World Health Organ* 46: 9-37.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000).** "The hallmarks of cancer." *Cell* 100(1): 57-70.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2011).** "Hallmarks of cancer: the next generation." *Cell* 144(5): 646-674.
- Hao, Y., J. Ren, C. Liu, H. Li, et al. (2013).** "Zinc Protects Human Kidney Cells from Depleted Uranium-induced Apoptosis." *Basic Clin Pharmacol Toxicol*.
- Hayes, J. D., M. O. Kelleher and I. M. Eggleston (2008).** "The cancer chemopreventive actions of phytochemicals derived from glucosinolates." *Eur J Nutr* 47 Suppl 2: 73-88.
- Hayes, J. D. and D. J. Pulford (1995).** "The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance." *Crit Rev Biochem Mol Biol* 30(6): 445-600.
- Heinrich, J. and H. E. Wichmann (2004).** "Traffic related pollutants in Europe and their effect on allergic disease." *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 4(5): 341-348.
- Helfand, W. H., J. Lazarus and P. Theerman (2001).** "Donora, Pennsylvania: an environmental disaster of the 20th century." *Am J Public Health* 91(4): 553.
- Heyder, J. (2004).** "Deposition of inhaled particles in the human respiratory tract and consequences for regional targeting in respiratory drug delivery." *Proc Am Thorac Soc* 1(4): 315-320.
- Higgins, I. T. (1976).** "Epidemiological evidence on the carcinogenic risk of air pollution." *IARC Sci Publ*(13): 41-52.
- Higgins, T. S. and D. D. Reh (2012).** "Environmental pollutants and allergic rhinitis." *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 20(3): 209-214.
- Hiura, T. S., M. P. Kaszubowski, N. Li and A. E. Nel (1999).** "Chemicals in diesel exhaust particles generate reactive oxygen radicals and induce apoptosis in macrophages." *J Immunol* 163(10): 5582-5591.
- Horemans, B., C. Van Holsbeke, W. Vos, L. Darchuk, et al. (2012).** "Particle deposition in airways of chronic respiratory patients exposed to an urban aerosol." *Environ Sci Technol* 46(21): 12162-12169.
- Hou, L., S. Wang, C. Dou, X. Zhang, et al. (2012).** "Air pollution exposure and telomere length in highly exposed subjects in Beijing, China: a repeated-measure study." *Environ Int* 48: 71-77.
- Hourieux, C. (2010).** "Oncongènes et anti-oncogènes <http://fmc.med.univ-tours.fr/Pages/Recherche/Cours/CH-oncogenes-antioncogenes.pdf>."
- Hung, H. S., W. J. Wu, Y. W. Cheng, T. C. Wu, et al. (2007).** "Association of cooking oil fumes exposure with lung cancer: involvement of inhibitor of apoptosis proteins in cell survival and proliferation in vitro." *Mutat Res* 628(2): 107-116.
- IARC (2013).** IARC: Outdoor air pollution a leading environmental cause of cancer deaths, International Agency for Research on Cancer. PRESS RELEASE N° 221.
- INC (2011).** Cancer du poumon, bilan initial. collection Recommandations et référentiels, Institut National du Cancer.
- INERIS (2006).** *Éléments traces métalliques - Guide méthodologique : Recommandations pour la modélisation des transferts des éléments traces métalliques dans les sols et les eaux souterraines*, Institut National Environnement Industriel et Risques.
- INRS (2005).** *Particules ultrafines et santé au travail 2-Sources et caractérisation de l'exposition*, Institut National de Recherche et de Sécurité.
- INVS Extrapol (2006).** *Effets à long terme de la pollution atmosphérique : études européennes*. 29 - Septembre.
- Irigoin, F., N. M. Inada, M. P. Fernandes, L. Piacenza, et al. (2009).** "Mitochondrial calcium overload

- triggers complement-dependent superoxide-mediated programmed cell death in *Trypanosoma cruzi*." *Biochem J* 418(3): 595-604.
- Itoh, K., N. Wakabayashi, Y. Katoh, T. Ishii, et al. (1999).** "Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain." *Genes Dev* 13(1): 76-86.
- Jacquemin, B., T. Schikowski, A. E. Carsin, A. Hansell, et al. (2012).** "The role of air pollution in adult-onset asthma: a review of the current evidence." *Semin Respir Crit Care Med* 33(6): 606-619.
- Jeffery, P. K. (2001).** "Remodeling in asthma and chronic obstructive lung disease." *Am J Respir Crit Care Med* 164(10 Pt 2): S28-38.
- Jeng, H. A. (2010).** "Chemical composition of ambient particulate matter and redox activity." *Environ Monit Assess* 169(1-4): 597-606.
- Kar, P., T. Chakraborti, K. Samanta and S. Chakraborti (2009).** "mu-Calpain mediated cleavage of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger in isolated mitochondria under A23187 induced Ca²⁺ stimulation." *Arch Biochem Biophys* 482(1-2): 66-76.
- Katsouyanni, K., J. M. Samet, H. R. Anderson, R. Atkinson, et al. (2009).** "Air pollution and health: a European and North American approach (APHENA)." *Res Rep Health Eff Inst*(142): 5-90.
