



HAL
open science

Etude in vitro de la toxicité pulmonaire de la fraction ultrafine des fumées de soudage

Jamila Boudjema

► **To cite this version:**

Jamila Boudjema. Etude in vitro de la toxicité pulmonaire de la fraction ultrafine des fumées de soudage. Médecine humaine et pathologie. Université de Lille, 2021. Français. NNT : 2021LILUS055 . tel-03648969

HAL Id: tel-03648969

<https://theses.hal.science/tel-03648969>

Submitted on 22 Apr 2022

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.



**THESE DE DOCTORAT
ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE SANTE DE LILLE**

**Présentée par
Jamila BOUDJEMA**

**ÉTUDE IN VITRO DE LA TOXICITE PULMONAIRE DE LA FRACTION
ULTRAFINE DES FUMÉES DE SOUDAGE**

Sous la direction du Professeur Guillaume GARÇON

**Spécialité : Sciences du médicament et des autres produits
de santé**

Date de la soutenance : 13 octobre 2021

Membres du Jury :

Président : Pr Régis MATRAN

Rapporteur : Dr Isabelle BAUDRIMONT

Rapporteur : Dr Henri SCHROEDER

Examineur : Pr Christelle MONTEIL

Examineur : Dr Catherine NISSE

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier la direction de mon entreprise Action Santé Travail et notamment Mr Alain Cuisse (ancien président directeur général) ainsi que Mr Philippe Duflo (président directeur général actuel) pour la confiance qu'ils m'ont accordée et leur soutien tout au long de ce travail. Merci à Juliette Demarquilly pour votre confiance et vos encouragements.

Je remercie également le Dr. Catherine Nisse et le Dr. Ariane Leroyer pour leur aide et leur accompagnement.

Je souhaiterais remercier les rapporteurs du jury, les Dr Isabelle BAUDRIMONT et le Dr Henri SCHROEDER pour avoir accepté d'évaluer mes travaux, le Pr. Régis MATRAN pour avoir accepté de présider la séance, ainsi que le Pr Christelle MONTEIL et le Dr Catherine NISSE, pour avoir accepté d'être examinatrices du jury.

Merci au Pr Guillaume Garçon pour avoir encadré ces travaux. Vous m'avez encouragé et motivé pendant toutes ces années. Merci pour votre disponibilité et pour avoir été à l'écoute et su positiver dans les situations compliquées. Merci pour votre éternelle bonne humeur, contagieuse.

Je remercie également le Dr Jean Marc Lo-Guidice, pour m'avoir accueilli dans son équipe. Merci pour votre aide, c'est si facile de comprendre quelque chose de compliqué quand vous l'expliquez ! Merci pour votre bonne humeur, votre soutien et votre disponibilité.

Merci au Dr. Sébastien Anthérieu notre grand spécialiste en stress oxydant pour son accueil et sa gentillesse.

La réalisation de cette étude n'aurait pas été possible sans le travail de tous les collaborateurs. Ainsi, je remercie le Dr Davy Rousset pour la génération des particules, les Dr. Laurent Alleman et Esperanza Perdrix, pour la caractérisation physico-chimique des particules et enfin le Dr. Anne Platel pour les expérimentations sur la génotoxicité.

Je tiens à remercier particulièrement Céline Grare, pour toute l'aide qu'elle m'a apportée. Merci pour tout le travail réalisé sur le projet. Depuis le début, tu m'as accompagnée et tu as toujours été disponible pour m'aider dans les manips sans compter toutes celles que tu as faites pour m'avancer. Tu as pris le temps de m'initier à la recherche et de me former. Je te remercie également pour ta gentillesse, ton soutien, ta bonne humeur. Merci mon amie.

Je remercie également mon amie, le Dr. Yara Saleh pour son aide et son soutien, merci pour les cours, le temps passé à m'aider, pour les répétitions et aussi pour les pauses capuccino.

Merci également à Edmone Dewaeles pour les moments de convivialité.

Merci Djamel Achour, pour ton aide dans les manips et ta gentillesse. Tu as toujours répondu présent quand j'ai eu besoin d'aide et d'explications.

Je n'oublie pas le récent Dr. Romain Dusautoir, merci pour ton soutien et ta bonne humeur.

Merci à Gianni Zarcone (Jean Charbon), ma petite Emeline Barbier (rhhhhhhhhh), Florence Jacob et Jessica Carpentier pour la convivialité qui règne dans le laboratoire.

Et enfin comment ne pas remercier notre Emma Nationale, qui ensoleille le laboratoire par sa bonne humeur et sa gentillesse.

Je remercie ma famille, ma mère, mon frère Karim et mes sœurs très chères à mon cœur pour leur soutien et leurs encouragements.

Une pensée émue pour mon père Ali BOUDJEMA qui aurait été si fier de moi.

Merci à mes neveux et nièces qui me soutiennent quotidiennement, particulièrement Sarah et Ines.

Merci à mes cousines Wagner et Serena, pour votre présence et votre soutien.

Merci à ma Monica (ma poulaton) d'être toujours là pour moi, pour ta bonne humeur et ton sourire légendaire. Merci à Lucie Pereira pour ton soutien et tes encouragements.

Et le meilleur pour la fin, merci à mon précieux Mari Hocine Djemaï pour ton aide, ta confiance, ton soutien et tes encouragements.

Enfin, je dédie ce travail et ce manuscrit à ma princesse Sarah.

VALORISATIONS

- ▶ Publication internationale à comité de lecture :

J. Boudjema, B. Lima, C. Grare, L.Y. Alleman, D. Rousset, E. Perdrix, D. Achour, S. Anthérieu, A. Platel, F. Nessler, A. Leroyer, C. Nisse, J.-M. Lo Guidice, G. Garçon (2021). Metal enriched quasi-ultrafine particles from stainless steel gas metal arc welding induced genetic and epigenetic alterations in BEAS-2B cells. *NanoImpact* 23: 100346
<https://doi.org/10.1016/j.impact.2021.100346>

- ▶ Communication internationale par affiche :

J. Boudjema, B. Lima, C. Grare, L.Y. Alleman, D. Rousset, E. Perdrix, D. Achour, S. Anthérieu, A. Platel, F. Nessler, A. Leroyer, C. Nisse, J.-M. Lo Guidice, G. Garçon (2021). Metal enriched quasi-ultrafine particles from stainless steel gas metal arc welding induced genetic and epigenetic alterations in BEAS-2B cells. EUROTOX 2021 Virtual congress.

- ▶ Communication nationale par affiche :

J. Boudjema, B. Lima, L.Y. Alleman, D. Rousset, S. Anthérieu, E. Perdrix, D. G. Garçon J.-M. Lo Guidice, A. Leroyer, C. Nisse, (2019). Pulmonary toxicity of ultrafine fraction of welding fumes: role of epigenetic factors. Colloque des doctorants de l'Ecole Doctorale Biologie Santé de Lille (446) - Journées André Verbert.

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS.....	2
VALORISATIONS	4
SOMMAIRE.....	5
LISTE DES ABREVIATIONS.....	10
LISTE DES FIGURES	13
LISTE DES TABLEAUX.....	18
AVANT-PROPOS	19
CHAPITRE I : ETAT DE L'ART	22
A. Généralités sur les FS.....	22
1. Définition des FS.....	22
2. Les différents procédés de soudage.....	22
a. Soudage MMA (Manual Metal Arc) : soudage à l'électrode enrobée	23
b. Soudage (GMA, Gaz Metal Arc) : soudage à l'arc semi-automatique.....	23
c. Soudage GTA (Gas Tungsten Arc) : soudage à l'arc à l'électrode non fusible.....	24
d. Soudage FCA (Flux-Cored Arc) : Soudage à l'arc avec fil fourré.....	25
3. Caractéristiques des émissions des FS	25
a. Composition des FS.....	25
b. Taille des particules.....	30
4. Devenir des particules chez l'homme	32
a. Rappels sur l'appareil respiratoire	32
b. Distribution des particules dans les poumons.....	35
c. Mécanismes de clairance pulmonaire	37
i. Clairance mucociliaire :	37
ii. Clairance macrophagique :	39
5. Exposition professionnelle	42
B. Toxicité des FS.....	55
1. Données épidémiologiques chez les soudeurs.....	55

a.	Pathologies respiratoires	55
i.	Atteintes de la fonction pulmonaire :	55
ii.	Asthme	59
iii.	BPCO.....	62
iv.	Cancers broncho-pulmonaires.....	66
v.	Autres pathologies	68
2.	Mécanismes d'action toxique des FS	69
a.	Stress oxydant.....	69
i.	Radicaux libres, espèces réactives et stress oxydant.....	69
ii.	Stress oxydant et signalisation cellulaire	75
iii.	ROS et voies de signalisation induites par les ions métalliques.....	77
iv.	FS et stress oxydant	80
b.	INFLAMMATION	86
i.	Généralités sur l'inflammation	86
ii.	Inflammation et pathologies pulmonaires.....	94
iii.	FS et inflammation	96
c.	Epigénétique	102
i.	Généralités sur les mécanismes épigénétiques.....	102
ii.	Modification des Histones	104
iii.	Méthylation de l'ADN.....	106
iv.	Dérégulation des micro-ARN.....	109
v.	FS et épigénétique	111
	CHAPITRE II : PROBLEMATIQUE	112
	CHAPITRE III : MATERIELS ET METHODES.....	114
A.	Génération des FS.....	114
B.	Collecte des particules	115
C.	Caractérisation physico-chimique des particules	116
1.	Extraction des particules de FS.....	116
2.	Distribution granulométrique en milieu liquide.....	117
3.	Dosage des métaux.....	117
4.	Dosage du chrome hexavalent	117
D.	Caractérisation du potentiel oxydant des particules	118

1.	Dosage acellulaire de l'oxydation du CM-H2DCFDA	118
2.	Dosage de la déplétion du glutathion réduit.....	118
E.	Modèle expérimental d'exposition aux particules de FS.....	119
F.	Détermination des doses d'exposition des cellules aux particules de FS	119
1.	Préparation de la gamme de concentration d'exposition.....	119
2.	Etude de la viabilité cellulaire.....	120
3.	Détermination des doses d'exposition.....	120
4.	Mode d'exposition des cellules aux particules de FS	120
G.	Etude du stress oxydant	121
1.	Analyse des ERO intracellulaires	121
2.	Analyse des protéines carbonylées	122
3.	Analyse de la 8-OHdG	122
4.	Analyse du 4-HNE	123
5.	Analyse de la voie de signalisation NRF2.....	123
6.	Evaluation du statut en glutathion.....	124
H.	Analyse de la réponse inflammatoire	124
1.	Analyse de la capacité de liaison à l'ADN du facteur de transcription NF- κ B.....	124
2.	Analyse de la sécrétion des cytokines	125
3.	Expression génique des cytokines par RT-qPCR.....	125
I.	Analyse transcriptomique des voies de signalisation cellulaire	126
1.	Extraction des ARN	126
2.	Amplification des ADNc par OPENARRAY.....	126
3.	Analyse statistique des résultats de l'expression génique.....	126
J.	Analyse des modifications épigénétiques	127
1.	Analyse de la méthylation globale de l'ADN	127
2.	Analyse de la modification des histones	127

3.	Expression des MicroARN.....	128
a.	Extraction des ARN.....	128
i.	Amplification des ADNc par OPENARRAY	129
ii.	Analyse statistique des résultats de l'expression des miARN.....	129
K.	Etude de la mort cellulaire par apoptose	129
1.	Analyse de l'apoptose par cytométrie en flux.....	129
2.	Analyse des activités des caspases 3/7, 8 et 9	130
L.	Analyses statistiques.....	131
CHAPITRE IV : RESULTATS		132
A.	Caractérisation physico-chimique des particules de FS	132
1.	Collecte des particules des FS.....	132
2.	Distribution granulométrique des particules des FS en milieu liquide	132
3.	Composition métallique des particules des FS.....	134
4.	Potentiel oxydant des PUF des FS	135
B.	Toxicité pulmonaire des PUF de FS.....	135
1.	Etude de la cytotoxicité des PUF des FS	135
2.	Évaluation du stress oxydant après exposition aux PUF des FS.....	137
a.	Production intracellulaire d'ERO par les PUF des FS.....	137
b.	Activation de la voie de signalisation Nrf2 par les PUF des FS.....	137
c.	Altération du statut du glutathion après exposition aux PUF des FS	139
d.	Production de la 8-OHdG après exposition aux PUF des FS	140
e.	Production de protéines carbonylées après exposition aux PUF des FS	140
f.	Production du 4-HNE après exposition aux PUF des FS S.....	142
3.	Analyse de la réponse inflammatoire après exposition aux PUF des FS.....	143
a.	Activation de la voie de signalisation du facteur NF-κB par les PUF des FS.....	143
b.	Sécrétion des cytokines pro-inflammatoires après exposition aux PUF des FS.....	143
c.	Expression génique des cytokines inflammatoires après exposition aux PUF de FS.....	145
4.	Voies de signalisation induites par l'exposition aux PUF des FS	146
5.	Modifications épigénétiques induites par l'exposition aux PUF des FS.....	148

a.	Acétylation des histones H3K9 et H3K27 induite par les PUF des FS	148
b.	Altérations des activités des HAT et des HDAC induites par les PUF des FS.....	148
c.	Méthylation de l'ADN induite par les PUF des FS	150
d.	Altération des profils de miARN par les PUF des FS.....	151
6.	Interactions miARN et mARN induites par l'exposition aux PUF des FS	152
7.	Effets pro-apoptotiques induits par les PUF des FS	155
C.	Tableau de synthèse des résultats.....	157
CHAPITRE V : DISCUSSION		158
CHAPITRE VI : CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....		174
BIBLIOGRAPHIE		177
RESUME.....		194
ABSTRACT.....		194

LISTE DES ABREVIATIONS

3'-UTR	3' Untranslated Transcribed Region
4-HNE	4-Hydroxynonenal
5'-UTR	5' Untranslated Transcribed Region
8-OH-DG	8-Oxo-2'-DésoxyGuanosine
AG	Acide Gras
Ago2	Protéine Argonaute 2
ANSES	Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail
AP-1	Activator Protein-1
ARE	Antioxidant Response Element
ARNm	ARN messenger
ATP	Adénosine Triphosphate
ATS	American Thoracic Society
BAL	Bronchoalveolar Lavage
BALF	Bronchoalveolar Lavage Fluid
BEAS-2B	Bronchial Epithelium transformed with Ad12-SV40 2B
BGI	Berufsgenossenschaft Information
BPCO	Broncho Pneumopathie Chronique Obstructive
CFTR	Régulateur de Conductance TRansmembranaire
CIRC	Centre international de Recherche sur le Cancer
CM-H ₂ DCFDA	Dérivé Chlorométhyle 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate
CMR	Cancérogène Mutagène Reprotoxique
CRP	Protéine C-Réactive
CVF	Capacité Vitale Forcée
DEP	Débit Expiratoire de Pointe
DNMT	DNA methyltransferase
DNMT 1	DNA methyltransferase 1
DNMT 2	DNA methyltransferase 2
DNMT 3 A	DNA methyltransferase 3 A

DNMT 3 B	DNA methyltransferase 3 B
DNMT3L	DNA methyltransferase 3 L
EBC	Exhaled Breath Condensate
ELPI	Electrical Low Pressure Impactor
ERO/ERN	Espèces Réactives de l'Oxygène / Azote
FCA	Flux-Cored Arc
FEV	Forced Expiratory Volume
GMA	Gas Metal Arc
GPx	Glutathion Peroxidase
GTA	Gas Tungsten Arc
H3K27	Histone H3 on Lysine 27
H3K4	Histone H3 on Lysine 4
H3K9	Histone H3 on Lysine 9
HAT	Histone Acétyltransférase
HDAC	Histone Désacétylases
HMT	Histones Méthyltransférases
HDMT	Histones Déméthylases
HIF-1	Hypoxia-Inducible Factors
<i>HMOX</i>	Hème Oxygénase
HMT	Histones Méthyltransférases
HO-1	Hème oxygénase 1
IFN γ	Interféron γ
IL-13	Interleukine 13
IL-1 β	Interleukine 1 β
IL4	Interleukine 4
IL-6	Interleukine 6
IL-8	Interleukine 8
iNOS	Oxyde Nitrique Synthase Inductible
INVS	Institut National de Veille Sanitaire
LDH	Lactase Déshydrogénase
LINE-1	Long-Interspersed Nuclear Element

MAPK	Mitogen-activated protein kinases
MBD	Methyl Binding Protein
MDA	Malondialdéhyde
MIG	Metal Inert Gas
MMA	Manual Metal Arc
MS	Mild Steel
NADPH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
NFAT	Nuclear factor of activated T-cells
NF-kB	Nuclear Factor-Kappa B
NL	Nasal Lavage
Nox	Oxydes d'azote
<i>NQO-1</i>	NAD(P)H Quinone Dehydrogenase 1
O ₂ ⁻	Anion Superoxyde
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
OSHA	Occupational Safety and Health Administration
PNN	Polynucléaires Neutrophiles
PUF	Particules Ultra-Fines
SAM	S-adénosyl méthionine
SOD	Superoxyde Dismutase
SS	Stainless Steel
SUMER	Surveillance médicale des expositions des salariés aux risques professionnels
TH-2	Lymphocytes CD4+ T Helper-2
TNF- α	Tumor Necrosis Factor α
TRBP	Tat RNA-Binding Protein
TRDMT1	TRNA Aspartic Acid Methyltransferase 1)
TWA	time-weighted average
UV	Ultra Violet
VAI	Voie Aérienne Inférieure
VAS	Voie Aérienne Supérieure
VEMS	Volume expiratoire maximal par seconde
VLEP	Valeur Limite d'Exposition Professionnelle

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Principe du soudage à l'arc manuel blindé au métal (Manual Metal Arc, MMA), adaptée d'après Weldteam (2021)	23
Figure 2 : Principe du soudage à l'arc sous forme de gaz métallique (Gaz Metal Arc, GMA) et illustration d'un soudeur utilisant le GMA, modifié d'après SAF-FRO (2021)	24
Figure 3: Principe du soudage à l'arc sous gaz (Gas Tungsten Arc, GTA) et illustration du soudage GTA, modifié d'après SAF-FRO (2021).....	24
Figure 4: Mécanisme de formation des oxydes de métaux, adapté d'après Popović et al. (2014a).....	27
Figure 5: Exemple de distribution granulométrique de FS, modifié selon Antonini et al. (2007a)	30
Figure 6: Anatomie du système respiratoire chez l'Homme, modifié selon Anatomie du système respiratoire chez l'Homme (2018).....	32
Figure 7 : Illustration schématique des voies respiratoires inférieures humaines, modifié d'après Collawn et al (2012)	33
Figure 8 : Mécanismes de défense pulmonaire modifié selon Wright (2005)	34
Figure 9 : Mécanismes de dépôt de particules dans les poumons, adapté selon Cavalho et al. (2011).....	36
Figure 10 : Dépôt des particules dans les voies respiratoire, modifié selon Geiser et al.(2010)	36
Figure 11 : Structure et fonction des défenses innées de l'hôte dans les voies respiratoires conductrices. Modifié selon Whitsett et Alenghat (2015).	38
Figure 12 : Epithélium pulmonaire trachéal observé au microscope électronique à balayage, modifié d'après Galanopoulo (2020).....	39
Figure 13 : Alvéole normale (gauche) et alvéole lésée lors d'un syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA) (droite), modifié selon Briot et al. (2012)	41
Figure 14 : Le modèle de stress oxydant, modifié d'après Baeza et Marano (2007).	72
Figure 15 : : Conséquences cellulaires des espèces réactives de l'oxygène (ERO) : une question d'équilibre. Modifié selon Carrière et al. (2006)	73
Figure 16 : Voie de formation et de neutralisation des espèces réactives de l'oxygène (ERO), modifié selon Valko et al.(2007)	74

Figure 17 : Voie de signalisation du nuclear factor erythroid-2-related factor 2 (Nrf2) et transcription des gènes sous sa dépendance. Modifié d'après Boutten et al. (2011)	75
Figure 18 : Représentation schématique du rôle central de Nrf2 dans l'équilibre oxydants/antioxydants au niveau pulmonaire au cours des agressions. Modifié d'après Boutten et al. (2011).....	76
Figure 19 : Mécanismes communs impliquant la génération de l'anion superoxyde et du radical hydroxyle par la réaction de Fenton catalysée par le Fer (Fe), le Cuivre (Cu), le Chrome (Cr), le Vanadium (Va) et le Cobalt (Co). Modifié d'après Valko et al. (2005).....	77
Figure 20 : Réactions de Fenton et d'Haber-Weiss, catalysée par le Fer (Fe). Modifié d'après Valko et al. (2005)	77
Figure 21 : Réactions de Fenton catalysée par le Cuivre (Cu). Modifié d'après Valko et al. (2005)	77
Figure 22 : : Réactions de Fenton catalysée par le Chrome VI (CrVI). Modifié d'après Valko et al. (2005)	77
Figure 23 : : Réactions de Fenton catalysée par l'Arsenic (AsV). Modifié d'après Valko et al. (2005).....	78
Figure 24 : Attaque radicalaire des protéines. D'après Migdal et al. (2011).....	79
Figure 25 : Voies de signalisation induites par les espèces réactives de l'oxygène (ERO) et les ions métalliques modifié selon Valko et al (2006).....	80
Figure 26 : Mécanismes impliqués dans l'induction d'un stress oxydant par les métaux. Modifié d'après Valko et al. (2005).....	81
Figure 27 : Réponse inflammatoire générale dans les maladies respiratoires modifié selon Aghasafari et al. (2019b).....	86
Figure 28 : Rôle de l'épithélium bronchique dans l'immunité innée et la réaction inflammatoire d'après Aghasafari et al. (2019b).....	88
Figure 29 : Gènes cibles du transcription nuclear factor-kappa B (NF-κB) impliqués dans le développement et la progression de l'inflammation. Modifié d'après Liu et al. (2013).....	89
Figure 30 : Rôle du nuclear factor-kappa B (NF-κB) dans la régulation de l'inflammasome NOD-Like Receptor family, Pyrin domain containing 3 (NLRP3). Modifié d'après Liu et al. (2013).	89
Figure 31 : Interactions entre les voies de signalisation du nuclear factor-kappa B (NF-κB) et du nuclear factor erythroid-2-related factor 2 (Nrf2). Modifié d'après Bhandari et al. (2021)	90

Figure 32 : Evolution d'une réponse inflammatoire aiguë en une réponse inflammatoire chronique. Modifiée d'après Chen et al. (2017).....	93
Figure 33 : (A) Synthèse des mécanismes physiopathologiques dans l'asthme et la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) (B) Caractéristiques histologiques de l'asthme et la BPCO. Modifié d'après Lumb et al. 2017 et Barnes et al. 2015.....	95
Figure 34 : Diagramme schématisant le mécanisme proposé par lequel les fumées de soudage (FS) de l'acier inoxydable induisent la cytotoxicité par la génération d'un stress oxydant et l'activation des médiateurs inflammatoires adapté selon Shoeb et al. (2017) ..	101
Figure 35 : Mécanismes épigénétiques. Modifié selon Gartstein et al.(2018).....	103
Figure 36 : Remodelage de la chromatine et expression des gènes, modifié selon Barnes (2009).....	104
Figure 37 : Modifications de la chromatine médiées par la méthylation de l'ADN et l'acétylation des histones, modifié selon Krishnendu et al. (2015).....	105
Figure 38 : Mécanisme de méthylation de l'ADN modifié selon Weinhold et al. (2006).....	107
Figure 39 : Biogénèse des miARN et modulation de l'activité des miARN modifié selon Van Rooij et al. (2014).....	110
Figure 40: Schéma et photo du banc de soudage utilisé pour la génération et la collecte des particules des Fumées de Soudage (FS).....	115
Figure 41 : Distribution granulométrique des particules des fumées de soudage en fonction de leur nombre après sonication au bac à ultrasons (A) ou à l'aide d'une sonde à ultrasons (B).	133
Figure 42 : Représentation graphique de la composition élémentaire relative des PUF de FS (ng/μg).	134
Figure 43 : Représentation graphique des courbes de viabilité cellulaire évaluée par 3 expositions indépendantes des cellules BEAS-2B à des concentrations (μg/cm ²) des PUF des FS : après une exposition aiguë (A) ou des expositions répétées (B).	135
Figure 44 : Représentation graphique des courbes moyennes de viabilité cellulaire évaluée par 3 expositions indépendantes des cellules BEAS-2B à des concentrations (μg/cm ²) des PUF des FS : après une exposition aiguë (A) ou des expositions répétées (B).	136
Figure 45 : Production intracellulaire des espèces réactives de l'oxygène (ERO) évaluée par la mesure de la fluorescence de la sonde CM-H ₂ DCFDA après exposition des cellules BEAS-2B	

aux particules ultrafines (PUF) des fumées de soudage. (Test t de Student, versus contrôles, n = 5, *** = p < 0,001).....	137
Figure 46 : Capacité de fixation du nuclear factor erythroid-2-related factor 2 (Nrf2) à la séquence Antioxydant Response Element de l'ADN après exposition des cellules BEAS-2B aux particules ultrafines (PUF) des fumées de soudage. (Test t de Student, versus contrôles, n = 5, ** = p < 0.01 et *** = p < 0,001).....	138
Figure 47 : Expression des gènes codant pour les enzymes antioxydantes, Hème Oxygénase-1 (HMOX) et NADPH Quinone Oxydoréductase 1 (NQO-1) après exposition des cellules BEAS-2B aux particules ultrafines (PUF) des fumées de soudage.(Test t de Student, versus contrôles, n = 5, * = p<0.05 et *** = p < 0,001).....	139
Figure 48 : Ratio entre les formes oxydée et réduite du glutathion (GSSG/GSH) après exposition des cellules BEAS-2B aux particules ultrafines (PUF) des fumées de soudage. (Test t de Student, versus contrôles, n = 5, *** = p < 0,001)	140
Figure 49 : Concentration en 8-hydroxy-2'-désoxyguanosine (8-OHdG) après exposition des cellules BEAS-2B aux particules ultrafines (PUF) des fumées de soudage. (Test t de Student, versus contrôles, n = 5, * = p < 0,05 et ** = p < 0,01)	141
Figure 50 : Concentrations en protéines carbonylées (CO-PROT) après exposition des cellules BEAS-2B aux particules ultrafines (PUF) des fumées de soudage. (Test t de Student, versus contrôles, n = 5, ** = p < 0,01).....	141
Figure 51 : Concentrations en adduits 4-hydroxynonéal (4-HNE)-sérum albumine bovine (BSA) après exposition des cellules BEAS-2B aux particules ultrafines (PUF) des fumées de soudage. (Test t de Student, versus contrôles, n = 5, ** = p < 0,01).....	142
Figure 52 : Capacité de fixation du nuclear factor-kappa B (NF- κ B) à l'ADN après exposition des cellules BEAS-2B aux particules ultrafines (PUF) des fumées de soudage. (Test t de Student, versus contrôles, n = 5, ** = p < 0,01 et *** = p < 0,001)	143
Figure 53 : Concentrations en Interleukine-6 (IL-6), Interleukine-1 bêta (IL-1 β) et Tumor Necrosis Factor-alpha (TNF- α) dans les surnageants de culture des cellules BEAS-2B après exposition aux particules ultrafines (PUF) des fumées de soudage. (Test t de Student, versus contrôles, n = 5)	144
Figure 54 : Expressions géniques de l'Interleukine-1 bêta (IL-1 β) et du Tumor Necrosis Factor-alpha (TNF- α) dans les cellules BEAS-2B après exposition aux particules ultrafines (PUF) des	

fumées de soudage. (Test t de Student, versus contrôles, n = 5, * = p < 0,05, ** = p < 0,01, et *** = p < 0,001).....	145
Figure 55: Expressions géniques de l'Interleukine-6 (IL-6) et de l'Interleukine-8 (IL-8) dans les cellules BEAS-2B après exposition aux particules ultrafines (PUF) des fumées de soudage. (Test t de Student, versus contrôles, n = 5)	146
Figure 56 : Gènes significativement sous- (A) et surexprimés (B) dans les cellules BEAS-2B après exposition aux particules ultrafines (PUF) des fumées de soudage (FC < 0,5 ou FC > 2, p < 0,05).	147
Figure 57: Acétylation des histones H3K9 et H3K27 dans les cellules BEAS-2B après exposition aux particules ultrafines (PUF) des fumées de soudage. (Test t de Student, versus contrôles, n = 5, * = p < 0,05, ** = p < 0,01, et *** = p < 0,001)	149
Figure 58 : Activités des Histone Désacétylases (HDAC) et des Histone Acétyltransférases (HAT), et leur ratio, dans les cellules BEAS-2B après exposition aux particules ultrafines (PUF) des fumées de soudage. (Test t de Student, versus contrôles, n = 5, * = p < 0,05, ** = p < 0,01, et *** = p < 0,001)	149
Figure 59 : Taux de méthylation de l'ADN dans les cellules BEAS-2B après exposition aux particules ultrafines (PUF) des fumées de soudage. (Test t de Student, versus contrôles, n = 5)	150
Figure 60: miRNA significativement sous- (A) et surexprimés (B) dans les cellules BEAS-2B après exposition aux particules ultrafines (PUF) des fumées de soudage (FC < 0,5 ou FC > 2, p < 0,05).	151
Figure 61 : Gènes cibles prédits par les trois algorithmes de prédiction des cibles (i.e., miRDB, TargetScanHuman v7.2, DIANA TOOLS microT-CDS v5.0) des miARN significativement dérégulés (A à J) dans les cellules BEAS-2B après exposition aux particules ultrafines (PUF) des fumées de soudage.....	153
Figure 62 : Effets pro-apoptotiques des particules ultrafines (PUF) des fumées de soudage mesurés par cytométrie en flux dans les cellules BEAS-2B après marquage par l'Annexine V. (Test t de Student, versus contrôles, n = 5, * = p < 0,5, ** = p < 0,01, *** = p < 0,001)	155
Figure 63 : Activités des caspases initiatrices 8, 9 et effectrices 3/7 dans les cellules BEAS-2B après exposition aux particules ultrafines (PUF) des fumées de soudage. (Test t de Student, versus contrôles, n = 5, ** = p < 0,0, et *** = p < 0,001)	156

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Polluants émis en fonction des procédés de soudage et des métaux d'apports, modifié d'après ED6132, INRS (Ricaud, s.d.)	26
Tableau 2 : Composition des fumées de soudage en fonction des différents procédés utilisés (modifié selon Schoonover et al. (2011)).....	29
Tableau 3 : Taille, forme et morphologie des particules des fumées de soudage, modifié selon BGI 593, (Hazardous substances in welding and allied processes, BGI 593, s.d.)	31
Tableau 4 : Mesure de l'exposition professionnelle aux fumées de soudage (FS) (IARC, 2018b)	44
Tableau 5 : Valeurs Limites Internationales en termes d'exposition des salariés aux fumées de soudage (GESTIS, 2021)	53
Tableau 6: Principales études réalisées chez l'animal et chez l'homme sur le développement d'altérations de la fonction pulmonaire en réponse à l'exposition aux fumées de soudage (FS).	57
Tableau 7: Principales études réalisées chez l'homme sur le développement d'un asthme professionnel en réponse à l'exposition aux fumées de soudage (FS).....	60
Tableau 8 : Principales études réalisées chez l'homme sur le développement de BPCO en réponse à l'exposition aux fumées de soudage (FS).	63
Tableau 9 : Principales études réalisées chez l'homme sur le développement de Cancers Broncho Pulmonaires (CBP) en réponse à l'exposition aux Fumées de soudage (FS).	67
Tableau 10 : Mode d'action des radicaux libres primaires d'après Baeza et Marano (2007). 71	
Tableau 11 : Les quatre étapes de la réduction de l'oxygène d'après Migdal et al. (2011)	71
Tableau 12: Enzymes de phase II, antioxydants et cytoprotecteurs faisant intervenir Nrf2. Modifié d'après Boutten et al. (2011)	76
Tableau 13: Principales études expérimentales sur la mise en évidence d'un stress oxydant en réponse à l'exposition aux Fumées de Soudage (FS).....	84
Tableau 14: Principales études sur la mise en évidence d'une réponse inflammatoire en réponse à l'exposition aux Fumées de Soudage (FS).....	98
Tableau 15: Distribution granulométrique des particules des fumées de soudage en milieu liquide selon deux modes de sonication : bac à ultrasons versus sonde à ultrasons.	133

AVANT-PROPOS

Les affections respiratoires sont l'une des causes majeures de morbidité et de mortalité en France et sont les plus fréquentes des maladies professionnelles reconnues dans le cadre du régime général de la sécurité sociale. (Dalphin and Pairon, 2006) Parmi ces affections, le cancer du poumon est responsable d'environ un million de décès chaque année au niveau mondial ; en 2020, 2,21 millions de cas de cancers du poumon ont été recensés dans le monde de même que 1,8 millions de décès par cette affection. (OMS, 2021) En France, en 2018, le cancer du poumon a été responsable de 46 363 nouveaux cas estimés, 31 231 hommes et 15 132 femmes, et de 33 117 décès, 22 761 hommes et 10 356 femmes, ce qui a situé ce cancer au 3^{ème} rang des cancers incidents, tous sexes confondus. Il se place au 2^{ème} rang des cancers chez l'homme et au 3^{ème} rang chez la femme. Quel que soit l'âge observé, l'incidence de ce cancer est plus élevée chez l'homme que chez la femme ; toutefois, l'écart se resserre au détriment de ces dernières (Cancers professionnels, 2021).

Bien que le tabagisme soit le principal facteur responsable de du cancer du poumon, une part importante peut être attribuée aux expositions environnementales et professionnelles. Sans qu'il ne soit toutefois réellement possible, en l'état actuel des connaissances, d'estimer avec une grande précision la part de l'augmentation liée à ces expositions, le lien entre l'apparition de cancers et certains facteurs d'exposition environnementaux ou professionnel est clairement établi. Selon la source des données et les facteurs de confusion pris en considération, la part des cancers attribuables aux expositions environnementales ou professionnelles est très variable allant de 5 %, selon le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC), à 19 %, selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS). D'après l'Institut National de Veille Sanitaire (INVS), en France, 5 à 10 % des cancers seraient liés à des facteurs environnementaux, soit 15 000 à 30 000, 4 et 8,5 % des cancers seraient liés aux expositions professionnelles et 25 à 30 % des cancers seraient imputables aux comportements individuels tels que le tabagisme et l'alcool. Par ailleurs, selon la source des données et la pathologie, la part attribuable aux facteurs de risque environnementaux ou professionnels varie de façon considérable, de 4 % pour les leucémies à 83 % pour les mésothéliomes. ("Fiche repere environnement et cancer, INCA, 2008.pdf," n.d.) En 2016, Matrat et al. ont estimé à 20 % la part des cancers du poumon attribuable à

une exposition professionnelle. Les données de la branche risques professionnels de l'assurance maladie indiquent que le nombre de cancers professionnels reconnus a triplé en 20 ans. (Matrat et al., 2016)

Les activités de soudage ont depuis longtemps été associées à des pathologies respiratoires chez l'homme, à courts termes comme les fièvres des métaux ou à, plus longs termes comme les pneumoconioses. En outre, depuis 2017, les fumées de soudage (FS) ont été classées par le groupe d'experts du CIRC comme cancérigène pour l'homme (Groupe 1), principalement sur la base des résultats des études épidémiologiques et expérimentales supportant l'existence d'une relation entre l'exposition à ce facteur de risque et l'incidence accrue de cancers du poumon, après ajustement sur les autres facteurs de risques (i.e., rayonnements UV, champs électromagnétiques, amiante et solvants. (IARC, 2018a) Les FS concernent plus de 600 000 salariés en France d'après la dernière enquête SUMER et le nombre de cancers du poumon reconnus en lien avec une exposition aux FS a connu une augmentation significative de trois à trente fois entre 2001 et 2016. (RNV3P, 2018) (Ricaud, 2018)

La connaissance des effets néfastes des FS reste à l'heure actuelle encore parcellaire. En effet, la caractérisation des risques spécifiques des activités de soudage pour la fonction pulmonaire est compliquée, de par la diversité des procédés couramment utilisées et la présence de facteurs confondants et de cofacteurs d'exposition. Parmi les effets indésirables rapportés, le déclin accéléré de la fonction pulmonaire, la prévalence accrue de bronchites chroniques, l'augmentation du risque d'infections pulmonaires, l'apparition de pathologies comme l'asthme, la BPCO et bien sûr le cancer du poumon ont été régulièrement cités.

Bien que de nombreuses études épidémiologiques aient supporté l'existence d'une relation de causalité entre l'exposition aux FS et l'altération de la fonction pulmonaire, les déterminants majeurs de leur toxicité restent néanmoins difficiles à étudier du fait de la grande diversité, en fonction des procédés utilisés, de leurs caractéristiques physiques et chimiques, incluant notamment leur distribution granulométrique et les multiples éléments inorganiques et organiques qu'elles renferment. Les connaissances actuelles des mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans l'apparition ou l'exacerbation des pathologies pulmonaires observées suite à l'exposition aux FS sont par conséquent, elles aussi, encore limitées. Elles mériteraient toutefois d'être étudiées plus en avant, avec une attention toute particulière sur le rôle possiblement joué par leur fraction particulaire ultrafine, afin de

contribuer à une meilleure évaluation des risques sanitaires liés à leur inhalation, et surtout de permettre, grâce à un renforcement de la réglementation actuellement en vigueur, d'instaurer une meilleure prévention auprès des populations de travailleurs.

C'est dans ce contexte d'exposition des travailleurs aux FS et aux incertitudes qui persistent en termes de déterminants de toxicité et de mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués que s'inscrit mon travail de thèse. L'objectif de ce dernier était d'approfondir la caractérisation physique et chimique de la fraction particulaire ultrafine des FS, collectées à partir d'un banc de soudage expérimental utilisant le procédé de soudage Metal Inert Gas (MIG), et de rechercher, dans un modèle de cellules épithéliales bronchiques humaines, les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans l'apparition des pathologies respiratoires suite à l'exposition à de facteur de risques professionnels.

CHAPITRE I : ETAT DE L'ART

A. Généralités sur les FS

1. Définition des FS

Le soudage est un procédé qui permet l'assemblage permanent de matériaux métalliques par fusion, avec ou sans métal d'apport, pour former un joint solide.

Depuis l'âge de bronze, le soudage était réalisé par forgeage. C'est seulement à la fin du 19^{ème} siècle, qu'est apparu le soudage au gaz à haute température en utilisant des mélanges de gaz tels que l'acétylène et l'oxygène, désormais stockables en toute sécurité. Au début du 20^{ème} siècle, avec la révolution technique issue de l'utilisation à grande échelle de l'électricité, les procédés de soudage à l'arc utilisant l'électricité comme source d'énergie pour générer un arc ont été développés.

Les soudages à l'arc et au gaz sont les deux principales techniques de soudage utilisées. Ces procédés permettent une élévation de la température de manière rapide à partir d'une source thermique intense, ce qui provoque la fonte des bords des métaux à assembler en formant un bain de fusion. La solidification du bain de fusion provoquée par son refroidissement constitue le joint qui unit solidement les deux pièces à souder. (Procédés de soudage, 2012)

Les procédés de soudage génèrent des fumées qui sont produites par vaporisation et condensation des métaux à la suite de la fusion des métaux. Les FS sont principalement constituées de fines particules solides de taille inférieure à 1 μm , composées d'un ensemble complexe de métaux, d'oxydes métalliques, et d'autres espèces chimiques volatilisées à partir du fil, de l'électrode, ou de tout revêtement du métal de base. (Kornberg et al., 2017)

2. Les différents procédés de soudage

Il existe environ 140 procédés de soudage qui sont majoritairement utilisés dans l'industrie pour leurs avantages, métallurgiques et opérationnels. Parmi ces procédés, les types les plus courants sont le soudage à l'arc manuel blindé au métal (Manual Metal Arc, MMA), le soudage à l'arc sous forme de gaz métallique (Gaz Metal Arc, GMA), le soudage à l'arc avec fil fourré (Flux-Cored Arc, FCA), et le soudage à l'arc sous gaz (Gas Tungsten Arc,

GTA). D'autres procédés comme le soudage à l'arc submergé, le soudage à l'arc au plasma et le soudage à l'oxygène sont également largement utilisés mais pour des opérations très spécifiques. Chaque méthode a ses propres avantages métallurgiques et opérationnels, et représente un danger potentiel. (SYMOP, 2018) Le procédé de soudage industriel GMA est le plus couramment utilisé en raison de sa polyvalence, sa rapidité, de son coût relativement faible et de son adaptabilité au soudage robotisé. (IARC, 2018a)

a. Soudage MMA (Manual Metal Arc) : soudage à l'électrode enrobée

La fusion des métaux est obtenue par un apport de chaleur intense créé par un arc électrique qui circule entre une électrode métallique fusible comportant un enrobage et les pièces à souder (Figure 1). Cette énergie permet de fondre les bords des pièces à souder. En se consumant, l'âme de l'électrode crée un apport de métal. L'enrobage en fondant simultanément avec l'âme métallique, produit un gaz et un laitier, c'est-à-dire une croûte qui se forme sur le bain de la soudure. Le laitier protège ce bain de l'oxygène de l'air et l'isole thermiquement afin d'éviter l'oxydation du métal en fusion. Il favorise également la stabilité de l'arc et, dans certains cas, apporte des améliorations d'ordre métallurgique.

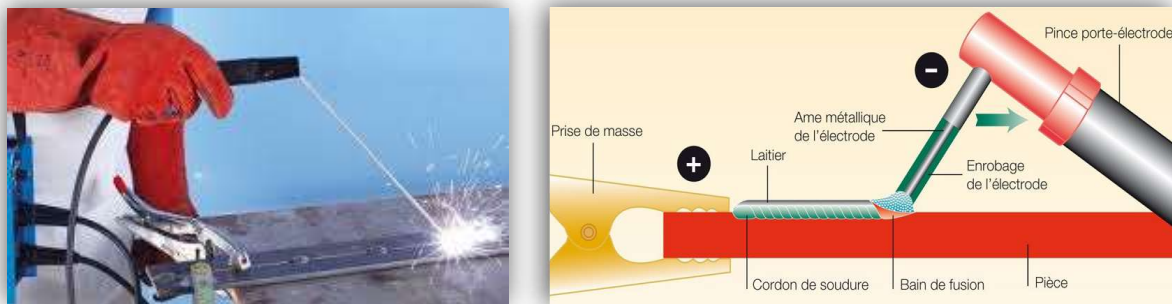


Figure 1 : Principe du soudage à l'arc manuel blindé au métal (Manual Metal Arc, MMA), adaptée d'après Weldteam (2021) ("Soudage MMA," 2021)

b. Soudage (GMA, Gaz Metal Arc) : soudage à l'arc semi-automatique

Le GMA utilise une électrode en fil continu comme métal d'apport et un gaz de protection fourni extérieurement (Figure 2). Le fil est souvent en acier doux, généralement de couleur cuivre parce qu'il est galvanisé avec une mince couche de cuivre pour le protéger

de la rouille, améliorer la conductivité électrique, augmenter la vie de la pointe de contact, et accroître les performances de l'arc. Le gaz de protection s'écoule à travers le pistolet et sort de la buse avec le fil de soudage pour protéger le bain de fusion. Le métal fondu est très réactif à l'oxygène, l'azote et l'hydrogène de l'atmosphère.

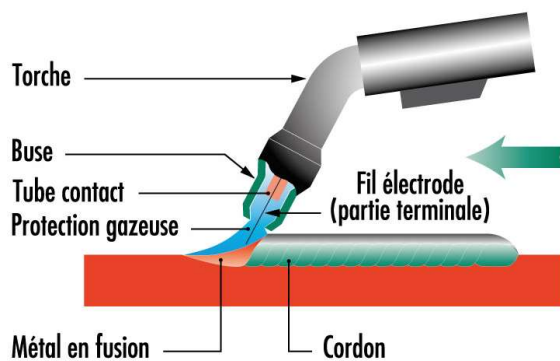


Figure 2 : Principe du soudage à l'arc sous forme de gaz métallique (Gaz Metal Arc, GMA) et illustration d'un soudeur utilisant le GMA, modifié d'après SAF-FRO (2021) ("Soudage MIG MAG," 2021)

c. Soudage GTA (Gas Tungsten Arc) : soudage à l'arc à l'électrode non fusible

Le soudage GTA exploite la chaleur générée par un arc électrique entre les métaux à assembler et utilise une électrode tungstène, située au niveau de la torche de soudage (Figure 3). La zone de l'arc est ensuite entourée d'une enveloppe de gaz inerte afin de protéger le bain de fusion et l'électrode tungstène. Le soudeur apporte directement à la main le métal d'apport, sous forme de baguette, dans le bain de fusion. Ce procédé permet au soudeur une grande précision. De ce fait, il est plus couramment utilisé pour souder des parois minces, d'une épaisseur comprise entre 8 et 10 mm.