- Katsouyanni, K., D. Zmirou, C. Spix, J. Sunyer, et al. (1997).** "Short-term effects of air pollution on health: a European approach using epidemiologic time series data. The APHEA Project. Air Pollution Health Effects--A European Approach." *Public Health Rev* 25(1): 7-18; discussion 19-28.
- Kerr, K. M. (2001).** "Pulmonary preinvasive neoplasia." *J Clin Pathol* 54(4): 257-271.
- Kim, B. J. and S. J. Hong (2012).** "Ambient air pollution and allergic diseases in children." *Korean J Pediatr* 55(6): 185-192.
- Kim, C. S. and S. C. Hu (1998).** "Regional deposition of inhaled particles in human lungs: comparison between men and women." *J Appl Physiol* 84(6): 1834-1844.
- Kim, C. S. and T. C. Kang (1997).** "Comparative measurement of lung deposition of inhaled fine particles in normal subjects and patients with obstructive airway disease." *Am J Respir Crit Care Med* 155(3): 899-905.
- Kim, K. H., S. A. Jahan, E. Kabir and R. J. Brown (2013).** "A review of airborne polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their human health effects." *Environ Int* 60C: 71-80.
- Kobayashi, A., M. I. Kang, H. Okawa, M. Ohtsuji, et al. (2004).** "Oxidative stress sensor Keap1 functions as an adaptor for Cul3-based E3 ligase to regulate proteasomal degradation of Nrf2." *Mol Cell Biol* 24(16): 7130-7139.
- Kode, A., S. Rajendrasozhan, S. Caito, S. R. Yang, et al. (2008).** "Resveratrol induces glutathione synthesis by activation of Nrf2 and protects against cigarette smoke-mediated oxidative stress in human lung epithelial cells." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 294(3): L478-488.
- Koike, E. and T. Kobayashi (2006).** "Chemical and biological oxidative effects of carbon black nanoparticles." *Chemosphere* 65(6): 946-951.
- Kontargiris, E., A. Vadalouka, V. Ragos and V. Kalfakakou (2012).** "Zinc inhibits apoptosis and maintains NEP downregulation, induced by ropivacaine, in HaCaT cells." *Biol Trace Elem Res* 150(1-3): 460-466.
- Kouassi, K. S., S. Billet, G. Garcon, A. Verdin, et al. (2010).** "Oxidative damage induced in A549 cells by physically and chemically characterized air particulate matter (PM_{2.5}) collected in Abidjan, Cote d'Ivoire." *J Appl Toxicol* 30(4): 310-320.
- Kroemer, G., L. Galluzzi, P. Vandenabeele, J. Abrams, et al. (2009).** "Classification of cell death:

- recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009." *Cell Death Differ* 16(1): 3-11.
- Lantuejoul, S., D. Salameire, C. Salon and E. Brambilla (2009).** "Pulmonary preneoplasia--sequential molecular carcinogenetic events." *Histopathology* 54(1): 43-54.
- Laser, H. (1955).** "Peroxidatic activity of catalase." *Biochem J* 61(1): 122-127.
- Lee, S. Y., Y. S. Chang and S. H. Cho (2013).** "Allergic diseases and air pollution." *Asia Pac Allergy* 3(3): 145-154.
- Lelieveld, J., H. Berresheim, S. Borrmann, P. J. Crutzen, et al. (2002).** "Global air pollution crossroads over the Mediterranean." *Science* 298(5594): 794-799.
- Li, H., Q. D. Li, M. S. Wang, F. J. Li, et al. (2013).** "Smoking and air pollution exposure and lung cancer mortality in Zhaoyuan County." *Int J Hyg Environ Health* 216(1): 63-70.
- Li, N., M. Hao, R. F. Phalen, W. C. Hinds, et al. (2003a).** "Particulate air pollutants and asthma. A paradigm for the role of oxidative stress in PM-induced adverse health effects." *Clin Immunol* 109(3): 250-265.
- Li, N., C. Sioutas, A. Cho, D. Schmitz, et al. (2003b).** "Ultrafine particulate pollutants induce oxidative stress and mitochondrial damage." *Environ Health Perspect* 111(4): 455-460.
- Li, N., M. Wang, T. D. Oberley, J. M. Sempf, et al. (2002).** "Comparison of the pro-oxidative and proinflammatory effects of organic diesel exhaust particle chemicals in bronchial epithelial cells and macrophages." *J Immunol* 169(8): 4531-4541.
- Lindgren, A., E. Stroh, P. Montnemery, U. Nihlen, et al. (2009).** "Traffic-related air pollution associated with prevalence of asthma and COPD/chronic bronchitis. A cross-sectional study in Southern Sweden." *Int J Health Geogr* 8: 2.
- Ling, S. H. and S. F. van Eeden (2009).** "Particulate matter air pollution exposure: role in the development and exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease." *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 4: 233-243.
- Liu, C. and T. E. Hermann (1978).** "Characterization of ionomycin as a calcium ionophore." *J Biol Chem* 253(17): 5892-5894.
- Liu, P. L., Y. L. Chen, Y. H. Chen, S. J. Lin, et al. (2005).** "Wood smoke extract induces oxidative stress-mediated caspase-independent apoptosis in human lung endothelial cells: role of AIF and EndoG." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 289(5): L739-749.