Figure 3 : Principe du soudage à l'arc sous gaz (Gas Tungsten Arc, GTA) et illustration du soudage GTA, modifié d'après SAF-FRO (2021) ("Soudage TIG," 2021)

d. Soudage FCA (Flux-Cored Arc) : Soudage à l'arc avec fil fourré

Le FCA utilise un fil fourré qui produit immédiatement son propre gaz de protection afin de protéger l'arc de l'air ambiant et des contaminants de l'acier. Le métal déposé forme très rapidement un laitier qui recouvre et protège la soudure de l'atmosphère. Ce type de soudage est principalement réalisé sur des applications en acier doux en extérieur. On pourrait définir ce procédé comme étant un soudage semi-automatique au fil fourré, en effet, la méthode de soudage GMA utilise une électrode en métal solide, tandis que le procédé FCA utilise une électrode tubulaire creuse remplie de flux. (Description des procédés de soudage, 2021)

3. Caractéristiques des émissions des FS

a. Composition des FS

Les différents procédés de soudage ont la particularité de générer des fumées dont la composition et la vitesse de production varient selon de nombreux paramètres. (Antonini, 2003) Le courant de soudage, les gaz de protection, et même la technique et l'habileté du soudeur peuvent influencer la nature et l'intensité des fumées émises ; celles-ci sont donc très caractéristiques des différents procédés de soudage (Tableau 1). Bien que les constituants des FS proviennent à 95 % des métaux d'apports, le revêtement de l'électrode, les gaz de protection, les flux et la présence d'éventuels revêtements ou de contaminants sur le métal de base contribuent également à la composition de l'aérosol de soudage. (Guerreiro et al., 2014)

Tableau 1 : Polluants émis en fonction des procédés de soudage et des métaux d'apports, modifié d'après ED6132, (Ricaud, 2018)

Procédé	Matériau d'apport	Constituant(s) principal(aux) des fumées
Soudage à la flamme	Acier non allié, faiblement allié (éléments d'alliage < 5 %)	Dioxyde d'azote
Soudage manuel à l'arc avec électrodes enrobées	Acier non allié, faiblement allié (éléments d'alliage < 5 %)	Oxydes de fer
	Acier chrome-nickel ($\leq 20\%$ Cr et $\leq 30\%$ Ni)	Composés du chrome VI, oxyde de manganèse*
	Nickel, alliages nickel (> 30 % Ni)	Oxyde de nickel, oxyde de cuivre
Soudage MAG avec dioxyde de carbone	Acier non allié, faiblement allié (éléments d'alliage < 5 %)	Oxydes de fer, monoxyde de carbone
Soudage MAG avec mélange gazeux	Acier non allié, faiblement allié (éléments d'alliage < 5 %)	Oxydes de fer
	Acier chrome-nickel fil plein ($\leq 20\%$ Cr et $\leq 30\%$ Ni)	Oxyde de nickel, oxyde de manganèse*
	Acier chrome-nickel fil fourré ($\leq 20\%$ Cr et $\leq 30\%$ Ni)	Composés du chrome VI, oxyde de manganèse*
Soudage MIG	Nickel, alliages nickel (> 30 % Ni)	Oxyde de nickel, oxyde de cuivre, ozone
	Aluminium pur, alliages aluminium-silicium	Ozone, oxyde d'aluminium
	Autres alliages d'aluminium	Oxyde d'aluminium, ozone

Tableau 1 (suite) : Polluants émis en fonction des procédés de soudage et des métaux d'apports, modifié d'après ED6132, INRS (Ricaud, s.d.)

Procédé	Matériau d'apport	Constituant(s) principal(aux) des fumées
Soudage TIG	Acier non allié, faiblement allié (éléments d'alliage < 5 %)	Oxydes de fer, ozone
	Acier chrome-nickel (≤ 20 % Cr et ≤ 30 % Ni)	Oxydes de nickel, ozone
	Nickel, alliages nickel (> 30 % Ni)	Ozone, oxydes de nickel

Les éléments métalliques en suspension dans l'atmosphère sont formés quand le métal vaporisé se condense en particules de très petites tailles (Figure 4). Lorsque le métal vaporisé entre en contact avec l'oxygène de l'air, il s'oxyde, et c'est pourquoi les oxydes de métaux sont les principaux composants des FS.

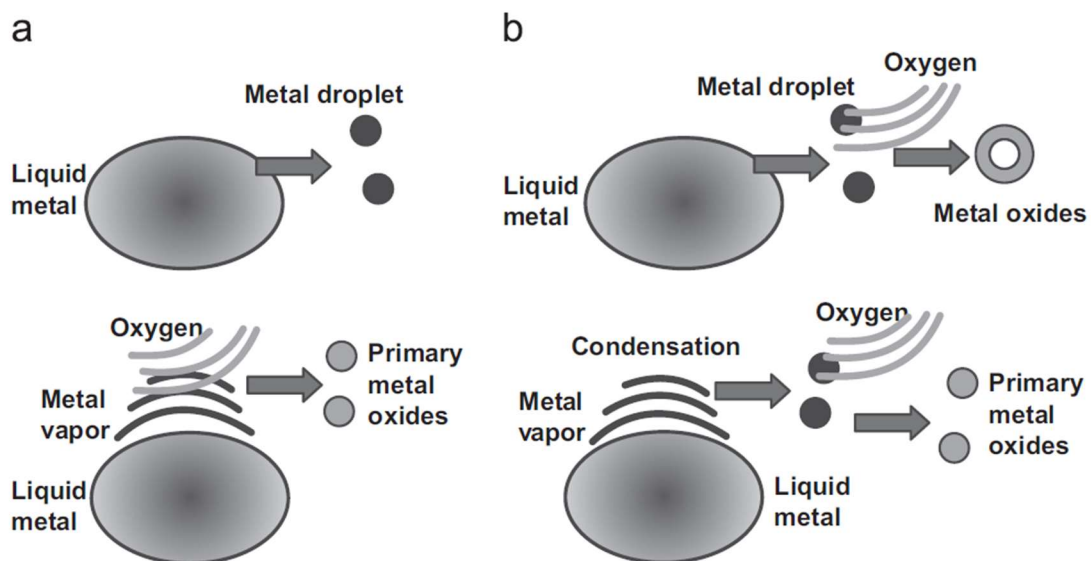


Figure 4: Mécanisme de formation des oxydes de métaux, adapté d'après Popović et al. (2014a)

Le Fer (Fe) est le métal retrouvé majoritairement dans la plupart des FS. Il représente généralement plus de 80 % des fumées d'acier doux qui n'ont longtemps été considérés que légèrement toxiques avec une faible probabilité de provoquer des pathologies respiratoires chroniques. L'accumulation de Fe dans les poumons des soudeurs de longue date était

associée à la sidérose. Cependant, à l'heure actuelle, des données épidémiologiques montrent que les soudeurs d'acier doux, malgré une exposition moindre aux métaux classés cancérigènes, sont exposés à un risque accru de cancer du poumon. Les oxydes de fer contenus dans les FS sont fortement suspectés d'être des médiateurs importants de leur toxicité. (Paris et al., 2010) Ces observations ont été depuis supportées par les conclusions des travaux de Falcone et al. (2018), qui rapportent, dans une étude *in vivo*, que l'inhalation de FS issues du procédé de soudage à l'acier doux, riche en Fe, favoriserait l'apparition de tumeurs pulmonaires. (Falcone et al. 2018)

Le manganèse (Mn) est l'un des composants des aciers doux et des alliages d'acier. Il permet d'augmenter la dureté et la résistance de la soudure en empêchant l'oxygène d'attaquer le métal en fusion. L'exposition professionnelle prolongée à des concentrations en Mn supérieures à 1 mg/m³ est associée à un risque accru de troubles neurologiques. (Zeidler-Erdely et al. 2019)

D'autres éléments tels que le zinc (Zn), l'aluminium (Al), le cadmium (Cd), le cuivre (Cu), le plomb (Pb), les fluorures (F⁻), la silice (SiO₂), le baryum (Ba), le magnésium (Mg), le calcium (Ca), l'étain (Sn), le chrome (Cr) et le nickel (Ni) peuvent être présents dans les FS en fonction du procédé de soudage et des matériaux utilisés. L'acier doux et l'acier inoxydable sont les matériaux les plus fréquemment utilisés. (Gomes et al., 2014) Les FS produites à partir d'acier doux sont majoritairement composées de Fe (> 80%) et contiennent du Mn alors que celles issues d'électrodes en acier inoxydable comprennent environ 20 % de Cr et 10 % de Ni en plus du Fe et du Mn.

La spéciation chimique et notamment l'état d'oxydation des différents métaux présents dans les FS peut fortement conditionner leur toxicité. A titre d'exemple, dans les FS issues de procédé utilisant de l'acier inoxydable, le Cr est présent en quantités significatives dans des états d'oxydation trivalent (CrIII) et hexavalent (CrVI). Du fait de sa faible biodisponibilité, le CrIII est faiblement toxique comparativement au CrVI qui lui est classé depuis 1990 comme cancérigène (Groupe 1) par le CIRC, en raison de sa capacité à provoquer des cancers du poumon, et parmi les agents cancérigènes du groupe 1A par l'Union Européenne. (Popović et al., 2014)

En outre, plusieurs gaz irritants pour les voies oculaires et respiratoires, tels que le monoxyde de carbone (CO), l'ozone (O₃) et les oxydes d'azote (NO_x), issus des différents gaz de protection et flux utilisés, peuvent être générés en quantités significatives lors du soudage à l'arc (Tableau 2).

Tableau 2 : Composition des fumées de soudage en fonction des différents procédés utilisés (modifié selon Schoonover et al. (2011))

Exposition	MMA* (n=7)	GMA* (n=6)	GTA* (n=2)
FS (µg/m ³)	630 (150-2100)	510 (140-1700)	46-77
Fe	570 (130-2000)	450 (120-1500)	38-64
Mn	32 (8-75)	51 (15-150)	4,5-6,7
Al	4 (1,1-9,6)	2,3 (0,32-16)	0,33-0,76
Cu	3,3 (0,74-9,5)	2 (0,66-4,6)	0,37-0,53
Zn	2,6 (0,95-3,7)	0,78 (0,35-4,9)	0,96-1,2
Cr	1,8 (0,051-1,90)	0,46 (0,14-1,6)	0,29-1,8
Ti	0,65 (1,4-7,6)	0,79 (0,33-2,8)	0,13-0,23
Sn	0,57 (0,082-0,68)	0,10 (0,047-0,42)	0,081-0,24
Ni	0,36 (0,14-2,5)	0,29 (0,11-1,2)	0,18-1,7
Ba	0,34 (0,088-1,2)	0,22 (0-1,8)	0,11-0,16
Pb	0,15 (0,074-0,33)	0,12 (0,052-0,53)	0,057-0,10
Zr	0,14 (0,037-0,39)	0,035 (0,014-0,13)	0,028-0,084
Mo	0,12 (0,036-0,66)	0,075 (0,027-0,32)	0,023-0,029
Sb	0,10 (0,016-0,080)	0,024 (0,012-0,095)	0,0057-0,0098
No ₂ , ppbv	64 (52-220)	38 (37-61)	48-52
O ₃ , ppbv	4,7 (0-20)	12 (0-37)	0,46-0,75

* Soudage à l'arc manuel blindé au métal (Manual Metal Arc, MMA), soudage à l'arc sous forme de gaz métallique (Gaz Metal Arc, GMA), soudage à l'arc sous gaz (Gas Tungsten Arc, GTA).

b. Taille des particules

La toxicité des FS est influencée par leur composition chimique mais également par leurs caractéristiques physiques et, en particulier, par la taille des particules émises. En effet, la taille des particules détermine les mécanismes de leur déposition dans l'arbre respiratoire ; c'est pour cela qu'elle joue un rôle très important dans leur comportement et leurs effets sur la santé.

Bien que la taille et la proportion des particules varient selon les procédés, une part importante des particules primaires présente un diamètre inférieur à 1 μm , voire 0,1 μm . Les particules générées pendant le soudage sont généralement de trois types selon le mécanisme de leur formation :

- ▶ Les particules de diamètre $> 1 \mu\text{m}$ sont formées pendant le processus de fusion par dispersion à haute température à partir du bain de métal liquide à la base du soudage.
- ▶ Les particules ultrafines de diamètre $< 0,1 \mu\text{m}$ sont quant à elles produites par évaporation au cours d'une réaction entre la base du soudage et l'arc électrique.
- ▶ Les agglomérats de diamètre compris entre 0,1 et 2 μm sont issus de la collision de particules ultrafines. (Lin et al. 2015)

De nombreuses études montrent que la distribution en taille des particules peut varier en fonction du procédé utilisé. Ainsi, Antonini et al. (2007) puis Schoonover et al. (2011) ont rapporté que le procédé GMA génère des particules de taille médiane comprises entre 100 et 300 nm. (Figure 5)

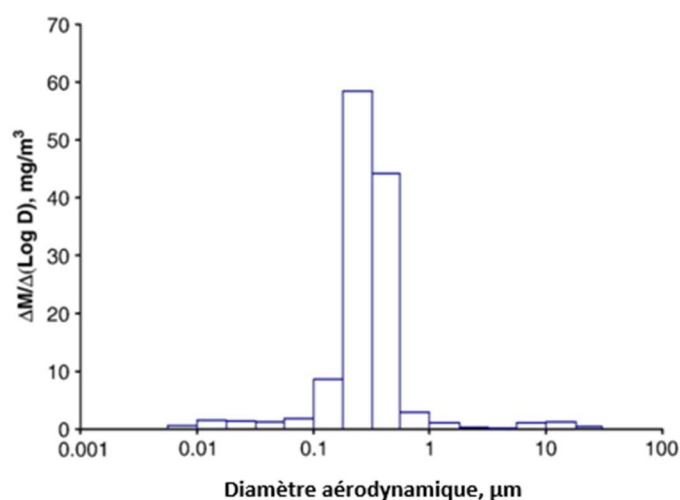


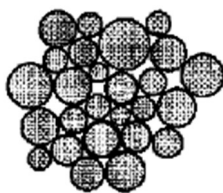


Figure 5: Exemple de distribution granulométrique de FS, modifié selon Antonini et al. (2007a)

Brand et al. (2013) ont montré que les procédés de soudage à l'électrode enrobée et MIG/MAG génèrent des particules d'un diamètre aérodynamique équivalent d'environ 100-200 nm tandis que le procédé GTA émettait presque exclusivement des particules d'un diamètre aérodynamique équivalent inférieur à 50 nm. (Brand et al., 2013) (Tableau 3)

Tableau 3 : Taille, forme et morphologie des particules des fumées de soudage, modifié selon BGI 593, (Hazardous substances in welding and allied processes, BGI 593, s.d.)

Procédé	Métal d'apport	Particules			
		Forme des particules individuelles	Diamètre des particules individuelles	Longueur de la chaîne	Diamètre des agglomérats
MMA*	Acier-Cr-Ni	Forme de Boule	> 50 nm	Quelques µm	> 500 nm
			> 400 nm	Quelques µm	
GMA*	Acier Cr-Ni	Forme de Boule	> 10 nm	> 100 nm	> 100 nm
	Alliage aluminium	Forme de Boule	Entre 10 et 50 nm	/	/
			> 400 nm	/	
Forme					

* Soudage à l'arc manuel blindé au métal (Manual Metal Arc, MMA), soudage à l'arc sous forme de gaz métallique (Gaz Metal Arc, GMA).

4. Devenir des particules chez l'homme

a. Rappels sur l'appareil respiratoire

Les voies respiratoires sont les principales voies de pénétration et d'absorption des polluants inhalés dans l'organisme. La respiration est en effet un phénomène qui apporte l'oxygène indispensable à l'organisme mais elle constitue également une porte d'entrée idéale pour les polluants présents dans l'air inhalé.

Le système respiratoire comprend les voies aériennes et le parenchyme pulmonaire (Figure 6). Les voies aériennes se composent de deux régions distinctes :

- Les voies aériennes supérieures (VAS) comprenant la bouche, le nez, le pharynx et le larynx
- L'arbre trachéobronchique ou voies aériennes inférieures (VAI) est constituée de la trachée, des bronches, des bronchioles et des alvéoles pulmonaires

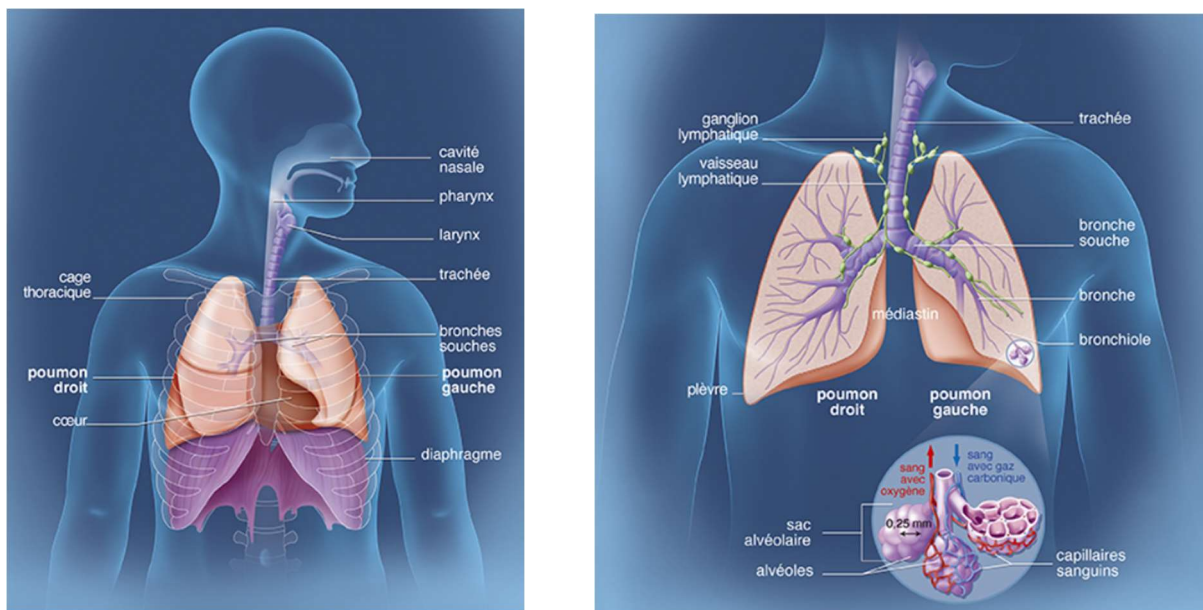


Figure 6: Anatomie du système respiratoire chez l'Homme, modifié selon Anatomie du système respiratoire chez l'Homme (2018) ("Appareil respiratoire," 2018)

Des fosses nasales aux alvéoles, les voies aériennes sont recouvertes d'un épithélium dont les cellules ont des morphologies et des fonctions différentes suivant leur localisation (Figure 7). (Bardou 2009) Dans les VAS, l'épithélium bronchique, de structure pseudostratifiée est principalement composé de cellules mucipares ou caliciformes à mucus, productrices de mucus, de cellules ciliées permettant d'exporter les sécrétions hors du poumon et de cellules basales progénitrices des autres types cellulaires.

Les bronchioles ont un épithélium constitué de cellules ciliées et de cellules de Clara, appelées également cellules Club. Ces cellules produisent des composés détoxifiants et antimicrobiens qui contribuent à la défense de la muqueuse respiratoire. Les cellules Club, peuvent, comme les cellules basales, se répliquer et/ou se différencier en cellules ciliées.

Les alvéoles constituent le parenchyme pulmonaire et sont les unités structurales et fonctionnelles du système respiratoire. Le poumon humain comporte environ 300 millions d'alvéoles où s'effectuent les échanges gazeux entre le dioxygène de l'air et de dioxyde de carbone produit dans l'organisme. Les alvéoles pulmonaires sont composées d'un épithélium non cilié comprenant des pneumocytes de type I qui assurent les échanges gazeux tandis que les cellules de type II sécrètent le surfactant pulmonaire qui intervient dans le maintien de la structure de l'alvéole grâce à ses propriétés tensio-actives.

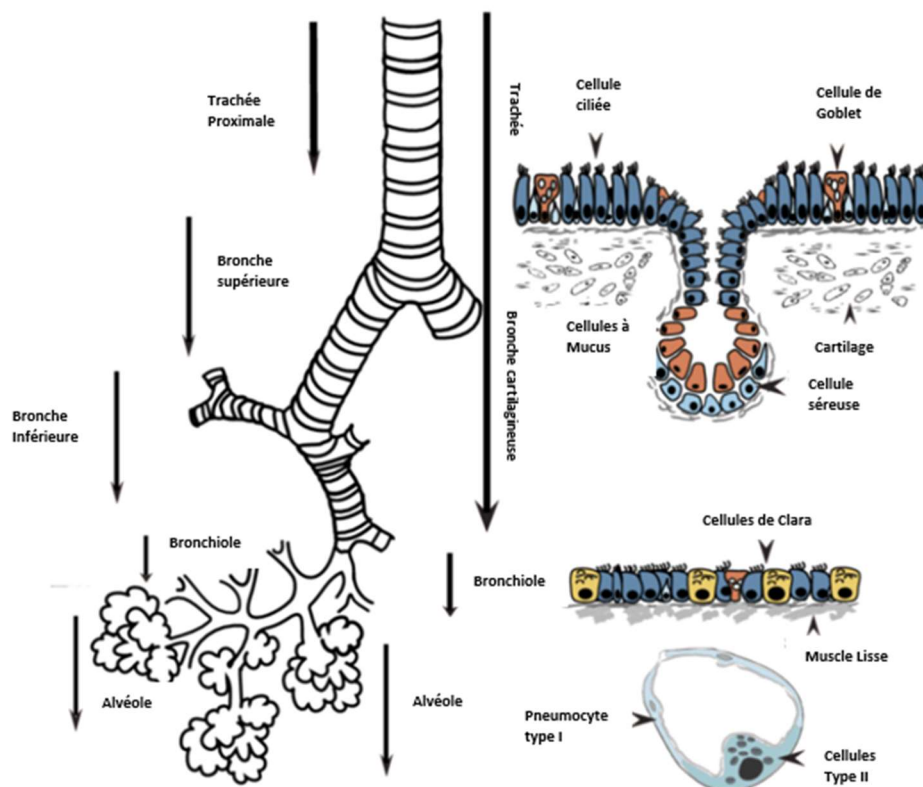


Figure 7 : Illustration schématique des voies respiratoires inférieures humaines, modifié d'après Collawn et al (2012)

Situé à l'interface entre l'organisme et l'environnement, l'épithélium respiratoire joue ainsi un rôle essentiel de barrière physique contre les agressions chimiques (e.g., polluants gazeux, particules) et/ou biologiques (i.e., microorganismes, pollens) extérieures et constitue par conséquent un élément central des systèmes de défenses des poumons vis à vis des aérocontaminants. Les différentes cellules spécialisées qui le composent remplissent un certain nombre de fonctions essentielles au maintien de son intégrité. En particulier, l'action combinée de la clairance mucociliaire, assurée par l'activité coordonnée des cellules sécrétoires et des cellules ciliées, et de la clairance macrophagique, liée aux propriétés phagocytaires des macrophages alvéolaires, permet, en association avec d'autres processus de défense, une protection efficace des tissus pulmonaires.