- Loignon, M., W. Miao, L. Hu, A. Bier, et al. (2009).** "Cul3 overexpression depletes Nrf2 in breast cancer and is associated with sensitivity to carcinogens, to oxidative stress, and to chemotherapy." *Mol Cancer Ther* 8(8): 2432-2440.
- Londahl, J., E. Swietlicki, J. Rissler, A. Bengtsson, et al. (2012).** "Experimental determination of the respiratory tract deposition of diesel combustion particles in patients with chronic obstructive pulmonary disease." *Part Fibre Toxicol* 9: 30.
- Lopatniuk, P. and J. M. Witkowski (2011).** "Conventional calpains and programmed cell death." *Acta Biochim Pol* 58(3): 287-296.
- Lu, T., Y. Xu, M. T. Mericle and R. L. Mellgren (2002).** "Participation of the conventional calpains in apoptosis." *Biochim Biophys Acta* 1590(1-3): 16-26.
- Luo, J. (2010).** "Lithium-mediated protection against ethanol neurotoxicity." *Front Neurosci* 4: 41.
- MacFarlane, M. and A. C. Williams (2004).** "Apoptosis and disease: a life or death decision." *EMBO Rep* 5(7): 674-678.
- MacKenzie, S. H. and A. C. Clark (2012).** "Death by caspase dimerization." *Adv Exp Med Biol* 747: 55-73.
- Madesh, M. and G. Hajnoczky (2001).** "VDAC-dependent permeabilization of the outer mitochondrial membrane by superoxide induces rapid and massive cytochrome c release." *J Cell Biol* 155(6): 1003-1015.
- Mahoney, L. E. (1976).** "Air pollution and respiratory mortality in Los Angeles." *West J Med* 124(2): 159-166.

- Manzl, C., J. Enrich, H. Ebner, R. Dallinger, et al. (2004).** "Copper-induced formation of reactive oxygen species causes cell death and disruption of calcium homeostasis in trout hepatocytes." *Toxicology* 196(1-2): 57-64.
- Menconi, M. J., W. Wei, H. Yang, C. J. Wray, et al. (2004).** "Treatment of cultured myotubes with the calcium ionophore A23187 increases proteasome activity via a CaMK II-caspase-calpain-dependent mechanism." *Surgery* 136(2): 135-142.
- Miao, W., L. Hu, P. J. Scrivens and G. Batist (2005).** "Transcriptional regulation of NF-E2 p45-related factor (NRF2) expression by the aryl hydrocarbon receptor-xenobiotic response element signaling pathway: direct cross-talk between phase I and II drug-metabolizing enzymes." *J Biol Chem* 280(21): 20340-20348.
- Michael, S., M. Montag and W. Dott (2013).** "Pro-inflammatory effects and oxidative stress in lung macrophages and epithelial cells induced by ambient particulate matter." *Environ Pollut* 183: 19-29.
- Mills, C. A. (1951).** "Nontuberculous diseases of the chest and related matters: implications of air pollution in chronic respiratory and cardiac disorders." *Trans Annu Meet Natl Tuberc Assoc* 47: 284-289.
- Mitsuishi, Y., H. Motohashi and M. Yamamoto (2012).** "The Keap1-Nrf2 system in cancers: stress response and anabolic metabolism." *Front Oncol* 2: 200.
- Moller, W., D. M. Brown, W. G. Kreyling and V. Stone (2005).** "Ultrafine particles cause cytoskeletal dysfunctions in macrophages: role of intracellular calcium." *Part Fibre Toxicol* 2: 7.
- Moller, W., K. Felten, K. Sommerer, G. Scheuch, et al. (2008).** "Deposition, retention, and translocation of ultrafine particles from the central airways and lung periphery." *Am J Respir Crit Care Med* 177(4): 426-432.
- Momeni, H. R. (2011).** "Role of calpain in apoptosis." *Cell J* 13(2): 65-72.
- Morgenstern, V., A. Zutavern, J. Cyrus, I. Brockow, et al. (2008).** "Atopic diseases, allergic sensitization, and exposure to traffic-related air pollution in children." *Am J Respir Crit Care Med* 177(12): 1331-1337.
- Morse, D. and A. M. Choi (2005).** "Heme oxygenase-1: from bench to bedside." *Am J Respir Crit Care Med* 172(6): 660-670.
- Mukherjee, J. J., S. Kumar, R. Gocinski and J. Williams (2011).** "Phenolic fraction of tobacco smoke inhibits BPDE-induced apoptosis response and potentiates cell transformation: role of attenuation of p53 response." *Chem Res Toxicol* 24(5): 698-705.
- Mutlu, E. A., P. A. Engen, S. Soberanes, D. Urich, et al. (2011).** "Particulate matter air pollution causes oxidant-mediated increase in gut permeability in mice." *Part Fibre Toxicol* 8: 19.
- Nawrot, T. S., L. Perez, N. Kunzli, E. Munters, et al. (2011).** "Public health importance of triggers of myocardial infarction: a comparative risk assessment." *Lancet* 377(9767): 732-740.
- Nemery, B., P. H. Hoet and A. Nemmar (2001).** "The Meuse Valley fog of 1930: an air pollution disaster." *Lancet* 357(9257): 704-708.