L'épithélium peut être toutefois victime de dommages pouvant contribuer de manière non négligeable à la genèse d'affections pulmonaires telles que la BronchoPneumopathie Chronique Obstructive (BPCO), l'asthme ou toutes autres pathologies au cours desquelles l'épithélium respiratoire est remodelé par des réponses inflammatoires et immunitaires locales récurrentes. (Crystal et al., 2008) (Knight and Holgate, 2003)

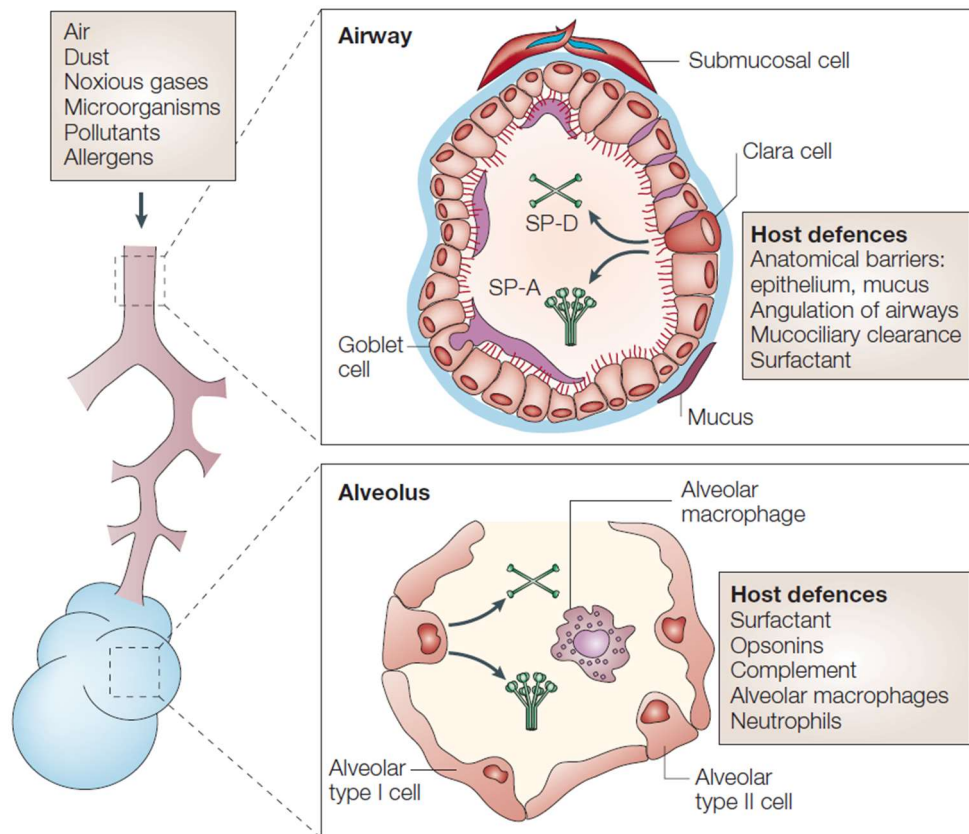


Figure 8 : Mécanismes de défense pulmonaire modifié selon Wright (2005)

b. Distribution des particules dans les poumons

Les particules peuvent se déposer au niveau de trois régions distinctes de l'arbre respiratoire :

- Les voies respiratoires supérieures
- L'arbre trachéobronchique
- Les alvéoles pulmonaires.

Ces régions ont des caractéristiques anatomiques et des voies de déposition des particules différentes (Figure 9). La vitesse à laquelle les particules se déposent et la durée pendant laquelle elles persistent dans une région varient d'une région à l'autre. ("Morphometric, model, Annals of the ICRP, 1994.pdf," n.d.) Le dépôt des particules au niveau des différentes sections de l'arbre respiratoires emprunte des schémas non uniformes. Ainsi, la densité et le site du dépôt ont une grande influence sur la réponse à une substance toxique. La taille, la distribution de la taille, la forme, la charge, la densité et l'hygroscopicité des particules inhalées influencent leur dépôt dans les poumons qui est régit par trois principaux mécanismes (Figure 10) :

- ▶ L'impaction est le dépôt inertiel d'une particule sur la surface des voies aériennes. Elle se produit principalement au niveau des voies aériennes extra thoraciques et les grandes voies conductrices, les VAS, et concerne les particules de taille supérieure à 5 μm .
- ▶ La sédimentation gravitationnelle se produit au niveau des petites voies aériennes où la vitesse de l'air est faible. Elle concerne les particules de taille comprise entre 0,5 et 5 μm .
- ▶ Les particules de taille submicronique inférieures à 0,5 μm acquièrent un mouvement aléatoire, aussi appelé « mouvement Brownien », est semblable à celui des molécules de gaz dans l'air. Plus la particule est petite, plus cette agitation est énergique. Lorsque des particules sont agitées par un mouvement aléatoire, leur dépôt sur les parois des poumons se fait surtout au hasard. Le mouvement Brownien peut entraîner le dépôt de particules par diffusion, en particulier dans les petites voies respiratoires et les alvéoles, où le débit d'air est très faible. La petite taille de ces particules leur permet de traverser la barrière épithéliale très rapidement et de passer dans la circulation systémique puis vers d'autres organes. (Pilcer and Amighi, 2010)

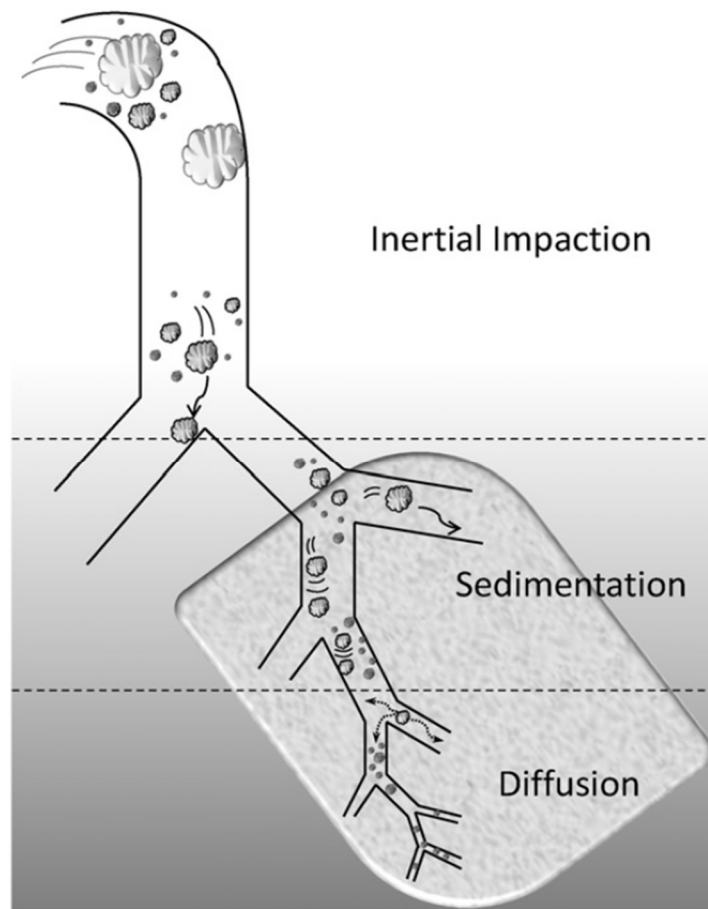


Figure 9 : Mécanismes de dépôt de particules dans les poumons, adapté selon Cavalho et al. (2011)

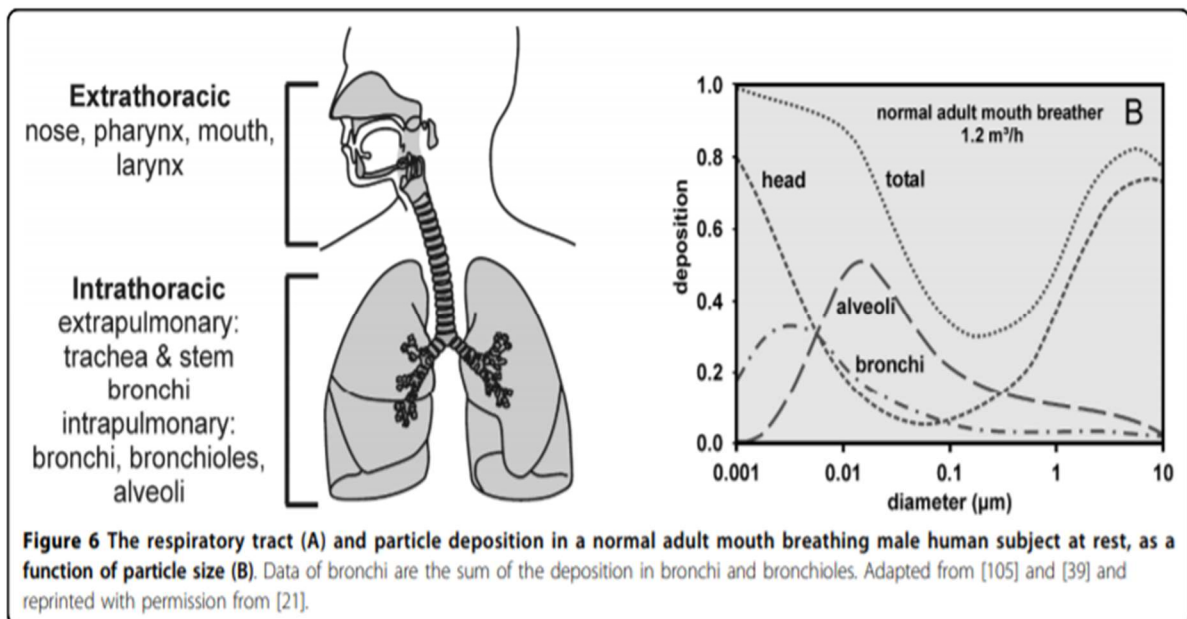


Figure 10 : Dépôt des particules dans les voies respiratoire, modifié selon Geiser et al.(2010)

c. Mécanismes de clairance pulmonaire

i. Clairance mucociliaire :

Afin d'assurer la bonne qualité de l'air qui arrive au niveau des parties distales de l'arbre respiratoire, les voies aériennes de conduction doivent constamment piéger et éliminer les agents pathogènes microbiens et les composés particulaires qui polluent l'air inspiré. Étant donné leur géométrie angulaire et les poils qui tapissent leur muqueuse, les VAS filtrent et retiennent la majorité des particules inhalées. La ramification de l'arbre bronchique permet également le dépôt de ces particules sur l'épithélium bronchique par simple sédimentation ou par impaction. Engluées alors dans le mucus qui recouvre les voies aériennes, les particules sont propulsées par les cils vibratoires de l'épithélium bronchique vers le carrefour aéro-digestif où elles sont éliminées par déglutition ou expectoration.

Le mucus est un film liquidien d'épaisseur variable qui représente un véritable écran protecteur de l'épithélium. Élaboré essentiellement par les glandes bronchiques et les cellules muqueuses de l'épithélium de surface, il est disposé en deux couches superposées : une couche superficielle de viscosité élevée ou phase « gel », composée essentiellement de mucines, des glycoprotéines particulièrement riches en sucres, de très hautes masses moléculaires, dans laquelle s'engluent les aérocontaminants, et une couche profonde fluide ou phase « sol », principalement composée d'eau et de mucines de faibles masses moléculaires, dans laquelle battent les cils vibratiles des cellules ciliées. (Widdicombe, 1997)

L'épaisseur de la couche aqueuse périciliaire est inférieure à la longueur des cils des cellules épithéliales sous-jacentes : une épaisseur exagérée de cette phase supprime le couplage entre les cils et le tapis muqueux sus-jacent, à l'inverse, une quantité insuffisante de liquide périciliaire gêne le battement des cils qui sont englués dans le mucus. La phase gel des sécrétions bronchiques est discontinue dans les petites voies aériennes et continue dans les voies supérieures. Cette différence résulte de la présence de glandes muqueuses et de l'impaction plus importante des particules inhalées qui stimulent la sécrétion de mucus au niveau des grosses bronches. Les propriétés rhéologiques et de surface du mucus conditionnent son épuration et l'efficacité de la clairance. (Wanner et al. 1996)

Le mécanisme de clairance mucociliaire est coordonné par l'interaction de ces composants et assure trois fonctions principales (Bustamante-Marin and Ostrowski, 2017) (Figures 11 et 12) :

- ▶ Il sert de barrière mécanique en piégeant les particules dans le liquide de surface et en les éliminant de l'arbre trachéobronchique par l'action des cils.
- ▶ Il agit grâce au liquide de surface comme un écran chimique du fait de ses propriétés antioxydantes.
- ▶ Le mucus de surface assure une fonction de barrière biologique qui empêche les micro-organismes et les cellules inflammatoires, d'adhérer et de migrer à travers l'épithélium respiratoire.

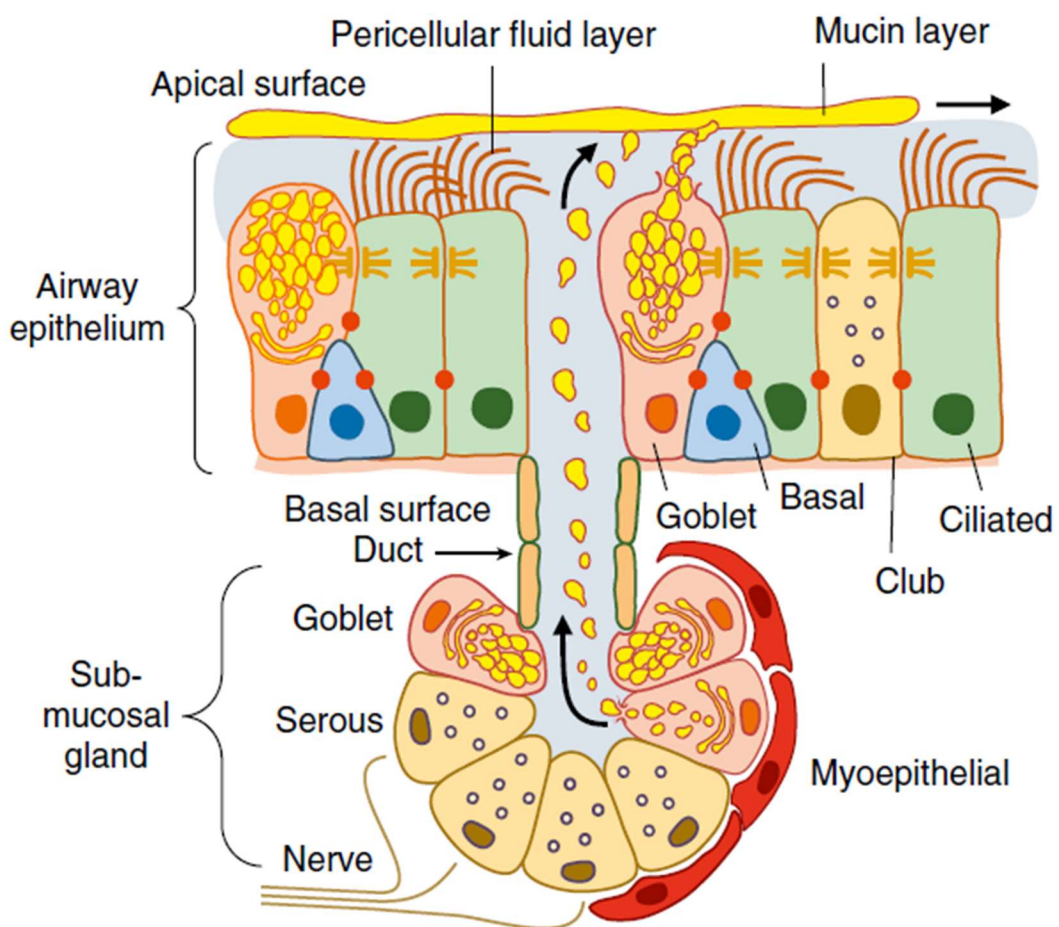


Figure 11 : Structure et fonction des défenses innées de l'hôte dans les voies respiratoires conductrices. Modifié selon Whitsett et Alenghat (2015).

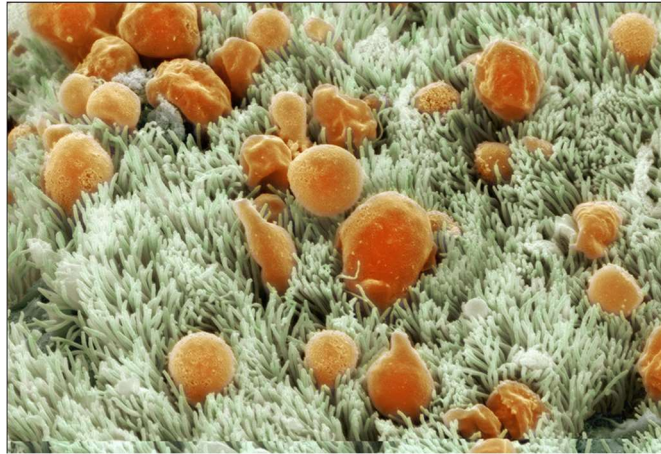


Figure 12 : Epithélium pulmonaire trachéal observé au microscope électronique à balayage, modifié d'après Galanopoulo (2020)

ii. **Clairance macrophagique :**

L'épuration mucociliaire a pour objectif de limiter, voire d'empêcher l'accès des agents pathogènes inhalés aux voies respiratoires inférieures. La toxicité de ces agents est directement liée à leur capacité à atteindre ces voies profondes (Figure 13). Les anomalies de la clairance mucociliaire, qu'elles soient liées à une altération de la sécrétion de liquide, à un dysfonctionnement ciliaire, à l'absence de toux ou à la perturbation des cellules épithéliales qui tapissent les voies respiratoires, contribuent à la pathogénèse de troubles pulmonaires chroniques courants. Bien que le mucus et les autres sécrétions épithéliales des voies respiratoires jouent un rôle essentiel dans la protection des poumons lors de lésions aiguës, une altération de la clairance du mucus après une hyperproduction chronique de mucus entraîne une obstruction des voies respiratoires et une infection, qui contribuent à la morbidité des troubles pulmonaires courants, notamment la bronchopneumopathie chronique obstructive, l'asthme, la fibrose pulmonaire idiopathique, la mucoviscidose, la bronchiectasie et la dyskinésie ciliaire primaire. (Fahy and Dickey, 2010) (Whitsett, 2018)

Une très faible proportion des particules inhalées atteint les alvéoles pulmonaires ; en particulier, celles de taille $< 1 \mu\text{m}$ peuvent atteindre les voies distales. L'épithélium cilié s'arrêtant aux bronchioles terminales, les alvéoles ne sont donc pas directement épurées par la clairance mucociliaire mais grâce à l'intervention des macrophages alvéolaires qui, après phagocytose des particules, migrent jusqu'à l'épithélium cilié des bronchioles terminales et

sont éliminés avec les sécrétions bronchiques. La clairance macrophagique est lente ; elle se mesure en jours, mois voire années. (Lippmann et al. 1980)

Les macrophages alvéolaires forment la population de cellules immunitaires dominantes dans les poumons et peuvent représenter jusque 90 % de celles-ci chez un individu en bonne santé. Ils jouent des rôles indispensables dans l'immunité innée comme dans l'immunité adaptative. À l'état d'équilibre et en l'absence d'infection, les macrophages alvéolaires agissent comme des sentinelles et surveillent l'environnement. Ils forment la première barrière de défense contre les agents pathogènes et coordonnent la pénétration des leucocytes dans l'immunité innée. Ils contribuent au maintien de l'homéostasie alvéolaire en assurant l'élimination des antigènes et la dégradation des microbes, des cellules apoptotiques et néoplasiques par phagocytose. (Gordon and Martinez, 2010) Les macrophages interagissent avec les lymphocytes B et T grâce à des systèmes basés sur la sécrétion d'enzymes, de radicaux réactifs, de cytokines, de chimiokines et de métabolites de l'acide arachidonique, de même qu'à la communication de cellule à cellule. (Gohy et al., 2019)

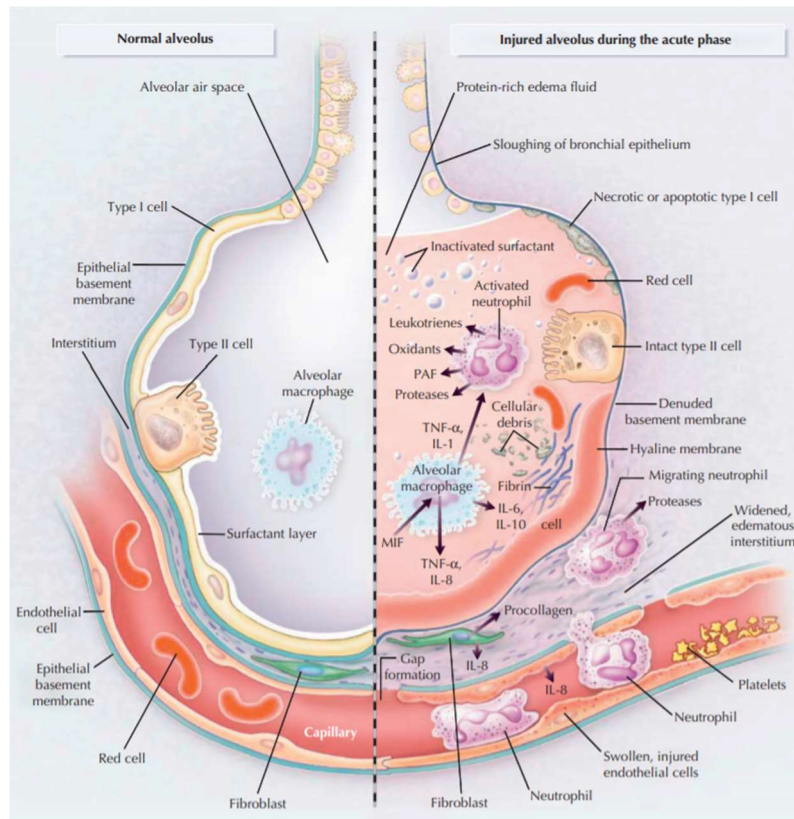


Figure 13 : Alvéole normale (gauche) et alvéole lésée lors d'un syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA) (droite), modifié selon Briot et al. (2012)

Les macrophages alvéolaires sont capables d'acquérir des phénotypes bien définis par le phénomène de polarisation en réponse à des signaux environnementaux variés, qui peuvent être des parties ou des produits pathogènes, des cellules lésées, des débris cellulaires ou des lymphocytes, et lors d'épisodes pathologiques. Leur activation dépend des signaux qu'ils reçoivent de leur environnement, qui peuvent induire l'inflammation lors de la destruction du tissu lésé ou la réparation des lésions. Ainsi, le phénotype fonctionnel des macrophages (M1 ou M2) permet de déclencher, instruire ou suspendre la réponse immunitaire adaptative. (Arora et al. 2018)

Les multiples propriétés des différentes variantes phénotypiques des macrophages ont des effets non négligeables sur les tissus. Une variété spécifique peut avoir une action sur le maintien de l'homéostasie, avoir un effet défensif pendant la maladie ou peut participer à la pathogenèse et la progression de la maladie. Les mécanismes de contrôle, l'activité des macrophages, la libération d'une diversité de produits pro-inflammatoires, cytotoxiques et fibrogènes renforcent les lésions tissulaires et la pathogenèse des maladies inflammatoires chroniques. (Vadász et Sznajder 2017)

Dans un contexte pathologique, comme celui de la BPCO, les macrophages présentent une capacité phagocytaire considérablement réduite. (Jubrail et al. 2017) L'asthme est également une maladie inflammatoire qui implique une altération de la fonction phagocytaire. La diminution de la clairance microbienne due à l'altération de la phagocytose des macrophages bronchiques peut nécessiter l'implication des neutrophiles pour résister à une infection ultérieure, processus qui peut à son tour exacerber l'asthme. (Lane et al. 1994)

Au regard de ces éléments sur les modalités d'absorption et de déposition, puis d'élimination des particules dans le tractus respiratoire, les particules de FS, de natures et de tailles différentes en fonction du procédé de soudage par lequel elles sont générées, pourraient être facilement absorbées mais difficilement éliminées. L'équilibre entre ces deux mécanismes antagonistes conditionnera leur déposition et leur rétention, et, par conséquent leur possibilité d'exercer, en fonction de leur composition chimique et de leur réactivité biologique, leur toxicité. Il n'existe actuellement que peu de données sur la toxicité de la fraction particulaire ultrafine des FS. De même, il est actuellement très difficile d'évaluer les niveaux d'exposition des travailleurs à ces PUF.

5. Exposition professionnelle

L'exposition professionnelle aux FS ne se limite pas qu'aux soudeurs de profession. En plus des travailleurs portant le titre de soudeur, il existe d'autres catégories professionnelles pour lesquelles le soudage est une tâche courante, exercée régulièrement ou par intermittence. Certaines enquêtes ont même démontré que le nombre de salariés non-soudeurs exposés aux FS était plus important que les soudeurs attitrés. (Lillenberg, 2008)

Les niveaux d'exposition des salariés aux FS sont difficiles à établir car ils peuvent être influencés par de nombreux déterminants. Le taux de génération ainsi que la composition des FS diffèrent selon le métal travaillé et le procédé de soudage utilisé, et sont également affectés par le courant de soudage, les gaz de protection ainsi que par la technique et la compétence du soudeur. La concentration des FS à proximité des soudeurs est également fonction du volume de l'espace dans lequel la soudure est effectuée et de l'efficacité de l'évacuation des FS par la ventilation. C'est pour toutes ces raisons que les niveaux d'exposition des salariés aux FS sont difficiles à déterminer.

Il existe néanmoins dans la littérature de nombreuses études dans lesquelles les concentrations atmosphériques en FS émises ont été mesurées. Le Tableau 4 résume les concentrations de FS générées par divers procédés de soudage.

Ces différentes études révèlent que les niveaux d'émissions de FS diffèrent fortement en fonction des procédés utilisés et des conditions dans lesquelles ils sont utilisés. Comme indiqué dans le Tableau 4, les niveaux d'émissions varient de 0,4 à 12,9 mg/m³ pour la fraction respirable des FS et de 0,16 à 14,9 mg/m³ pour la fraction particulaire totale des FS. Ces niveaux d'exposition aux particules de FS laissent craindre l'apparition de pathologies respiratoires chez les salariés régulièrement exposés.

Tableau 4 : Mesure de l'exposition professionnelle aux fumées de soudage (FS) (IARC, 2018b)

Type d'étude	Procédé soudage	Fraction /durée d'exposition	Population étudiée	Conclusion	Référence
Etude expérimentale	FCAW : 9 salariés GMAW : 5 salariés	Fraction respirable des FS. Durée moyenne de la mesure = 3,4 h en 2008 et 3,8 h en 2011.	12 Salariés en 2008 sans protection et 2011 avec protection dont 7 avaient participé à l'étude de 2008.	Réduction de la moyenne géométrique des particules respirables pourrait être réduite de 4,1 mg/m ³ en 2008 à 0,5 mg/m ³ en 2011.	(The WELDOX Study Group, 2013)
Etude transversale	GMAW fil plein = 95 FCAW = 47 GTAW = 66 SMAW = 20 Acier doux = 83 Inox = 148	Fraction respirable des FS. Durée moyenne des mesures individuelles = 3,5 h, (2 à 5 h).	241 Salariés (5 chantiers navals, 13 fabricants de conteneurs et de navires, 4 fabricants de machines et d'outils). Ventilation = 54 Espaces confinés = 23	GMAW = 4,41 mg/m ³ FCAW = 12,90 mg/m ³ GTAW < 0,96 mg/m ³ SMAW = 1,65 mg/m ³	(Lehnert et al., 2012)
Etude expérimentale	GMAW FCAW SMAW	Fraction respirable des FS.	60 Soudeurs chantier naval.	GMAW = 9,04 mg/m ³ FCAW = 4,84 mg/m ³ SMAW = 5,88 mg/m ³	(Mehrfar et al 2019)

Tableau 4 (suite) : Mesure de l'exposition professionnelle aux fumées de soudage (FS) (IARC, 2018b)

Type d'étude	Procédé soudage	Fraction /durée d'exposition	Population étudiée	Conclusion	Référence
Cohorte	GMAW acier doux	Fraction respirable des FS. Durée moyenne des mesures individuelles = 415 min.	108 Salariés d'11 entreprises différentes : Fabrication de rouleaux d'asphalte (+ aspiration) Production de chariots élévateurs x3 (+aspiration) - Fabrication de camions benne (+aspi) - production de tables élévatrices (+ aspi) Fabrication d'éoliennes (ventilation naturelle) - Production de Wagons (ventilation naturelle) - Fabrication de chaudières + pompes à chaleur (ventilation naturelle) - Fabrication poêles (aspiration réduite) Fabrication de pièces automobiles (+ aspiration).	Exposition aux poussières respirables : Moyenne géométrique =1,3 mg/m ³ Entreprise1 : 1,5 mg/m ³ Entreprise 2 : 2,3 mg/m ³ Entreprise 3 : 2,3 mg/m ³ Entreprise 4 : 1,2 mg/m ³ Entreprise 5 : 5,7 mg/m ³ Entreprise 6 : 3,2 mg/m ³ Entreprise 7 : 3 mg/m ³ Entreprise 8 : 3,1 mg/m ³ Entreprise 9 : 0,4 mg/m ³ Entreprise 10 : 1,4 mg/m ³ Entreprise11 : 1,6 mg/m ³	(Hedmer et al., 2014)

Tableau 4 (suite) : Mesure de l'exposition professionnelle aux fumées de soudage (FS) (IARC, 2018b)

Type d'étude	Procédé soudage	Fraction /durée d'exposition	Population étudiée	Conclusion	Référence
Etude expérimentale	GMAW FCAW GTAW SMAW	Particules totales.	2065 mesures de particules totales. Différents pays, industries métiers et procédés.	GMAW = 9,19 mg/m ³ GTAW = 2,14 mg/m ³ SMAW = 14,9 mg/m ³	(Liu et al., 2011)
Etude expérimentale	MMAW-MS	Particules totales. Prélèvements de 2 h ajustés à 8 h.	6 entreprises / 10 mesures par entreprises.	Entreprise 1 : 6,3 mg/m ³ Entreprise 2 : 5,3 mg/m ³ Entreprise 3 : 11,3 mg/m ³ Entreprise 4 : 6,8 mg/m ³ Entreprise 5 : 4,7 mg/m ³ Entreprise 6 : 3 mg/m ³	(Balkhyour and Goknil, 2010)
Etude expérimentale	SMAW = 7 GMAW = 6 GTAW = 2	Particules totales. Prélèvements de 8 h.	1 entreprise de fabrication de carters de moteurs électriques / 15 soudeurs.	SMAW = 630 µg/m ³ GMAW = 510 µg/m ³ GTAW = 60 µg/m ³	(Schoonover et al., 2011)
Etude expérimentale	GMAW-SS GTAW-SS = 40	Particules totales, individuel, poste entier.	Entreprise métallurgique, Danemark	GMAW-SS = 1,01 mg/m ³ GTAW-SS = 0,98 mg/m ³	(Knudsen et al., 1992)

Tableau 4 (suite) : Mesure de l'exposition professionnelle aux fumées de soudage (FS) (IARC, 2018b)

Type d'étude	Procédé soudage	Fraction /durée d'exposition	Population étudiée	Conclusion	Référence
Etude expérimentale	MMA-SS Soudeur, Usine A = 5 MMA-SS Soudeur, Usine B = 13 MMA-SS Soudeur, Usine C = 31 Assistant soudeur, Usine C MMA-SS Soudeur, Usine D = 22	Fraction respirable, individuel, 7 h.	/	MMA-SS Soudeur, Usine A = 9 mg/m ³ (MMA-SS Soudeur) Usine B = 3,2 mg/m ³ (MMA-SS Soudeur) Usine C = 3,5 mg/m ³ (Assistant soudeur) Usine C = 0,8 mg/m ³ (MMA-SS Soudeur) Usine D = 1,3 mg/m ³	(Matczak and Chmielnicka, 1993)

Tableau 4 (suite) : Mesure de l'exposition professionnelle aux fumées de soudage (FS) (IARC, 2018b)

Type d'étude	Procédé soudage	Fraction /durée d'exposition	Population étudiée	Conclusion	Référence
Etude expérimentale	Soudeur, GMA-SS, fabrication =11 Soudeur GTA-SS, fabrication =10 Soudeur FCA, fabrication de plaques de chaudières =20	Particules totales, individuel	Usine de fabrication de fours à vapeur.	Soudeur, GMA-SS, fabrication = 1,61 mg/m ³ Soudeur GTA-SS, fabrication = 0,16 mg/m ³ Soudeur FCA, fabrication de plaques de chaudières = 8,97 mg/m ³	(Wallace et al. 2001)
Etude expérimentale	Soudeur MMA-SS (partie intérieure du navire) = 48 Soudeur MMA-SS (Intérieur du module) = 30 Soudeur MMA-SS (atelier de soudure) = 42 Soudeur MMA-SS (broyage) = 34 Soudeur MMA-SS (broyage) Soudeur MMA-SS (atelier de soudure) Soudeur MMA-SS (Intérieur du module)	Particules totales, individuel.	Chantier Naval, Norvège	Soudeur MMA-SS, (partie intérieure du navire) = 5,4 mg/m ³ Soudeur MMA-SS, (Intérieur du module) = 3 mg/m ³ Soudeur MMA-SS, (atelier de soudure) = 2 mg/m ³ Soudeur MMA-SS, (broyage) =11 mg/m ³	(IARC Working Group, 2018)

Tableau 4 (suite) : Mesure de l'exposition professionnelle aux fumées de soudage (FS) (IARC, 2018b)

Type d'étude	Procédé soudage	Fraction /durée d'exposition	Population étudiée	Conclusion	Référence
Expérimentale	Soudeur MMA-SS (broyage) Soudeur MMA-SS (atelier de soudure) Soudeur MMA-SS (Intérieur du module)	Particules totales, ambiance.	Chantier Naval, Norvège.	Soudeur MMA-SS, (broyage) = 2 mg/m ³ Soudeur MMA-SS, (atelier de soudure) = 0,7 mg/m ³ Soudeur MMA-SS, (Intérieur du module) = 0,4 mg/m ³	(IARC Working Group, 2018)

Tableau 4 (suite) : Mesure de l'exposition professionnelle aux fumées de soudage (FS) (IARC, 2018b)

Type d'étude	Procédé soudage	Fraction /durée d'exposition	Population étudiée	Conclusion	Référence
Etude expérimentale	GMA-MS soudeur = 6 MMA-MS soudeur = 4	Particules totales, individuel.	Entreprises, Nouvelle Zélande.	GMA-MS soudeur = 2,56 mg/m ³ MMA-MS soudeur = 2,59 mg/m ³	(IARC Working Group, 2018)
Etude expérimentale	MMA-MS soudeur, chantier naval = 24	Particules totales, individuel.	Chantier naval, Finlande.	11,8 mg/m ³	(Järvisalo et al. 1992)
Etude expérimentale	Divers/MS soudeurs = 209 Contrôles administratifs = 109	Particules totales, individuel.	Chantier naval, Angleterre.	Divers/MS soudeurs = 1,39 mg/m ³ Contrôles administratifs = 0,67 mg/m ³	(Akbar-Khazadeh et al. 1993)-

Tableau 4 (suite) : Mesure de l'exposition professionnelle aux fumées de soudage (FS) (IARC, 2018b)

Type d'étude	Procédé soudage	Fraction /durée d'exposition	Population étudiée	Conclusion	Référence
Etude expérimentale	Soudeur divers/MS = 22	Inhalable, Individuel	Chantier de construction, USA	9,325 mg/m ³	(R Woskie, 2002)
Etude expérimentale	Soudeur GMA-Al, Usine I et II = 34 Soudeur GMA-Al, Usine II = 12 Tourneur et grutier, Usine I = 3 Soudeur GTA-Al, Usine III = 13 Soudeur GTA-Al, Usine III = 5	Fraction respirable, individuel, 6–7 h. Particules totale, individuel, 6–7 h. Particules totale, individuel, 6–7 h. Fraction respirable, individuel, 6–7 h.	Soudeurs d'aluminium dans 3 usines, Pologne.	Soudeur GMA-Al Usine I et II = 6 mg/m ³ Soudeur GMA-Al Usine II = 2,6 mg/m ³ Tourneur et grutier, Usine I = 1,4 mg/m ³ Soudeur GTA-Al, Usine III = 0,69 mg/m ³ Soudeur GTA-Al, Usine III = 0,79 mg/m ³	(Matczak et al. 2002)

Les mesures FS varient de 1 mg/m³ à plus de 50 mg/m³. Les concentrations moyennes les plus faibles sont générées par le procédé de soudage GTA, tandis que le procédé de soudage MMA enregistre les concentrations moyennes les plus élevées. Entre deux, le procédé GMA génère des taux de FS moyens de l'ordre de 2,4 mg/m³.

Le niveau d'exposition des soudeurs est règlementé par une Valeur Limite d'Exposition Professionnelle (VLEP) qui correspond à au niveau de concentration d'un polluant dans l'atmosphère des lieux de travail à ne pas dépasser sur une période de référence déterminée. Il existe de nombreuses VLEP établies pour des polluants déterminés. Ces VLEP, sont fixées par le ministère chargé du travail, sur recommandation de l'Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES). Elles sont exprimées en concentrations dans l'air d'une substance chimique pour un temps d'exposition déterminé en dessous desquelles le risque théorique d'altération de la santé est considéré comme suffisamment négligeable (ANSES, 2014).

La prévention des maladies d'origine professionnelles nécessite que l'exposition des personnes aux polluants présents dans l'air des lieux de travail soit évitée ou réduite aux niveaux les plus faibles possibles. La réglementation indique que « l'employeur procède de façon régulière au mesurage de l'exposition des travailleurs aux agents chimiques dangereux présents dans l'atmosphère des lieux de travail. (...). Ces contrôles techniques sont effectués au moins une fois par an et lors de tout changement susceptible d'avoir des conséquences néfastes sur l'exposition des travailleurs.» (Articles R4412-1 à R4412-160 - Légifrance).

En pratique, en accord avec la *Circulaire DGT n° 2010/03 du 13/04/10 relative au contrôle du risque chimique sur les lieux de travail*, une campagne d'évaluation de l'exposition des salariés est réalisée à l'issu de l'évaluation du risque chimique lorsque :

- Un polluant classé CMR a été identifié.
- Un polluant soumis à une VLEP réglementaire contraignante a été repéré.
- Le risque associé à un polluant soumis à une VLEP indicative est jugé non faible.

L'évaluation de l'exposition des salariés est effectuée en réalisant une mesure individuelle de l'air inhalé par le salarié en condition réelle d'exposition par prélèvement dynamique. La caractérisation de l'exposition des salariés aux FS est réalisée en prélevant la fraction inhalable des particule (i.e., particules avec un diamètre aérodynamique équivalent < 100 µm) présentes dans les fumées émises dans l'environnement respiratoire du soudeur.

La concentration atmosphérique obtenue est comparée à une VLEP, fixée à 5 mg/m³. Cette valeur a été établie en 1987 et aucun élément scientifique concernant son élaboration ni son choix pour l'application en France n'est disponible. Selon l'Occupational Safety and Health Administration (OSHA), la Time Weighted Average (TWA) de 5 mg/m³ permet de protéger le travailleur de la fièvre des fumées métalliques et des irritations des voies respiratoires uniquement pour les fumées d'acier doux, de Fe et d'Al. (NIOSH, 2011)

Au niveau international, c'est également cette valeur qui est majoritairement appliquée, comme le montre le Tableau 5.

Tableau 5: : Valeurs Limites Internationales en termes d'exposition des salariés aux fumées de soudage (GESTIS, 2021)

Pays	Valeur Limite (mg/m³)
Australie	5
Autriche	5
Belgique	5
Canada	5
France	5
Irlande	5
Lettonie	4
Nouvelle Zélande	5 ^a
Chine	4 ^b
Singapour	5
Corée du Sud	5
Espagne	5
Hollande	1 ^c

^a Une série de contaminants atmosphériques sont associés au soudage au gaz et à l'arc. Le type de métal soudé, l'électrode utilisée et le processus de soudage ont tous une influence sur la composition et la quantité des fumées. Des produits gazeux tels que les oxydes d'azote, le monoxyde de carbone et l'ozone peuvent également être produits. En l'absence d'éléments toxiques tels que le chrome, et lorsque les conditions ne favorisent pas la production de gaz toxiques, la concentration de fumées à l'intérieur du casque du soudeur ne doit pas dépasser 5 mg/m³

^b Fraction inhalable

^c Jusqu'au 1er avril 2010, la valeur limite légale était de 3,5 mg/m³

Cette valeur réglementaire, établie pour la fraction inhalable des FS, est considérée comme « protectrice ». Or, les FS sont principalement composées, en masse, de particules fines, d'un diamètre aérodynamique équivalent généralement inférieur à 1 µm, mais, en nombre, de particules ultrafines, d'un diamètre aérodynamique équivalent inférieur à 0,1 µm.

En outre, les Poussières dites Sans Effets Spécifiques (PSES) - fraction alvéolaire (i.e., « qui ne sont pas en mesure de provoquer seules sur les poumons ou sur tout autre organe ou système du corps humain d'autre effet qu'un effet de surcharge) sont également soumises à une VLEP de 5 mg/m³. Or, une expertise de l'ANSES, publiée en novembre 2019, propose l'établissement de nouvelles VLEP aux PSES des fractions inhalables et alvéolaires en milieu professionnel (ANSES, 2019). La VLEP pour la fraction alvéolaire des PSES proposée est plus faible, 0,9 mg/m³. En se référant aux résultats des mesures présentées dans le Tableau 4, il est à noter que, quel que soit le procédé de soudage, cette VLEP est dépassée dans la majorité des cas. La protection des salariés vis-à-vis des effets des FS inhalées n'est donc plus assurée.

Compte tenu de ces éléments, il est clair que la VLEP n'est pas adaptée et contrairement à son objectif, elle ne semble pas protéger les salariés des effets des FS sur leur santé. En effet, les études épidémiologiques et expérimentales ont montré que l'exposition aux FS, certes très variables en fonction des procédés de soudage utilisés, engendrés des effets très néfastes sur la santé. En effet, depuis 2017, les FS ont été classées par le groupe d'experts du CIRC comme cancérigène pour l'homme (Groupe 1), principalement sur la base des résultats des études épidémiologiques et expérimentales supportant l'existence d'une relation entre l'exposition à ce facteur de risque et l'incidence accrue de cancers du poumon, après ajustement sur les autres facteurs de risques (IARC, 2018a).

B. Toxicité des FS

1. Données épidémiologiques chez les soudeurs

a. Pathologies respiratoires

i. Atteintes de la fonction pulmonaire :

La majorité des procédés de soudage produisent des FS toxiques, riches en métaux et renfermant notamment du Ni, du Cr, du Cd, du Fe, du Cu, du Mn, et du Zn. Comme préalablement expliqué, la toxicité des FS dépend de la taille et de la composition des particules qu'elles renferment, et donc du procédé de soudage mis en œuvre.