- Nguyen, P. M., M. S. Park, M. Chow, J. H. Chang, et al. (2010).** "Benzo[a]pyrene increases the Nrf2 content by downregulating the Keap1 message." *Toxicol Sci* 116(2): 549-561.
- Niestroy, J., A. Barbara, K. Herbst, S. Rode, et al. (2011).** "Single and concerted effects of benzo[a]pyrene and flavonoids on the AhR and Nrf2-pathway in the human colon carcinoma cell line Caco-2." *Toxicol In Vitro* 25(3): 671-683.
- Oberdorster, G., E. Oberdorster and J. Oberdorster (2005).** "Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles." *Environ Health Perspect* 113(7): 823-839.
- Oberdorster, G., Z. Sharp, V. Atudorei, A. Elder, et al. (2002).**

- "Extrapulmonary translocation of ultrafine carbon particles following whole-body inhalation exposure of rats." *J Toxicol Environ Health A* 65(20): 1531-1543.
- Ohkoshi, A., T. Suzuki, M. Ono, T. Kobayashi, et al. (2013).** "Roles of Keap1-Nrf2 system in upper aerodigestive tract carcinogenesis." *Cancer Prev Res (Phila)* 6(2): 149-159.
- Okazaki, T., Y. Kato, T. Mochizuki, M. Tashima, et al. (1988).** "Staurosporine, a novel protein kinase inhibitor, enhances HL-60-cell differentiation induced by various compounds." *Exp Hematol* 16(1): 42-48.
- Omiecinski, C. J., J. P. Vanden Heuvel, G. H. Perdew and J. M. Peters (2011).** "Xenobiotic metabolism, disposition, and regulation by receptors: from biochemical phenomenon to predictors of major toxicities." *Toxicol Sci* 120 Suppl 1: S49-75.
- OMS (1984).** Evaluation de l'exposition aux particules atmosphériques dans les ambiances de travail.
- OMS (2006).** Lignes directrices OMS relatives à la qualité de l'air : particules, ozone, dioxyde d'azote et dioxyde de soufre. Mise à jour mondiale 2005.
- OMS (2012).** "Bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO)." Aide-mémoire N°315(Novembre 2012).
- OMS. (2013).** "Asthme, <http://www.who.int/topics/asthma/fr/>."
- Oravisjarvi, K., M. Pietikainen, J. Ruuskanen, A. Rautio, et al. (2011).** "Effects of physical activity on the deposition of traffic-related particles into the human lungs in silico." *Sci Total Environ* 409(21): 4511-4518.
- Orrenius, S., P. Nicotera and B. Zhivotovsky (2011).** "Cell death mechanisms and their implications in toxicology." *Toxicol Sci* 119(1): 3-19.
- Orrenius, S., B. Zhivotovsky and P. Nicotera (2003).** "Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link." *Nat Rev Mol Cell Biol* 4(7): 552-565.
- Ostro, B., R. Broadwin, S. Green, W. Y. Feng, et al. (2006).** "Fine particulate air pollution and mortality in nine California counties: results from CALFINE." *Environ Health Perspect* 114(1): 29-33.
- Ow, Y. P., D. R. Green, Z. Hao and T. W. Mak (2008).** "Cytochrome c: functions beyond respiration." *Nat Rev Mol Cell Biol* 9(7): 532-542.
- Pernelet-Joly, V. (2008).** "Particules atmosphériques : composition chimique et effets sanitaires Revue d'analyses critiques de publications internationales - Editorial : La composition chimique des particules atmosphériques : quels composants participent à la nocivité des particules ?" *Pollution atmosphérique - EXTRAPOL* 198-199 - N°35.
- Perrone, M. G., M. Gualtieri, V. Consonni, L. Ferrero, et al. (2013).** "Particle size, chemical composition, seasons of the year and urban, rural or remote site origins as determinants of biological effects of particulate matter on pulmonary cells." *Environ Pollut* 176: 215-227.
- Phalen, R. F., L. B. Mendez and M. J. Oldham (2010).** "New developments in aerosol dosimetry." *Inhal Toxicol* 22 Suppl 2: 6-14.
- Pietrodangelo, A., S. Pareti and C. Perrino (2013).** "Improved identification of transition metals in airborne aerosols by SEM-EDX combined backscattered and secondary electron microanalysis." *Environ Sci Pollut Res Int*.
- Pincemail, J., K. Bonjean, K. Cayeux and J.-O. Defraigne (2002).** "Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante." *Nutrition Clinique et Métabolisme* 16(4): 233-239.
- Polosa, R. and S. Salvi (1999).** "Particulate air pollution from motor vehicles: a putative proallergic hazard?" *Can Respir J* 6(5): 436-441.
- Pope, C. A., 3rd, R. T. Burnett, M. J. Thun, E. E. Calle, et al. (2002).** "Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long-term exposure to fine particulate air pollution." *JAMA* 287(9): 1132-1141.
- Queiroga, C. S., A. S. Almeida, P. M. Alves, C. Brenner, et al. (2011).** "Carbon

- monoxide prevents hepatic mitochondrial membrane permeabilization." *BMC Cell Biol* 12: 10.