Les effets néfastes des activités de soudage sur la santé sont dus à de multiples déterminants et sont difficile à apprécier. Comme indiqué par le Tableau 6, il s'agit d'un sujet à l'étude depuis plusieurs années et de nombreuses publications, parmi lesquelles celles décrites dans ce tableau, font état de troubles respiratoires qui vont de la dégradation de la fonction pulmonaire à la sécheresse de la gorge, la toux, l'oppression de la poitrine, la respiration sifflante, la difficulté à respirer ou encore la bronchite chronique (Al-Otaibi, 2014) (Attfield and Ross, 1978) (Bradshaw et al., 1998) (Chinn et al. 1990) (Holm et al., n.d.) (Ozdemir et al., 1995) (Sharifian et al., s.d.). La fièvre des fumées métalliques est une maladie systémique caractérisée par une inflammation pulmonaire également associée à l'exposition aux FS, qui résulte de l'inhalation d'une quantité importante d'oxydes métalliques. (Malaguarnera et al., 2013)

Les facteurs confondants tels que les co-expositions et le statut tabagique des salariés rendent les associations plus difficiles. Il a toutefois été possible de démontrer que les habitudes tabagiques individuelles ainsi que la durée d'exposition professionnelle aux FS pouvaient avoir un impact négatif sur les paramètres de la fonction pulmonaire. (Haluza, Moshammer et Hochgatterer 2014). Certaines études antérieures sur les soudeurs suggèrent qu'il existe une relation synergique entre les effets du tabagisme et du soudage, provoquant des maladies pulmonaires et une augmentation des symptômes respiratoires. (Bradshaw et al., 1998) (Rastogi et al., n.d.) (Szram et al., 2013a) (Wolf et al., 1997)

Néanmoins, l'exposition conjointe à l'amiante et au tabac, n'ont pas pu, à elles seules, expliquer l'excès de risque de cancer du poumon observé chez les soudeurs. Les associations positives ont persisté après ajustement :

- ▶ Direct ou indirect pour le tabagisme.
- ▶ La coexposition à l'amiante, ou les deux.
- ▶ En se limitant aux non-fumeurs ou aux fumeurs de faible niveau.
- ▶ Dans les cohortes avec une exposition à l'amiante faible. (IARC, 2018b)

L'exposition aux FS serait également à l'origine d'une sensibilité accrue aux infections à pneumocoques. En effet, l'étude de Marongiu et al. (2016) a permis d'identifier l'apparition de symptômes respiratoires ainsi qu'une augmentation des consultations pour infection respiratoire chez les soudeurs, plus fréquentes en hiver, pouvant indiquer une vulnérabilité accrue à un large éventail d'infections. (Marongiu et al., 2016).

Enfin, en fonction du type de métal soudé et de procédés utilisés, les effets pathologiques identifiés seraient différents. De nombreuses études ont examiné les effets chroniques des FS de l'acier inoxydable (SS) sur la santé respiratoire des soudeurs. Des effets chroniques ont été observés et reliés aux concentrations de Cr et de Ni dans les fumées. Il a été montré que l'exposition aux FS issues de la soudure de l'inox provoquait des altérations plus marquées des fonctions pulmonaires, après 20 ans d'activités de soudage, que celles issues de la soudure à l'acier doux. (Sobaszek et al., 2000)

Tableau 6: Principales études réalisées chez l'animal et chez l'homme sur le développement d'altérations de la fonction pulmonaire en réponse à l'exposition aux fumées de soudage (FS).

Type d'étude	Population étudiée	Procédés	Fraction /durée d'exposition	Résultats	Référence
Essais In vivo	Rats par II	GMAW MS-SPRAY/SS-SPRAY vs MS-PULSE	Albumine, Activité des enzymes lysosomales, Activité des enzymes cytosoliques. Indicateurs de dommages pulmonaires, TNF- α , IL-1 β .	MS-SPRAY éliminé du poumon plus vite que SS-SPRAY. Rétention plus importante de SS-SPRAY. SS-SPRAY → libération de TNF- α et IL-1 β dans les cellules pulmonaires peu de temps après l'exposition.	(Antonini et al., 1996)
Méta-analyse Etude longitudinale	Homme	Soudage MIG MMA TIG MS SS AS AI	Déclin de la fonction respiratoire et symptômes respiratoires chroniques (FEV1).	Soudage peut être associé à une accélération du déclin de la fonction respiratoire particulièrement s'il y a une combinaison avec le tabagisme.	(Szram et al., 2013a)
Transversale rétrospective	Homme	MMA et MSW	Symptômes respiratoires : Toux, Expectations, Dyspnée, Wheezing, Fièvre, Douleur au niveau de la poitrine. Paramètres de la fonction respiratoire : (FVC, FEV1, FEV1/FVC, PEF, MMEF, MEF75, MEF50, MEF25).	Bronchites chroniques et symptômes respiratoires plus élevés chez les Soudeurs Fumeurs chez qui les Témoins Fumeurs. Soudeurs → excès de risques de bronchites chroniques et de déficience pulmonaire.	(Ozdemir et al., 1995)
Etude transversale	Homme	MIG et TIG	Symptômes respiratoires : Toux, Expectations, Dyspnée, Wheezing, Fièvre, Douleur au niveau de la poitrine. Paramètres de la fonction respiratoire : (FVC, FEV1, FEV1/FVC, PEF, MMEF, MEF75, MEF50, MEF25).	BC associée indépendamment au tabagisme et à l'exposition aux fumées de soudage. Symptômes respiratoires associés à une forte exposition aux fumées de soudage.	(Bradshaw et al., 1998)

Tableau 6 (suite) : Principales études réalisées chez l'animal et chez l'homme sur le développement d'altérations de la fonction pulmonaire en réponse à l'exposition aux fumées de soudage (FS).

Type d'étude	Population étudiée	Procédés	Fraction /durée d'exposition	Résultats	Référence
Etude transversale longitudinale	Homme	ND	Symptômes respiratoires : Toux, Expectorations, Dyspnée, Wheezing, Fièvre, Douleur au niveau de la poitrine. Paramètres de la fonction respiratoire : (FVC, FEV1, FEV25-75).	Excès de risques significatif de l'accélération du déclin de FEV1 chez les soudeurs fumeurs.	(Erkinjuntti-Pekkanen et al., 1999)

ii. Asthme

L'asthme professionnel est caractérisé par une inflammation des voies aériennes, s'accompagnant d'une obstruction variable des bronches et d'une hyperréactivité bronchique non spécifique, induite par l'exposition à un agent présent dans le milieu professionnel. L'asthme professionnel représente 10 à 15 % des cas d'asthme en France. (Asthme professionnel, 2021)

De nombreuses études associent l'augmentation de la prévalence de l'asthme au métier de soudeur ou à une exposition professionnelle aux FS (Karjalainen et al., 2002) (Storaas et al., 2015) (Wittczak et al., 2012). Le Tableau 7 présente les principales études réalisées chez l'homme sur le développement d'un asthme professionnel en réponse à l'exposition aux FS. La présence de composés asthmogènes tels que le Ni, le Cr, le Co, le Va et le Mn dans les FS expliquerait l'apparition de l'asthme chez les soudeurs (Hannu et al., 2006) (Vandenplas et al., 1995)

Dans une étude clinique portant sur l'asthme professionnel dû aux FS de l'acier inoxydable, il a été constaté que la durée d'exposition lors du développement de l'asthme professionnel était souvent longue et que, dans la plupart des cas, la poursuite des travaux de soudage était impossible après l'apparition de la pathologie. De plus, des symptômes respiratoires ont été observés chez 62 % patients participant à l'étude, qui présentaient également des symptômes nasaux ou laryngés liés à l'inhalation des FS (Hannu et al., 2006). Une étude réalisée par Storaas et al. (2015) a également démontré que l'asthme était plus fréquent chez les soudeurs ainsi que l'abandon du métier après l'apparition de la maladie. (Storaas et al., 2015)

Tableau 7: Principales études réalisées chez l'homme sur le développement d'un asthme professionnel en réponse à l'exposition aux fumées de soudage (FS).

Type d'étude	Fraction /durée d'exposition	Population étudiée	Conclusion	Référence
Etude multicentrique	Asthme adulte et rhinite non infectieuse - questionnaire	Hommes.	Rhinite et asthme à l'âge adulte plus fréquent chez les soudeurs	(Storaas et al., 2015)
Cohorte	Données de l'assurance maladie. Incidence de l'asthme en fonction de la profession	Hommes.	Excès de l'incidence de l'asthme lié au travail avec un risque plus élevé pour certaines professions dont les salariés travaillant dans le secteur de la métallurgie	(Karjalainen et al., 2002)
Etude cas témoin	Tests de provocation bronchique spécifique	Soudeurs exposés aux métaux, suspectés d'être atteints d'asthme induit par les métaux - soudeurs exposés aux métaux mais non suspectés d'être atteints d'asthme induit par les métaux - deux groupes de contrôle (patients atteints d'asthme atopique et sujets sains) .	Test de provocation par inhalation spécifique joue un rôle clé dans le diagnostic de l'asthme induit par les métaux chez les soudeurs. Des modifications pulmonaires ont été constatées sur la radiographie pulmonaire (pourcentage significatif des soudeurs examinés).	(Wittczak et al., 2012)
Etude prospective	Questionnaire sur les symptômes respiratoires : Spirométrie, test de provocation bronchique à la métacholine, une fois avant le début de l'exposition + une fois après 15 mois d'apprentissage.	Apprentis soudeurs.	Exposition aux FS associée à des modifications fonctionnelles pulmonaires et à des symptômes respiratoires chez les soudeurs.	(El-Zein et al., 2003)

Tableau 7 (suite) : Principales études réalisées chez l'homme sur le développement d'un asthme professionnel en réponse à l'exposition aux fumées de soudage (FS).

Type d'étude	Fraction /durée d'exposition	Population étudiée	Conclusion	Référence
Etude descriptive	Antécédents du patient, Examens de la fonction pulmonaire : Tests de provocation spécifiques par inhalation avec des mesures du VEMS et des valeurs du débit expiratoire de pointe (DEP).	Soudeurs diagnostiqués asthmatiques d'origine professionnel exposés aux FS d'acier inoxydable.	Dans la plupart des cas, après le diagnostic d'asthme professionnel, la poursuite des travaux de soudage n'a été pas possible.	(Hannu et al., 2006)

iii. **BPCO**

La bronchopneumopathie chronique obstructive (ou BPCO) est une maladie chronique inflammatoire des bronches, le plus souvent associée à d'autres maladies. Elle se caractérise par un rétrécissement progressif et une obstruction permanente des voies aériennes et des poumons, entraînant une gêne respiratoire.

La BPCO se manifeste par des signes cliniques non spécifiques : toux chronique, expectorations, essoufflement (dyspnée). Ces symptômes apparaissent progressivement, de façon insidieuse, et s'aggravent avec le temps en augmentant la dyspnée. Le Tableau 8 présente les principales études réalisées chez l'homme sur le développement de la BPCO en réponse à l'exposition aux FS.

La confirmation de la pathologie se fait par la réalisation d'un test permettant de mesurer les volumes pulmonaires et les débits bronchiques du patient. La mesure du volume maximal expiratoire en 1 seconde (VEMS) est un indicateur de la sévérité de l'obstruction bronchique. La maladie est confirmée si le VEMS du patient, rapporté son plus grand volume pulmonaire mobilisable, est diminué malgré l'inhalation d'un bronchodilatateur de courte durée d'action.

Le résultat du VEMS post-bronchodilatateur permet de classer la maladie selon le degré de sévérité de l'obstruction bronchique (Hayot 2020) :

- Stade I : léger, VEMS supérieur ou égale à 80 %
- Stade II : modéré, VEMS comprise entre 50 et 80 %
- Stade III : sévère, VEMS comprise entre 30 et 50 %
- Stade IV : très sévère, VEMS inférieur à 30 %

Selon des estimations de l'OMS, plus de 3 millions de personnes en sont décédées en 2015, ce qui correspond à 5 % de l'ensemble des décès survenus dans le monde. L'Organisation prévoit que la BPCO deviendrait la 3^{ème} cause de décès dans le monde en 2030 faisant de cette pathologie un problème majeur de santé publique.

Bien que la fumée de tabac soit largement reconnue comme étant le facteur de risque majeur de la BPCO, environ 90 % des patients atteints de BPCO étant ou ayant été des fumeurs, il existe de plus en plus de preuves suggérant qu'une proportion importante des cas de BPCO puisse être imputée à des expositions environnementales et professionnelles. L'American Thoracic Society (ATS) estime actuellement cette proportion à 15 %.

Tableau 8 : Principales études réalisées chez l'homme sur le développement de BPCO en réponse à l'exposition aux fumées de soudage (FS).

Type t'étude	Population étudiée	Procédés	Fraction /durée d'exposition	Résultats	Référence
Cohorte Etude longitudinale	Soudeurs sur 2 chantiers navals	ARC Soudure par points Coupage	Fonction respiratoire Auto-questionnaire : tabagisme exposition antérieures et âge + mesures atmosphériques	Excès de risque de BPCO chez les soudeurs. Le tabagisme ne montre pas d'association significative avec COPD	(Koh et al., 2015a)
Etude transversale	Soudeurs Non-Fumeurs et Non soudeurs Non-fumeurs	FCAW SS	Fonction respiratoire Auto-questionnaire : tabagisme exposition antérieures et âge	Prévalence ++ de symptômes respiratoires sur les 12 derniers mois, Valeurs moyennes significativement plus élevées des paramètres spirométriques, une prévalence significativement plus élevée de BPCO chez les soudeurs non-fumeurs que chez les autres travailleurs non-fumeurs. COPD chez les soudeurs en lien étroit avec l'âge et l'ancienneté des salariés.	(Minov et al., n.d.)
Etude transversale	Soudeurs Non soudeurs Fumeurs/ Non-fumeurs	/	FVC/FEV/FEF25/75 Asthme, atopique, bronchite chronique, symptômes respiratoires généraux et spécifiques chez les soudeurs et les autres travailleurs.	Possibilité d'effets synergiques du tabagisme et de l'exposition aux WF. Déclin du VEMS pendant l'activité peut entraîner un déclin annuel du VEMS.	(Erkinjuntti-Pekkanen et al., 1999)

Tableau 8 (suite) : Principales études réalisées chez l'homme sur le développement de BPCO en réponse à l'exposition aux fumées de soudage (FS).

Type t'étude	Population étudiée	Procédés	Fraction /durée d'exposition	Résultats	Référence
Etude transversale	Soudeurs/Non soudeurs. Fumeurs/Non-fumeurs.	MS/SS TIG/MIG	FEV1/FVC/PEF/FEF25-75/ ratio FEV1/FVC rapporté au % FEV.	<p>Salariés avec une exposition forte (espace confiné) → excès de risque de développer une bronchite chronique et des symptômes respiratoires en lien avec le travail en tenant compte du tabagisme.</p> <p>Travailleurs atteints de bronchite chronique = 2 populations identifiées :</p> <p>Symptômes de bronchite chronique de durée généralement courte</p> <p>Symptômes à plus long terme et obstruction des voies aériennes associée (BPCO).</p> <p>Particules de taille différente dans les FS pourraient agir indépendamment sur des parties spécifiques des voies respiratoires en fonction de leur taille</p> <p>Combinaison de bronchites chroniques et de maladies des voies respiratoires qui ressemble à ce qui est observé avec le charbon.</p>	(Bradshaw et al., 1998)

Parmi les causes professionnelles, l'exposition aux FS a fait l'objet de nombreuses études dont l'objectif était d'établir un lien entre cette exposition et le développement de cette maladie. Une étude réalisée par Koh et al. (2015) dans une entreprise de construction navale coréenne a montré qu'il existait une association entre l'exposition aux FS et la BPCO chez les soudeurs. (Koh et al., 2015b) Dans une autre étude menée chez des ouvriers travaillant sur un chantier naval en Malaisie, les soudeurs présentaient aussi les symptômes respiratoires d'une BPCO, à un stade déjà avancé. (Ithnin et al., 2019).

D'après une étude Iranienne, menée dans une entreprise de construction automobile, l'exposition aux FS serait à l'origine d'une diminution de la fonction pulmonaire et provoquerait des BPCO chez les soudeurs. Les résultats des tests de la fonction pulmonaire (VEMS, CVF) étaient plus dégradés chez les soudeurs que chez les autres salariés (Kakoe, s.d.).

Une étude dans une entreprise de métallurgie a également constaté une prévalence élevée des symptômes respiratoire et de la BPCO chez les soudeurs. La BPCO chez les soudeurs était étroitement liée à l'âge et à la durée de l'emploi sur le lieu de travail (Minov et al., s.d.).

Enfin, la BPCO pourrait être un facteur déterminant dans la survenue de cancers du poumon, en augmentant le stress oxydant et les dommages à l'ADN qui en résultent, ainsi que la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires, la répression des mécanismes de réparation de l'ADN, et l'augmentation de la prolifération cellulaire (Durham and Adcock, 2015).

iv. **Cancers broncho-pulmonaires**

Le soudage de l'acier inoxydable met en suspension des PUF de Ni et de Cr qui sont reconnus comme cancérogènes pulmonaires chez l'homme (Groupe 1). Les FS des aciers doux contiennent également du Ni et du Cr mais en moindres quantités que dans le soudage de l'acier inoxydable (IARC, 1990). Toutefois, le soudage de l'acier doux est couramment effectué avec des techniques à fortes émissions et génère des concentrations massiques de particules très élevées.

L'association potentielle entre le métier de soudeur et l'excès d'incidence de cancer broncho-pulmonaire (CBP) fait l'objet d'une littérature abondante. Plusieurs études sur les travailleurs ont indiqué un risque excessif de CBP chez les soudeurs (Tableau 9). La cancérogénicité des FS a été évaluée par le CIRC en 1989. Les FS ont été classées comme "potentiellement cancérogène pour l'homme" (groupe 2B), sur la base de "preuves limitées chez l'homme" et de "preuves insuffisantes" *in vivo* (IARC, 1990). Cependant, l'interprétation de l'excès de risque de CBP est souvent difficile car il existe des incertitudes non négligeables dans la plupart des études. L'évaluation inexacte de l'exposition, la coexposition à d'autres composés provenant des revêtements sur le métal soudé comme la peinture ou les graisses, et/ou encore la présence de composés organiques volatils utilisés pour préparer les pièces avant le soudage, sont des facteurs de confusion potentiels.

De plus, comme indiqué dans le Tableau 9, l'exposition à l'amiante et le tabagisme sont des facteurs de risque établis de CBP et peuvent également être associés au soudage, d'autant plus qu'il a été montré que les soudeurs fumaient davantage que la population générale (Kendzia et al., 2013).

Depuis lors, de nombreuses études épidémiologiques ont été publiées sur l'association entre l'exposition aux FS et le CBP (Ambroise et al. 2006a) (Sørensen et al., 2007a) (Vallières et al., 2012b). En 2017, le CIRC a réévalué la cancérogénicité des FS à partir de l'analyse de l'ensemble des publications publiées depuis la dernière évaluation et les a, sur la base de preuves suffisantes de leur capacité à induire des CBP chez l'homme, classées cancérogènes (Groupe 1). (Guha et al., 2017) La seule présence de composés cancérigènes dans les FS tels que le Ni et le Cr ne suffit pas à justifier leur cancérogénicité. Plusieurs études chez l'homme et la souris ont permis d'établir un lien entre l'exposition aux FS d'acier doux et le CBP (Falcone et al. 2018) (Honaryar et al., 2019a) (Honaryar et al., 2019b) (Siew et al., 2008b)

Tableau 9 : Principales études réalisées chez l'homme sur le développement de Cancers Broncho Pulmonaires (CBP) en réponse à l'exposition aux Fumées de soudage (FS).

Type t'étude	Population étudiée	Procédés	Fraction /durée d'exposition	Résultats	Référence
Cohorte Etude longitudinale	Salariés (cancer + témoins)	Soudage acier doux / inox + témoins.	Incidence cancers.	Exposition professionnelle FS ~ 4 % CBP, acier inoxydable et acier doux contribuent de manière égale + effet durée-réponse.	(Mannetje et al. 2012)
Méta analyse	Soudeurs chantiers navals	Soudage acier doux / + inox tabagisme.	Incidence cancers.	Excès de 26 % de CBP chez les soudeurs, sans aucune différence selon les activités de soudage.	(Ambroise et al. 2006b)
Etude cas-témoin	Soudeurs	Soudage à l'arc + gaz Antécédents professionnels.	Incidence cancers.	Pas d'excès de risque détectable de CBP dû à l'exposition aux FS chez les fumeurs modérés à lourds. Excès de risque lié aux deux types de FS chez les fumeurs légers.	(Vallières et al., 2012a)
Cohorte	Soudeurs	MS/SS	Incidence cancers.	Risque accru de CBP. Effets cancérigènes liés au soudage de l'acier inoxydable et de l'acier doux.	(Sørensen et al., 2007b)
Longitudinale	Soudeurs	FEV ₁	Incidence cancers.	Déclin de la fonction pulmonaire chez les soudeurs et les symptômes respiratoires => effet plus important chez les fumeurs.	(Szram et al., 2013b)
Cohorte	Soudeurs	Exposition au Fe + FS	Incidence cancers.	Exposition professionnelle au Fe et aux FS associée à une augmentation du risque de CBP (carcinome spinocellulaire + +).	(Siew et al., 2008a)

v. Autres pathologies

Du fait de leur mode d'exposition par voie d'inhalation, les FS sont principalement associées à des pathologies d'origine pulmonaire. Cependant, elles ne sont pas les seules sources de pollution sur les lieux de travail des soudeurs. En effet, les soudeurs sont également exposés à des risques physiques tels que la chaleur, le bruit, les vibrations, les radiation (i.e., champs électromagnétiques) et les rayons ultra-violet (UV) ; ces derniers ont également été classés cancérigènes (groupe 1) avec des preuves suffisantes pour l'apparition de mélanomes oculaires (IARC, 2018b).