- Quisefit, J. P. and A. Gaudichet (1998).** "Prélèvement des aérosols atmosphériques et analyses inorganiques." *ANALUSIS MAGAZINE* 26: M21-27.
- Raaschou-Nielsen, O., Z. J. Andersen, R. Beelen, E. Samoli, et al. (2013).** "Air pollution and lung cancer incidence in 17 European cohorts: prospective analyses from the European Study of Cohorts for Air Pollution Effects (ESCAPE)." *Lancet Oncol* 14(9): 813-822.
- Raaschou-Nielsen, O., Z. J. Andersen, M. Hvidberg, S. S. Jensen, et al. (2011).** "Air pollution from traffic and cancer incidence: a Danish cohort study." *Environ Health* 10: 67.
- Rage, E., V. Siroux, N. Kunzli, I. Pin, et al. (2009).** "Air pollution and asthma severity in adults." *Occup Environ Med* 66(3): 182-188.
- Rahman, I., S. K. Biswas and A. Kode (2006).** "Oxidant and antioxidant balance in the airways and airway diseases." *Eur J Pharmacol* 533(1-3): 222-239.
- Ramos-Gomez, M., M. K. Kwak, P. M. Dolan, K. Itoh, et al. (2001).** "Sensitivity to carcinogenesis is increased and chemoprotective efficacy of enzyme inducers is lost in *nrf2* transcription factor-deficient mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(6): 3410-3415.
- Rana, S. V. (2008).** "Metals and apoptosis: recent developments." *J Trace Elem Med Biol* 22(4): 262-284.
- Ray, S. K., M. Fidan, M. W. Nowak, G. G. Wilford, et al. (2000).** "Oxidative stress and Ca^{2+} influx upregulate calpain and induce apoptosis in PC12 cells." *Brain Res* 852(2): 326-334.
- Reed, P. W. and H. A. Lardy (1972).** "A23187: a divalent cation ionophore." *J Biol Chem* 247(21): 6970-6977.
- Registre des Cancers-Observatoire régional de la santé Poitou-Charentes. (2013).** "<http://medphar.univ-poitiers.fr/registre-cancers-poitou-charentes/documentsregistre/fichepoumon.pdf>."
- Respire. (2010).** "www.respire-asso.org/la-legislation-sur-lair."
- Roth, C., W. G. Kreyling, G. Sheuch, B. Busch, et al. (1997).** "Deposition and clearance of fine particles in the human respiratory tract." *Ann Occup Hyg* 41(Sup1): 503-508.
- Rubio, V., M. Valverde and E. Rojas (2010).** "Effects of atmospheric pollutants on the Nrf2 survival pathway." *Environ Sci Pollut Res Int* 17(2): 369-382.
- Rumelhard, M., K. Ramgolam, F. Auger, A. C. Dazy, et al. (2007a).** "Effects of PM2.5 components in the release of amphiregulin by human airway epithelial cells." *Toxicol Lett* 168(2): 155-164.
- Rumelhard, M., K. Ramgolam, R. Hamel, F. Marano, et al. (2007b).** "Expression and role of EGFR ligands induced in airway cells by PM2.5 and its components." *Eur Respir J* 30(6): 1064-1073.
- Saint-Georges, F., I. Abbas, S. Billet, A. Verdin, et al. (2008).** "Gene expression induction of volatile organic compound and/or polycyclic aromatic hydrocarbon-metabolizing enzymes in isolated human alveolar macrophages in response to airborne particulate matter (PM2.5)." *Toxicology* 244(2-3): 220-230.
- Saneyoshi, T. and Y. Hayashi (2012).** "The Ca^{2+} and Rho GTPase signaling pathways underlying activity-dependent actin remodeling at dendritic spines." *Cytoskeleton (Hoboken)* 69(8): 545-554.
- Schwartz, J. (1994).** "What are people dying of on high air pollution days?" *Environ Res* 64(1): 26-35.
- Schwartz, J. (2001).** "Is there harvesting in the association of airborne particles with daily deaths and hospital admissions?" *Epidemiology* 12(1): 55-61.
- Schwartz, J. (2004).** "Air pollution and children's health." *Pediatrics* 113(4 Suppl): 1037-1043.
- Schwartz, J., D. Slater, T. V. Larson, W. E. Pierson, et al. (1993).** "Particulate

- air pollution and hospital emergency room visits for asthma in Seattle." *Am Rev Respir Dis* 147(4): 826-831.
- Seaton, A. (2011).** "Historical perspective fifty years of particles: a personal retrospect." *Part Fibre Toxicol* 8: 35.
- Sekhar, K. R., G. Rachakonda and M. L. Freeman (2010).** "Cysteine-based regulation of the CUL3 adaptor protein Keap1." *Toxicol Appl Pharmacol* 244(1): 21-26.
- Senft, A. P., T. P. Dalton, D. W. Nebert, M. B. Genter, et al. (2002).** "Mitochondrial reactive oxygen production is dependent on the aromatic hydrocarbon receptor." *Free Radic Biol Med* 33(9): 1268-1278.
- Sevrioukova, I. F. (2009).** "Redox-linked conformational dynamics in apoptosis-inducing factor." *J Mol Biol* 390(5): 924-938.