Le soudage émet des rayonnements couvrant l'ensemble du spectre UV (i.e., UVA, UVB et UVC) et provoque souvent des brûlures et des érythèmes cutanés des zones non protégées de la peau, telles que la tête et le cou. L'hypothèse selon laquelle l'exposition aux rayons UV serait susceptible d'être à l'origine de cancer de la peau chez les soudeurs fait l'objet de nombreuses études mais n'est cependant pas encore clairement établie. (Dixon et Dixon, 2004) (Falcone et Zeidler-Erdely, 2019) (Heltoft et al., 2017)

Il a été montré que 11 à 14 % des FS atteignaient la région alvéolaire (Cena et al., 2015). Cette région étant le siège des échanges gazeux est très fortement vascularisée et les particules de taille nanométrique ont, après leur inhalation dans le poumon profond, un accès direct à la circulation sanguine au travers de la barrière alvéolo-capillaire, ce qui leur permet d'atteindre d'autres organes où elles peuvent exercer leur toxicité. A titre d'exemple, les FS ont aussi été décrites comme un facteur de risque important de développement des cancers du rein. Des associations positives entre la profession de soudeur et l'incidence de cancers du rein ont été rapportées dans de nombreuses études. (MacLeod et al., 2017) (Michalek, et al. 2019)

Les constituants métalliques des FS tels que le Pb, l'Al et le Mn ont été soupçonnés de provoquer des atteintes neurologiques et/ou psychiatriques chez les travailleurs exposés dans le cadre de leurs activités de soudage (Antonini et al., 2003). Une étude récente a montré une association significative entre l'exposition aux FS et la dérégulation de gènes impliqués dans certaines maladies neurodégénératives (Rana et al., 2019). Le Mn présent dans les FS pourrait être à l'origine des lésions neurologiques, même à de faibles niveaux d'exposition. Dans leur étude, Criswell et al. (2011) ont montré, sur une population de soudeurs, que des lésions cérébrales pouvaient apparaître dans les mêmes zones du cerveau (e.g., striatum, thalamus, noyau sous thalamique, substance noire) que celles des patients atteints de la

maladie de Parkinson (Criswell et al., 2011). La revue de Lee et al. (2018) a montré, d'une part, que le Mn pouvait commencer à s'accumuler de manière significative dans le cerveau une fois qu'un niveau critique d'exposition aux FS est atteint et, d'autre part, que l'exposition au Mn à long terme (> 30 ans) pouvait entraîner des changements microstructuraux même à de faibles niveaux d'exposition (Lee et al., 2018).

La littérature scientifique a régulièrement décrit la majorité des procédés de soudage comme sources de niveaux importants de FS, généralement très riches en métaux, tels que le Ni, le Cr, le Cd, le Fe, le Cu, le Mn, et le Zn. La toxicité de la fraction particulaire des FS dépend non seulement de leur classe granulométrique, avec une attention particulière sur la fraction ultrafine, majoritaire en nombre, mais aussi de leur composition chimique. Certes, de par la subsistance de certains facteurs confondants et de certaines co-expositions, il est encore parfois difficile d'établir des associations significatives entre les activités de soudage et le développement de pathologies, principalement, respiratoires. Toutefois, les observations réalisées dans de nombreuses études supportent la relation de causalité entre l'exposition professionnelle aux FS et la survenue de pathologies respiratoires, d'altérations de la fonction pulmonaire au développement d'affections respiratoires chroniques, telles que l'asthme, la BPCO ou encore les CBP. En dépit des récents efforts de recherche, la connaissance des mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans l'initiation et/ou le développement de toutes ces pathologies à la suite d'une exposition aux FS, et plus particulièrement à leur fraction particulaire, restent à ce jour encore parcellaire.

2. Mécanismes d'action toxique des FS

a. Stress oxydant

i. Radicaux libres, espèces réactives et stress oxydant

Les Espèces Réactives de l'Oxygène (ERO) et les Espèces Réactives de l'Azote (ERN) sont les sous-produits de processus métaboliques endogènes, oxydants et inflammatoires, qui concernent tous les organismes aérobies. Lorsque les cellules utilisent l'oxygène pour produire de l'énergie, en particulier la production d'ATP par les mitochondries, des ERO et des ERN sont créées.

Les ERO et les ERN sont produites en condition physiologique de façon permanente en faibles quantités et sont impliquées dans un certain nombre de mécanismes tels que la défense contre les agents pathogènes ou la régulation de la mort cellulaire programmée ou apoptose. Elles ont également la capacité d'activer des facteurs de transcription nécessaires à la transduction de signaux en agissant comme des messagers secondaires dans les cascades de signalisation intracellulaire. (Nathan and Cunningham-Bussel, 2013)

Les radicaux dérivés de l'oxygène représentent la plus importante classe d'espèces de radicaux générés dans les systèmes vivants. Les principales sources endogènes des ERO sont les mitochondries (i.e., chaîne respiratoire), le réticulum endoplasmique (i.e., détoxification via le cytochrome P450), les cellules phagocytaires (i.e., macrophages et polynucléaires), la xanthine oxydase (i.e., hydroxylation des purines) et les peroxysomes (i.e., oxydation peroxysomale des acides gras) (Michel et al., 2008) (Valko et al. 2006).

L'oxygène moléculaire (dioxygène) a une configuration électronique unique et est lui-même un radical. L'ajout d'un électron au dioxygène forme l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) qui est considéré comme l'ERO "primaire" et peut interagir avec d'autres molécules pour générer des ERO "secondaires", soit directement, soit par des processus catalysés par des enzymes ou des métaux. La dégradation de ces radicaux est contrôlée par des systèmes de défense, les antioxydants, qui s'adaptent au taux de radicaux présents (Tableau 10).

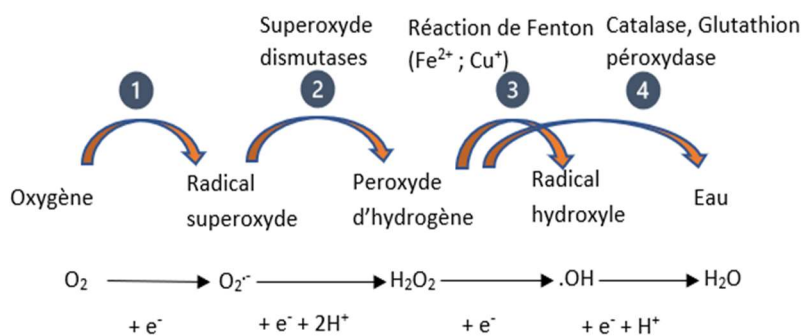
Les ERO les plus importants comprennent l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), le radical hydroxyle (le plus réactif, HO^{\cdot}), l'oxygène singulet (O_2) et l'ozone (O_3). Les ERN les plus abondant sont les NO_x . Ensemble, ils représentent les composés pro-oxydants et deviennent néfastes lorsqu'ils sont produits en trop grande quantité. La dégradation de ces ERO et ERN est contrôlée par des systèmes de défense, les antioxydants, enzymatiques et non enzymatiques, qui s'adaptent au taux d'espèces réactives présentes.

Comme présenté par le Tableau 11, les superoxydes dismutases (SOD) vont catalyser la dismutation du radical superoxyde en peroxyde d'hydrogène H_2O_2 . Le peroxyde d'hydrogène, peut produire, via la réaction de Fenton, le radical hydroxyle $\bullet OH$. La catalase (CAT) accélère la dismutation d' H_2O_2 et la glutathion peroxydase (GPx) catalyse sa réduction par le glutathion (GSH) qui est un tripeptide (acide glutamique-cystéine-glycine) qui possède un fort pouvoir réducteur et peut également chélater les métaux de transition et ainsi limiter leur participation à la génération d'ERO par les réactions de type Fenton.

Tableau 10 : Mode d'action des radicaux libres primaires d'après Baeza et Marano (2007)

Radicaux Caractéristiques	Mode d'action
Radical superoxyde $O_2^{\cdot-}$ - Constante de vitesse faible - Très peu réactif - Toxicité indirecte	1) Action de la SOD $O_2^{\cdot-} + O_2^{\cdot-} \rightarrow H_2O_2 + O_2$
	2) Formation $\cdot OH$ (Haber-Weiss) $O_2^{\cdot-} + Fe^{3+} \rightarrow O_2 + Fe^{2+}$ $H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow \cdot OH + Fe^{3+} + \cdot OH$ $O_2^{\cdot-} + H_2O_2 \rightarrow \cdot OH + \cdot OH$
	3) Dismutation non catalysée $HO_2\cdot + HO_2\cdot \rightarrow H_2O_2 + O_2$ $HO_2\cdot + O_2^{\cdot-} (+ H^+) \rightarrow H_2O_2 + O_2$
	4) Formation de peroxytnitrite $O_2^{\cdot-} + \cdot NO \rightarrow OONO^-$
Radical hydroxyle $\cdot OH$ - Constante de vitesse élevée - Réaction limitée par la diffusion - Pas de cible privilégiée - Faible durée de vie	1) Arrachement d'un électron $\cdot OH + Fe^{2+} \rightarrow \cdot OH + Fe^{3+}$
	2) Arrachement d'un atome d'hydrogène $\cdot OH + RH \rightarrow R\cdot + H_2O$
	3) Addition sur des doubles liaisons $\cdot OH + >C=C < \rightarrow >C-C(OH)-$

Tableau 11 : Les quatre étapes de la réduction de l'oxygène d'après Migdal et al. (2011)



Réduction tétravalente de l'oxygène		$O_2 + 4 e^- + 4H^+ \rightarrow 2 H_2O_2$
$O_2^{\cdot-}$	Anion Superoxyde	1 $O_2 + e^- \rightarrow O_2^{\cdot-}$
H_2O_2	Peroxyde d'hydrogène	2 $O_2^{\cdot-} + O_2^{\cdot-} (+ 2H^+) \rightarrow H_2O_2 + O_2$
$\cdot OH$	Radical Hydroxyle	3 $H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow \cdot OH + Fe^{3+} + OH^-$ 4 $H_2O_2 + H_2O_2 \rightarrow 2 H_2O_2 + O_2$ 5 $H_2O_2 + 2 GSH \rightarrow 2 H_2O_2 + GSSH$
RO_2	Radical Peroxyle	6 $R\cdot + O_2 \rightarrow RO_2\cdot$
RO_2H	Hydroperoxyde	7 $RO_2\cdot + RH \rightarrow RO_2H + R\cdot$
RO	Radical Alcoxyle	8 $RO_2H + Fe^{2+} \rightarrow RO\cdot + Fe^{3+} + OH^-$

Les effets bénéfiques des ERO et des ERN se produisent à des concentrations faibles voire modérées. Ils sont impliqués dans les réponses cellulaires à un pathogène, comme dans la défense contre les agents infectieux, dans le fonctionnement d'un certain nombre de systèmes de signalisation cellulaire, notamment inflammatoires, et dans l'induction d'une réponse mitogène. Ils ont en effet la capacité d'activer l'expression de gènes codant pour des cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, et IFN γ) ou des protéines d'adhésion. (Moldoveanu et al. 2009) (Figure 14).

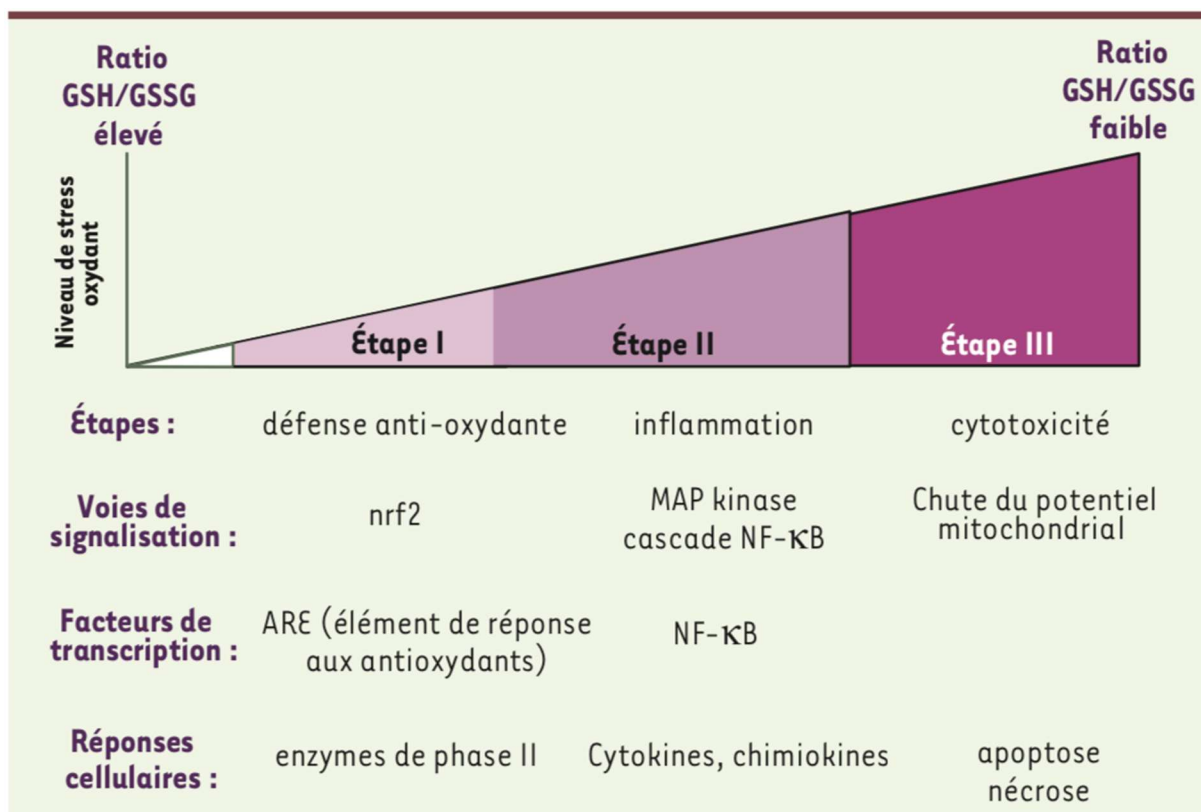


Figure 14 : Le modèle de stress oxydant, modifié d'après Baeza et Marano (2007).

L'effet néfaste des ERO et des ERN causant des dommages biologiques potentiels est appelé stress oxydant et stress nitrosant. Ce phénomène se produit dans les systèmes biologiques lorsqu'il y a surproduction d'ERO et/ou d'ERN, d'une part, et une carence en antioxydants enzymatiques et non enzymatiques, d'autre part. (Valko et al. 2007) (Figure

Comme le montre la Figures 15 et 16, les ERO et les ERN ont une nature instable qui les rend très réactifs vis-à-vis des macromolécules cellulaires (e.g., lipides membranaires,

protéines, glucides, acides nucléiques) et favorise des modifications oxydatives délétères potentiellement impliquées dans l'apparition de pathologies telles que les maladies inflammatoires chroniques et les cancers (Zuo et al., 2015). Les ERO altèrent en particulier l'ADN des cellules. Le radical hydroxyle, OH^\bullet , peut, par exemple, oxyder la guanine pour former la 8-hydroxy-2'-déoxyguanosine (8-OHdG), et être responsable de cassures et/ou de mutations initiant des processus de la cancérogenèse.

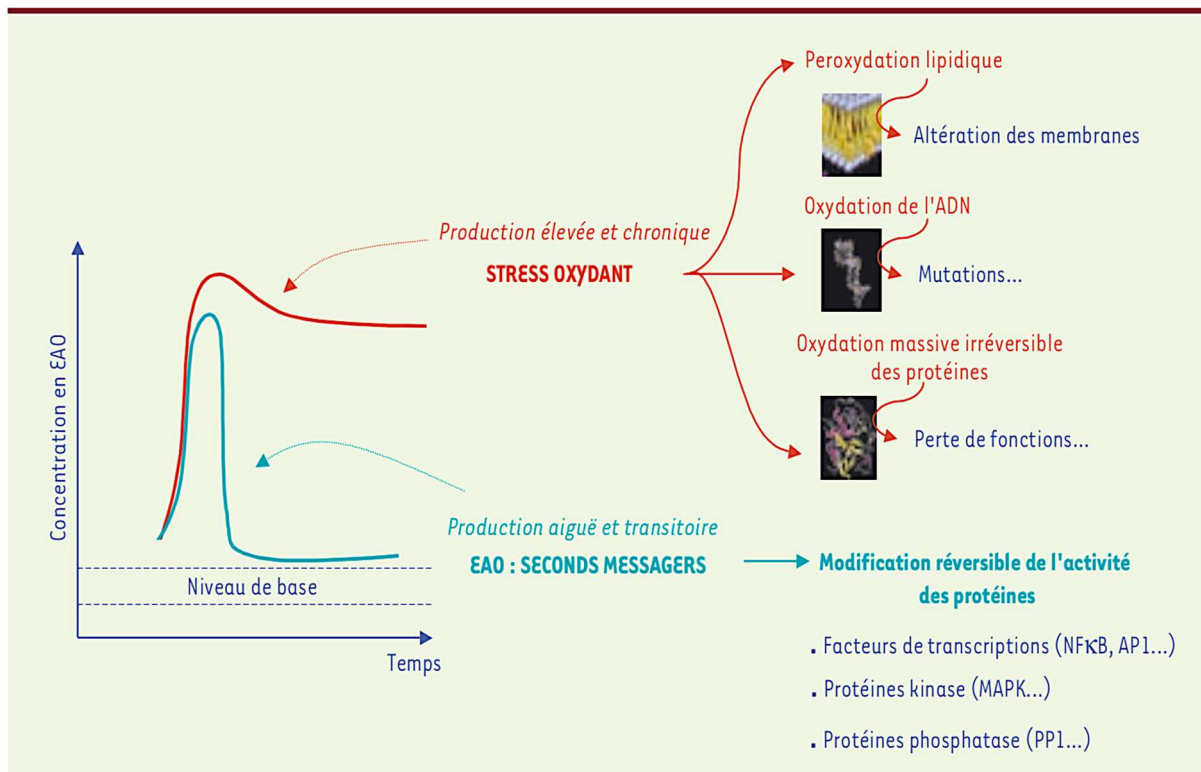


Figure 15 : : Conséquences cellulaires des espèces réactives de l'oxygène (ERO) : une question d'équilibre. Modifié selon Carrière et al. (2006)

Les protéines sont également concernées par les attaques oxydatives des ERO et des ERN. Les cibles les plus vulnérables sont les acides aminés soufrés et aromatiques. L'attaque radicalaire des chaînes latérales des acides aminés peut conduire à la formation de groupements hydroxyles ou carbonyles qui peuvent induire des réticulations intra- ou intermoléculaires. La plupart des dommages sont irréparables et peuvent entraîner des modifications fonctionnelles importantes telles que la non-reconnaissance d'un récepteur par un ligand et même la perte d'activité enzymatique. (Dahl et al. 2015) (Reichmann et al. 2018).

Les effets du stress oxydant et du stress nitrosant sur les acides gras (AG) polyinsaturés des phospholipides membranaires peuvent aboutir à une peroxydation lipidique. Il s'agit d'un

processus radicalaire de réactions en chaîne de dégradation des acides gras membranaires. L'attaque d'une espèce radicalaire suffisamment réactive peut arracher un hydrogène sur les carbones situés entre deux doubles liaisons d'un AG pour former un radical peroxyde (ROO•), suffisamment réactif pour arracher un H⁺ à un AG voisin, propageant ainsi la réaction. Il en résulte une altération de la fluidité membranaire qui peut conduire à la mort cellulaire. Par ailleurs, la peroxydation des lipides forme un certain nombre de produits d'oxydation, y compris des hydroperoxydes de lipide (LOOH) et des aldéhydes tels que le malondialdéhyde (MDA) et le 4-hydroxynonanal (4-HNE). Le MDA est le dérivé le plus mutagène produit par la peroxydation de lipide. (Atkin et al., 2005)

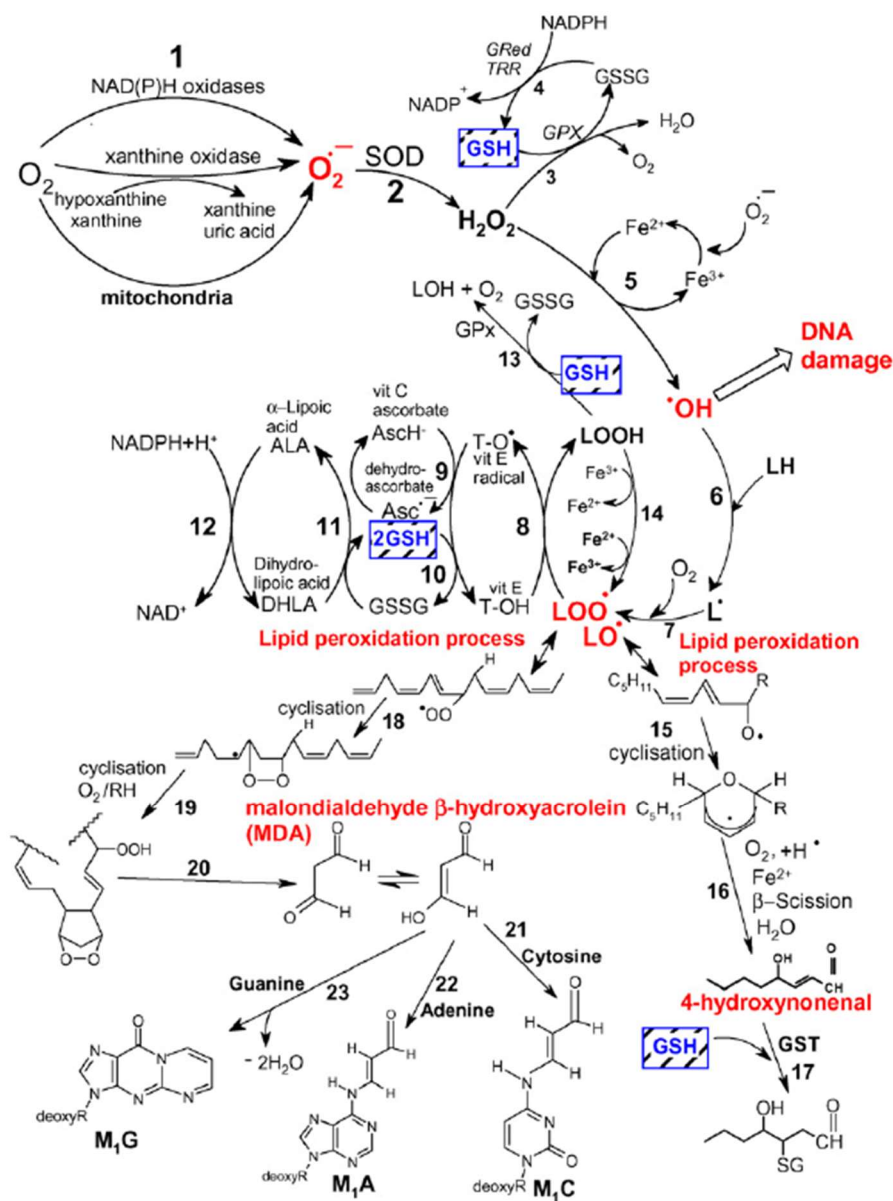


Figure 16 : Voie de formation et de neutralisation des espèces réactives de l'oxygène (ERO), modifié selon Valko et al. (2007)

ii. Stress oxydant et signalisation cellulaire

Les cellules communiquent entre elles et répondent à des stimuli extracellulaires par des mécanismes biologiques appelés signalisation cellulaire ou transduction de signaux. La transduction du signal est un processus qui permet de transmettre des informations de l'extérieur d'une cellule à divers éléments fonctionnels à l'intérieur de la cellule. La transduction du signal est déclenchée par des signaux extracellulaires tels que les hormones, les facteurs de croissance, les cytokines et les neurotransmetteurs.