- Shen, H. and C. Anastasio (2012).** "A Comparison of Hydroxyl Radical and Hydrogen Peroxide Generation in Ambient Particle Extracts and Laboratory Metal Solutions." *Atmos Environ* (1994) 46: 665-668.
- Sinha, K., J. Das, P. B. Pal and P. C. Sil (2013).** "Oxidative stress: the mitochondria-dependent and mitochondria-independent pathways of apoptosis." *Arch Toxicol* 87(7): 1157-1180.
- Sleigh, M. A. (1983).** "Ciliary function in transport of mucus." *Eur J Respir Dis Suppl* 128 (Pt 1): 287-292.
- Smaili, S. S., G. J. Pereira, M. M. Costa, K. K. Rocha, et al. (2013).** "The role of calcium stores in apoptosis and autophagy." *Curr Mol Med* 13(2): 252-265.
- Société française de pathologie (2012).** *Classification 2014 des carcinomes bronchopulmonaires : nouveautés et implications cliniques.* HISTOSEMINAIRE CARREFOUR PATHOLOGIE 2012.
- Sorimachi, H., S. Ishiura and K. Suzuki (1997).** "Structure and physiological function of calpains." *Biochem J* 328 (Pt 3): 721-732.
- Sporn, M. B. and K. T. Liby (2012).** "NRF2 and cancer: the good, the bad and the importance of context." *Nat Rev Cancer* 12(8): 564-571.
- Stegeman, J. J. and A. R. Solow (2002).** "A Look Back at the London Smog of 1952 and the Half Century Since; A Half Century Later: Recollections of the London Fog " *Environ Health Perspect (Archives)* dèc 2002.
- Suh, D. H., M. K. Kim, H. S. Kim, H. H. Chung, et al. (2013).** "Mitochondrial permeability transition pore as a selective target for anti-cancer therapy." *Front Oncol* 3: 41.
- Sullivan, J. P., J. D. Minna and J. W. Shay (2010).** "Evidence for self-renewing lung cancer stem cells and their implications in tumor initiation, progression, and targeted therapy." *Cancer Metastasis Rev* 29(1): 61-72.
- Surh, Y. J. (2003).** "Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals." *Nat Rev Cancer* 3(10): 768-780.
- Swissweb santé publique.** "<http://www.prevention.ch/>."
- Szuster-Ciesielska, A., K. Plewka, J. Daniluk and M. Kandefer-Szerszen (2008).** "Zinc inhibits ethanol-induced HepG2 cell apoptosis." *Toxicol Appl Pharmacol* 229(1): 1-9.
- Tanaka, T., M. Kurabayashi, Y. Aihara, Y. Ohyama, et al. (2000).** "Inducible expression of manganese superoxide dismutase by phorbol 12-myristate 13-acetate is mediated by Sp1 in endothelial cells." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20(2): 392-401.
- Tao, F., B. Gonzalez-Flecha and L. Kobzik (2003).** "Reactive oxygen species in pulmonary inflammation by ambient particulates." *Free Radic Biol Med* 35(4): 327-340.
- Taylor, R. C., S. P. Cullen and S. J. Martin (2008).** "Apoptosis: controlled demolition at the cellular level." *Nat Rev Mol Cell Biol* 9(3): 231-241.
- Teke, Z., F. Adali, E. C. Kelten, Y. Enli, et al. (2011).** "Mannitol attenuates acute lung injury induced by infrarenal aortic occlusion-reperfusion in rats." *Surg Today* 41(7): 955-965.
- Tekpli, X., J. A. Holme, O. Sergent and D. Lagadic-Gossman (2011).** "Importance of plasma membrane dynamics in chemical-induced

- carcinogenesis." *Recent Pat Anticancer Drug Discov* 6(3): 347-353.
- Tekpli, X., J. A. Holme, O. Sergent and D. Lagadic-Gossmann (2013).** "Role for membrane remodeling in cell death: Implication for health and disease" *Toxicology* 304: 141-157.
- Teranishi, M., T. Toyooka, T. Ohura, S. Masuda, et al. (2010).** "Benzo[a]pyrene exposed to solar-simulated light inhibits apoptosis and augments carcinogenicity." *Chem Biol Interact* 185(1): 4-11.
- Thibert, C. and J. Fombonne (2010).** "Dependence receptors: mechanisms of an announced death." *Cell Cycle* 9(11): 2085-2091.
- To, T., S. Shen, E. G. Atenafu, J. Guan, et al. (2013).** "The air quality health index and asthma morbidity: a population-based study." *Environ Health Perspect* 121(1): 46-52.
- Travis, W. D., E. Brambilla and G. J. Riely (2013).** "New pathologic classification of lung cancer: relevance for clinical practice and clinical trials." *J Clin Oncol* 31(8): 992-1001.
- Truong-Tran, A. Q., J. Carter, R. E. Ruffin and P. D. Zalewski (2001).** "The role of zinc in caspase activation and apoptotic cell death." *Biometals* 14(3-4): 315-330.
- TSI (2013).** Health-based particle-size-selective sampling.
- UMPC. (2006).** "<http://www.edu.upmc.fr/histologie/>"
- Union Européenne (2008).** Directive 2008/50/CE du Parlement Européen et du Conseil du 21 mai 2008 concernant la qualité de l'air ambiant et un air pur pour l'Europe. *Journal officiel de l'Union Européenne*.
- Upadhyay, D., V. Panduri, A. Ghio and D. W. Kamp (2003).** "Particulate matter induces alveolar epithelial cell DNA damage and apoptosis: role of free radicals and the mitochondria." *Am J Respir Cell Mol Biol* 29(2): 180-187.
- Val, S., C. Liousse, E. H. Doumbia, C. Galy-Lacaux, et al. (2013).** "Physico-chemical characterization of African urban aerosols (Bamako in Mali and Dakar in Senegal) and their toxic effects in human bronchial epithelial cells: description of a worrying situation." *Part Fibre Toxicol* 10(1): 10.
- Valavanidis, A., K. Fiotakis and T. Vlachogianni (2008).** "Airborne particulate matter and human health: toxicological assessment and importance of size and composition of particles for oxidative damage and carcinogenic mechanisms." *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev* 26(4): 339-362.
- Valavanidis, A., T. Vlachogianni, K. Fiotakis and S. Loridas (2013).** "Pulmonary oxidative stress, inflammation and cancer: respirable particulate matter, fibrous dusts and ozone as major causes of lung carcinogenesis through reactive oxygen species mechanisms." *Int J Environ Res Public Health* 10(9): 3886-3907.
- van Grevenynghe, J., L. Sparfel, M. Le Vee, D. Gilot, et al. (2004).** "Cytochrome P450-dependent toxicity of environmental polycyclic aromatic hydrocarbons towards human macrophages." *Biochem Biophys Res Commun* 317(3): 708-716.
- Vinceti, M., K. J. Rothman, C. M. Crespi, A. Sterni, et al. (2012).** "Leukemia risk in children exposed to benzene and PM10 from vehicular traffic: a case-control study in an Italian population." *Eur J Epidemiol* 27(10): 781-790.
- Vranic, S., N. Boggetto, V. Contremoulins, S. Mornet, et al. (2013).** "Deciphering the mechanisms of cellular uptake of engineered nanoparticles by accurate evaluation of internalization using imaging flow cytometry." *Part Fibre Toxicol* 10: 2.
- Wang, L., X. He, G. D. Szklarz, Y. Bi, et al. (2013).** "The aryl hydrocarbon receptor interacts with nuclear factor erythroid 2-related factor 2 to mediate induction of NAD(P)H:quinoneoxidoreductase 1 by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-

- dioxin." *Arch Biochem Biophys* 537(1): 31-38.
- Wang, Q., W. Luo, W. Zhang, Z. Dai, et al. (2007).** "Iron supplementation protects against lead-induced apoptosis through MAPK pathway in weanling rat cortex." *Neurotoxicology* 28(4): 850-859.
- Wang, T., E. T. Chiang, L. Moreno-Vinasco, G. D. Lang, et al. (2010).** "Particulate matter disrupts human lung endothelial barrier integrity via ROS- and p38 MAPK-dependent pathways." *Am J Respir Cell Mol Biol* 42(4): 442-449.
- Wang, T., L. Wang, L. Moreno-Vinasco, G. D. Lang, et al. (2012).** "Particulate matter air pollution disrupts endothelial cell barrier via calpain-mediated tight junction protein degradation." *Part Fibre Toxicol* 9: 35.
- Watterson, T. L., B. Hamilton, R. Martin and R. A. Coulombe, Jr. (2009).** "Urban particulate matter causes ER stress and the unfolded protein response in human lung cells." *Toxicol Sci* 112(1): 111-122.
- Wegesser, T. C. and J. A. Last (2008).** "Lung response to coarse PM: bioassay in mice." *Toxicol Appl Pharmacol* 230(2): 159-166.
- Xi, J., J. Kim, X. A. Si and Y. Zhou (2013).** "Hygroscopic aerosol deposition in the human upper respiratory tract under various thermo-humidity conditions." *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng* 48(14): 1790-1805.
- Xia, T., P. Korge, J. N. Weiss, N. Li, et al. (2004).** "Quinones and aromatic chemical compounds in particulate matter induce mitochondrial dysfunction: implications for ultrafine particle toxicity." *Environ Health Perspect* 112(14): 1347-1358.
- Xu, C., M. T. Huang, G. Shen, X. Yuan, et al. (2006).** "Inhibition of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced skin tumorigenesis in C57BL/6 mice by sulforaphane is mediated by nuclear factor E2-related factor 2." *Cancer Res* 66(16): 8293-8296.
- Yanagi, Y., J. V. Assuncao and L. V. Barrozo (2012).** "The impact of atmospheric particulate matter on cancer incidence and mortality in the city of Sao Paulo, Brazil." *Cad Saude Publica* 28(9): 1737-1748.
- Yu, J. W., R. Yang and Y. S. Kim (2010).** "Differential cytoprotective effect of copper- and iron-containing chlorophyllins against oxidative stress-mediated cell death." *Free Radic Res* 44(6): 655-667.
- Yu, J. Z., X. H. Huang, S. S. Ho and Q. Bian (2011).** "Nonpolar organic compounds in fine particles: quantification by thermal desorption-GC/MS and evidence for their significant oxidation in ambient aerosols in Hong Kong." *Anal Bioanal Chem* 401(10): 3125-3139.
- Yue, H., W. Wei, Z. Yue, P. Lv, et al. (2010).** "Particle size affects the cellular response in macrophages." *Eur J Pharm Sci* 41(5): 650-657.
- Zhang, J., A. J. Ghio, W. Chang, O. Kamdar, et al. (2007).** "Bim mediates mitochondria-regulated particulate matter-induced apoptosis in alveolar epithelial cells." *FEBS Lett* 581(22): 4148-4152.
- Zhao, P., J. Fu, B. Yao, Y. Song, et al. (2012).** "In vitro malignant transformation of human bronchial epithelial cells induced by benzo(a)pyrene." *Toxicol In Vitro* 26(2): 362-368.
- Zhao, Y., S. Wang, K. Aunan, H. M. Seip, et al. (2006).** "Air pollution and lung cancer risks in China--a meta-analysis." *Sci Total Environ* 366(2-3): 500-513.

Etude des mécanismes de régulation de la mort cellulaire apoptotique par les particules atmosphériques et leurs composés métalliques

Les effets délétères des particules atmosphériques (PM) sur la santé humaine ont été associés à un risque accru de la mortalité et de la morbidité d'origine cardio-respiratoire ainsi que l'apparition ou l'exacerbation des cancers pulmonaires et sont principalement liés aux particules les plus petites pouvant atteindre les cellules du poumon profond et s'y accumuler. Les PM sont un mélange complexe de suies sur lesquelles s'adsorbent des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) et des métaux, connus pour leurs effets cancérigènes. La cancérogenèse est un processus multi-étapes où les cellules acquièrent des propriétés remarquables, telle que la résistance à la mort cellulaire par apoptose. Dans ce contexte, les objectifs de cette thèse ont été de : i) comprendre le rôle de la taille et de la composition chimique des PM dans la modulation de l'apoptose, ii) identifier les composés impliqués dans la résistance à l'apoptose conférée par les particules fines, iii) décrypter les mécanismes moléculaires mis en œuvre. Nous avons étudié la réponse des cellules épithéliales bronchiques humaines 16HBE exposées à des PM de taille (grossière, fine et ultrafine) et de sources variées (issues de Paris et Ouagadougou) quant à leur réponse sur l'induction ou l'inhibition de l'apoptose et montré que la taille, la dose et la composition chimique des PM constituent des paramètres pouvant conditionner l'induction de l'apoptose. De plus, l'effet anti-apoptotique démontré pour des PM fines parisiennes ne semble pas lié à la taille de ces PM mais à leur teneur spécifique en HAP et en composés métalliques, notamment en métaux de transition (Fer et Cuivre). L'étude mécanistique de la résistance à l'apoptose (induite par le ionophore calcique A23187) conférée par les PM fines parisiennes a mis en évidence : i) l'implication de la voie du récepteur Ah ("Aryl hydrocarbon") activé par les HAP ; ii) l'activation de la voie anti-oxydante Nrf2 en réponse aux composés métalliques des PM ; iii) ainsi que la régulation possible de l'homéostasie calcique. Ces recherches ont mis en évidence, le rôle déterminant des composés métalliques, qui en agissant conjointement avec la fraction organique, peuvent conduire à l'établissement d'une résistance à l'apoptose, étape initiale de la cancérogenèse broncho-pulmonaire.

Mechanisms of apoptotic cell death regulation by atmospheric particles and their metallic compounds

The deleterious impacts of atmospheric particulate matter (PM) on human health have been highlighted by an increased mortality and morbidity of cardiopulmonary origin and the onset or exacerbation of lung cancers and are mainly associated with smallest PM that can reach the deep lung and be retained. PM are a complex mixture composed mainly of soots and several components adsorbed, including polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and metals, all both known for their carcinogenic effects. Carcinogenesis is a multi-step where cells acquire unique properties, such as resistance to apoptotic cell death. In this context, the objectives of this thesis were to : i) understand the role of the size and chemical composition of PM in the modulation of apoptosis, ii) identify the compounds involved in the resistance to apoptosis conferred by fine particles, iii) decipher the molecular mechanisms involved. We studied the response of 16HBE human bronchial epithelial cells exposed to PM with different size (coarse, fine and ultrafine) and from various sources (Paris and Ouagadougou) regarding either induction or inhibition of apoptosis and we showed that the size, the dose and the chemical composition of PM may be parameters that regulate apoptosis induction. In addition, the antiapoptotic effect demonstrated for fine Parisian PM does not seem related to their size but rather to their specific content in PAH and metallic compounds, especially transition metals (iron and copper). The mechanistic study of resistance to apoptosis (triggered by calcium ionophore A23187) conferred by Parisian fine PM demonstrated: i) the involvement of the Ah receptor pathway (Aryl hydrocarbon) activated by PAHs ii) activation of the antioxidant adaptive pathway Nrf2 in response to metallic compounds of PM; iii) as well as potential regulation of calcium homeostasis. These studies have highlighted the key role of the metal compounds, which by acting jointly with the organic fraction, may lead to the development of a resistance to apoptosis, the initial step of bronchopulmonary carcinogenesis.