Les signaux envoyés aux machines de transcription responsables de l'expression de certains gènes sont normalement transmis au noyau de la cellule par une classe de protéines appelées facteurs de transcription. En se liant à des séquences d'ADN spécifiques, ces facteurs régulent l'activité de l'ARN polymérase II. Ces processus de transduction du signal peuvent induire diverses activités biologiques, telles que la contraction musculaire, l'expression des gènes, la croissance cellulaire et la transmission nerveuse. (Thannickal and Fanburg, 2000)

Il a été démontré que les ERO et les ERN interfèrent avec l'expression de certains gènes et de voies de transduction du signal, parmi lesquelles la voie de signalisation de nuclear factor erythroid-2-related factor 2 (Nrf2) (Figures 17 et 18, et Tableau 12).

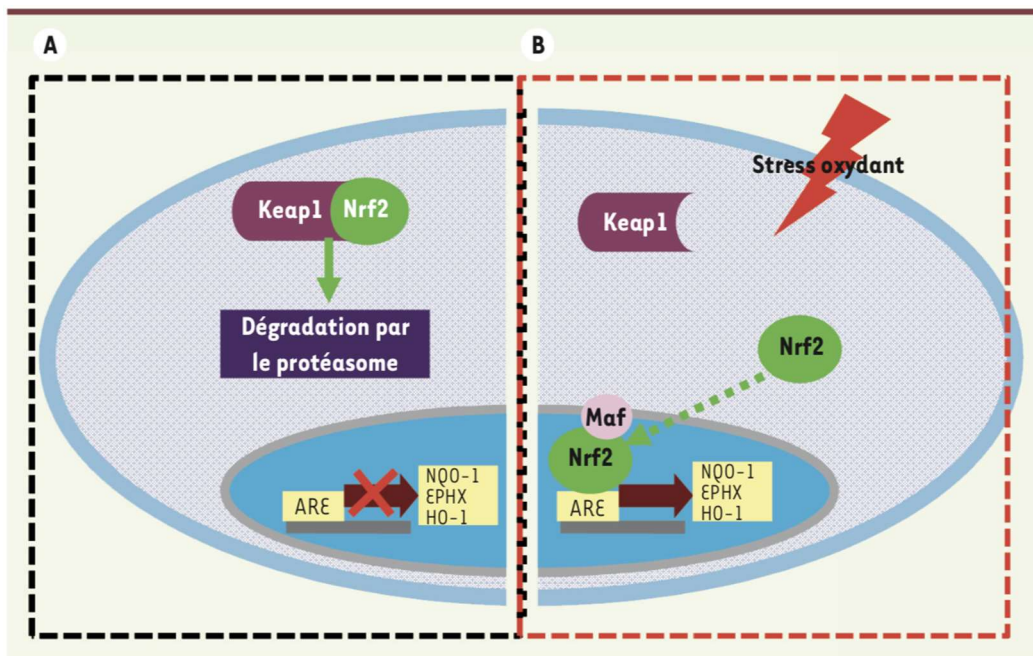


Figure 17 : Voie de signalisation du nuclear factor erythroid-2-related factor 2 (Nrf2) et transcription des gènes sous sa dépendance. Modifié d'après Boutten et al. (2011)

Tableau 12: Enzymes de phase II, antioxydants et cytoprotecteurs faisant intervenir Nrf2. Modifié d'après Boutten et al. (2011)

Mécanisme d'action	Gènes Nrf2 dépendants	Fonction
Homéostasie du glutathion (GSH)	- Glutathion-S-transférase (GST)* - Glutathion peroxydase (Gpx)	- Conjugue le GSH aux agents chimiques - Réduit le peroxyde d'hydrogène et alkyle les hydroperoxydes
Métabolisme des xénobiotiques	- NADPH quinone oxydoréductase 1 (NQO-1)* - Époxyde hydrolase 1 (EPHX-1)*	- Réduit les quinones et antioxydants endogènes, détruit l'anion superoxyde - Catalyse l'hydrolyse des époxydes
Réponse au stress/métabolisme du fer	- Hème oxygénase 1 (HO-1)* - Ferritine	- Catabolise l'hème en monoxyde de carbone, biliverdine et fer libre - Séquestre le fer libre

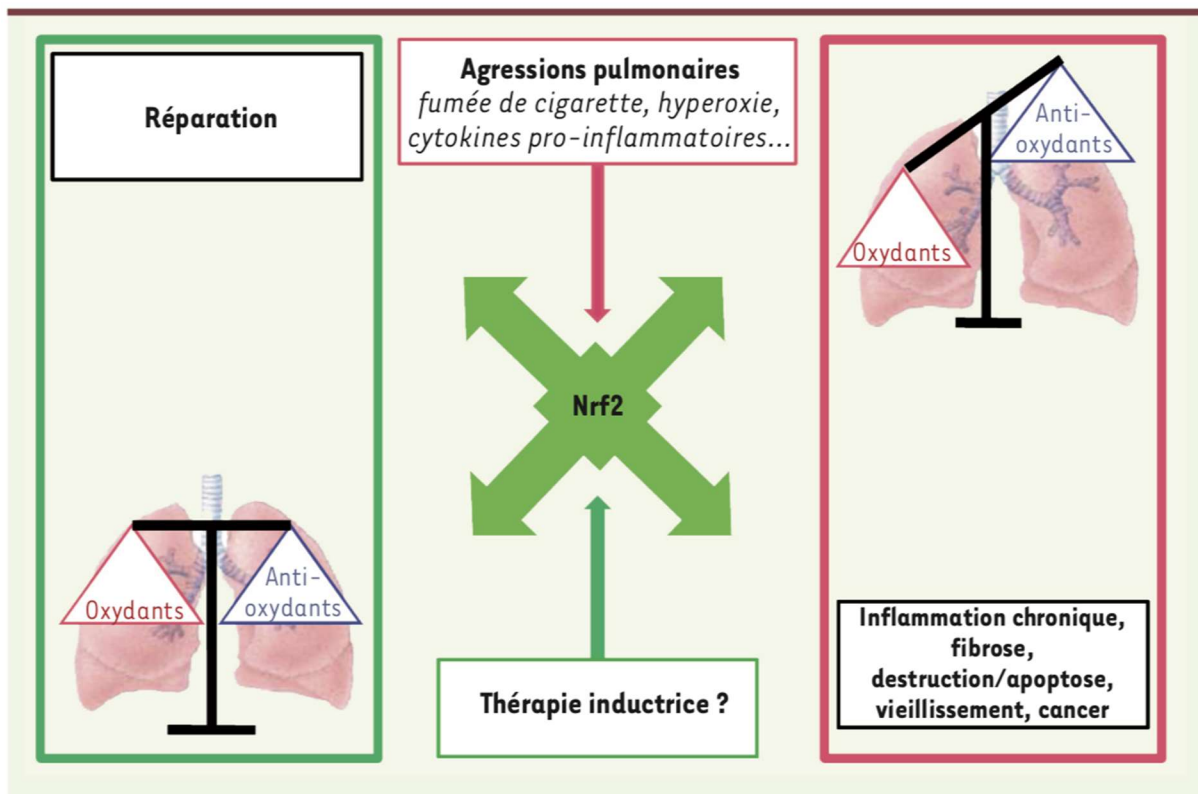


Figure 18 : Représentation schématique du rôle central de Nrf2 dans l'équilibre oxydants/antioxydants au niveau pulmonaire au cours des agressions. Modifié d'après Boutten et al. (2011)

iii. ROS et voies de signalisation induites par les ions métalliques

En accord avec la littérature scientifique, les ions métalliques, et en particulier certains dérivés des métaux présents dans les FS (e.g., Fe, Cu, Cr), catalysent la surproduction d'ERO et par conséquent des conditions de stress oxydant, altérant par la même l'homéostasie redox des tissus et des cellules, comme le montrent les Figures 19 à 23.

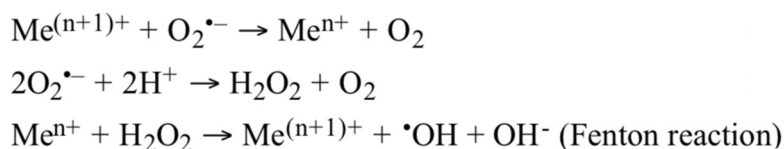


Figure 19 : Mécanismes communs impliquant la génération de l'anion superoxyde et du radical hydroxyle par la réaction de Fenton catalysée par le Fer (Fe), le Cuivre (Cu), le Chrome (Cr), le Vanadium (Va) et le Cobalt (Co). Modifié d'après Valko et al. (2005)

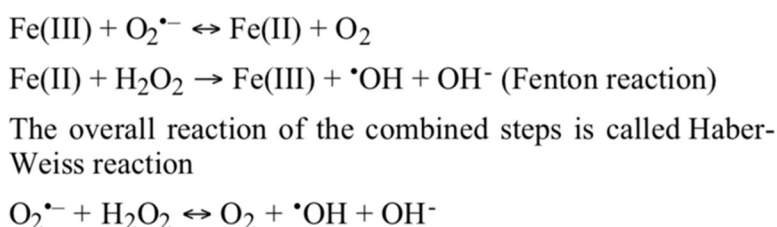


Figure 20 : Réactions de Fenton et d'Haber-Weiss, catalysée par le Fer (Fe). Modifié d'après Valko et al. (2005)



Figure 21 : Réactions de Fenton catalysée par le Cuivre (Cu). Modifié d'après Valko et al. (2005)

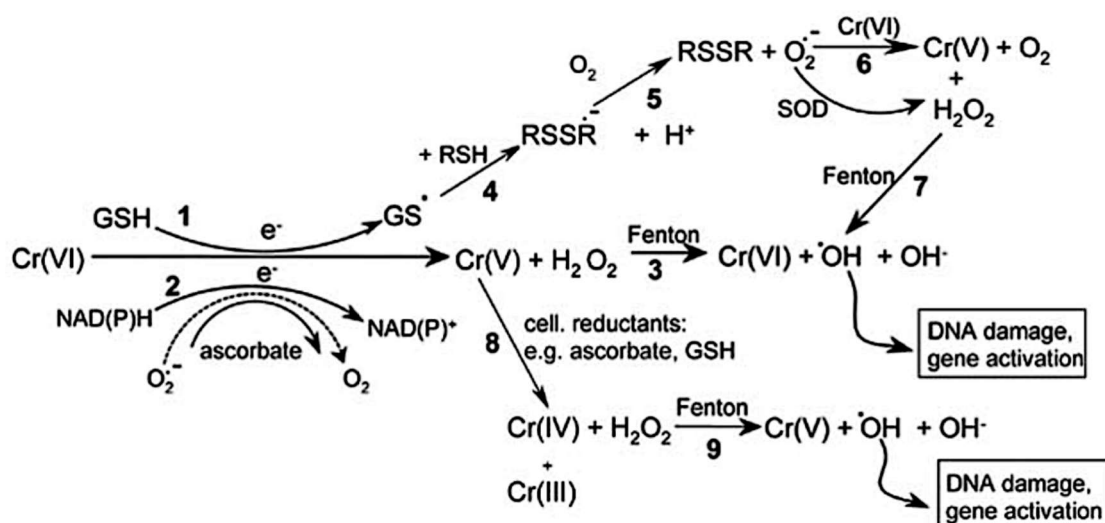


Figure 22 : Réactions de Fenton catalysée par le Chrome VI (CrVI). Modifié d'après Valko et al. (2005)

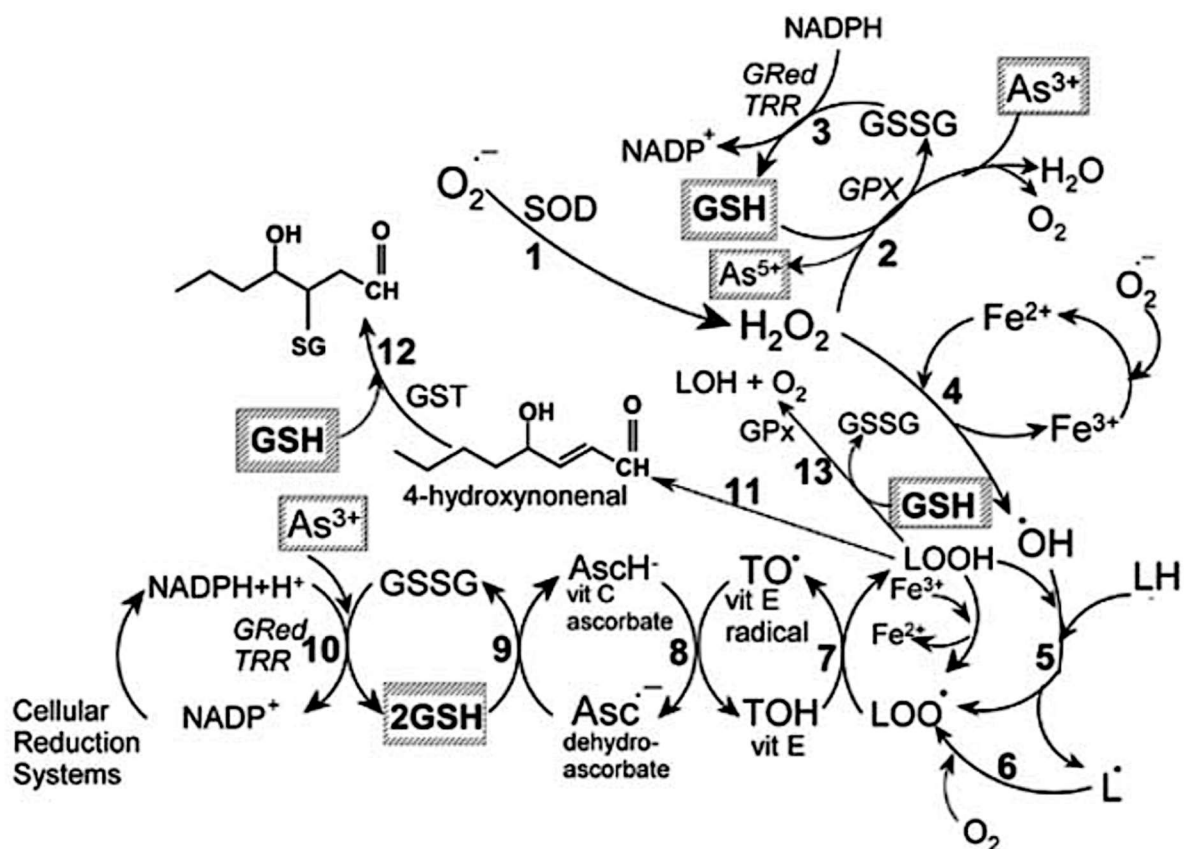


Figure 23 : : Réactions de Fenton catalysée par l'Arsenic (AsV). Modifié d'après Valko et al. (2005)

Les ions métalliques, issus des métaux (e.g., Fe, Cr, Mn, Si, Ni) notamment présent dans les FS à des concentrations très variables en fonction des procédés de soudage utilisés, et les ERO ainsi produites en excès, inhibent principalement les sérines/thréonines/tyrosines phosphorylées et phospholipides phosphatases.

L'altérations des protéines sur ces sites spécifiques est généralement provoquée par l'interaction entre les ERO électrophiles et les groupes sulfhydriles nucléophiles présents sur les résidus de cystéine des protéines, qui sont oxydés pour former des liaisons disulfures intramoléculaires ou intermoléculaires (Figure 25).

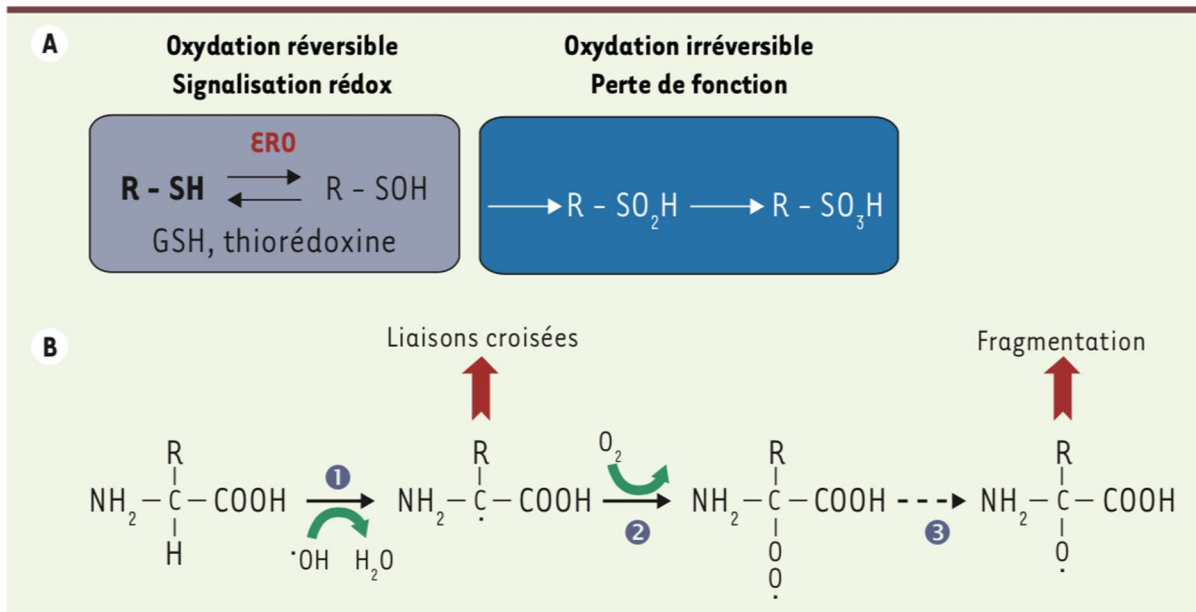


Figure 24 : Attaque radicalaire des protéines. D'après Migdal et al. (2011)

Ces changements structuraux modifient la conformation des protéines, ce qui entraîne la régulation à la hausse de plusieurs cascades de signalisation, dont les plus importantes sont les voies de signalisation dépendantes des facteurs de croissance kinase, src/Abl kinase, MAPK et PI3 kinase.

Ces cascades de signalisation conduisent à l'activation de plusieurs facteurs de transcription régulés par le système d'oxydoréduction (AP-1, NF-κB, p53, HIF-1, NFAT) (Figure 26).

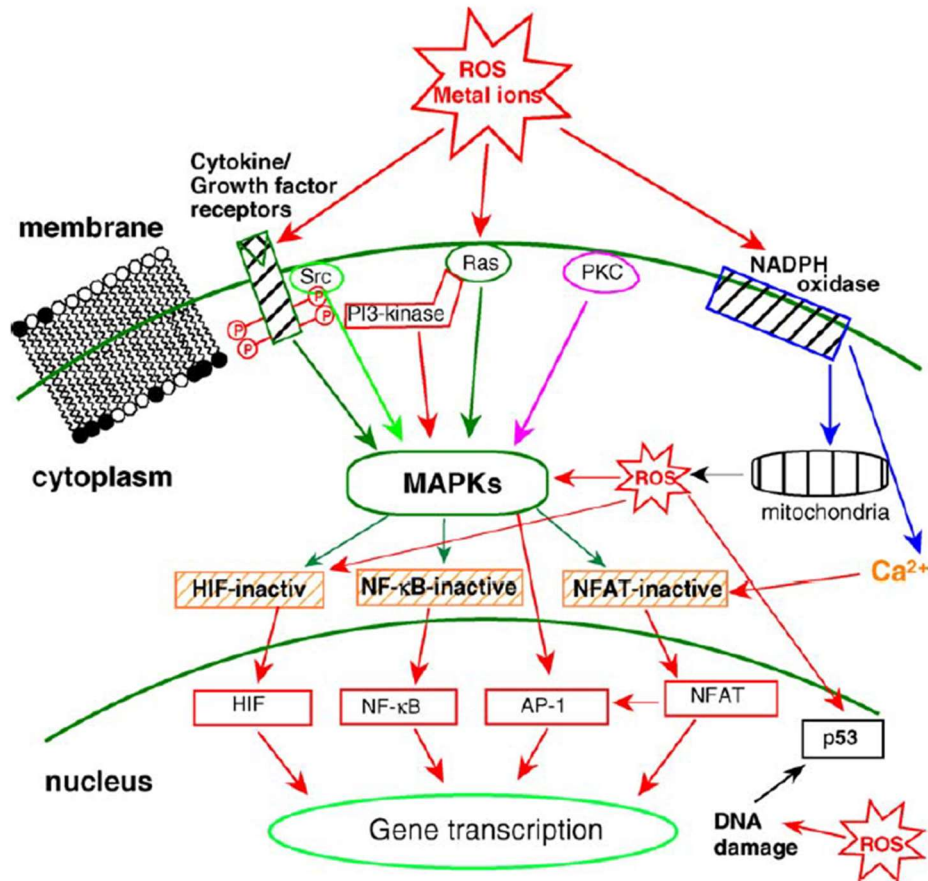


Figure 25 : Voies de signalisation induites par les espèces réactives de l'oxygène (ERO) et les ions métalliques modifié selon Valko et al (2006)

iv. FS et stress oxydant

Les FS contiennent des métaux tels que le Fe, le Cr, le Mn, aa Si, et le Ni qui ont la capacité de générer des ERO. La réactivité des métaux issus des FS est attribuée au changement d'état de transition des métaux ainsi émis qui apparaissent pendant le processus de soudage en raison de la forte énergie impliquée.

Comme préalablement expliqué, les métaux de transition tels que ceux présents dans les FS, à l'état d'espèces métalliques à degrés d'oxydation élevés, ont la capacité d'accepter et de donner des électrons individuels. La Figure 26 illustre la capacité des métaux utilisés dans les différents procédés de soudage d'atteindre, même temporairement, un état de transition ou de valence différent et de devenir généralement plus chimiquement réactif afin de catalyser la surproduction d'ERO, et, par conséquent, de provoquer une altération du statut redox des cellules et tissus en oxydant les macromolécules cellulaires et dérégulant les systèmes biologiques. (Leonard et al., 2010)

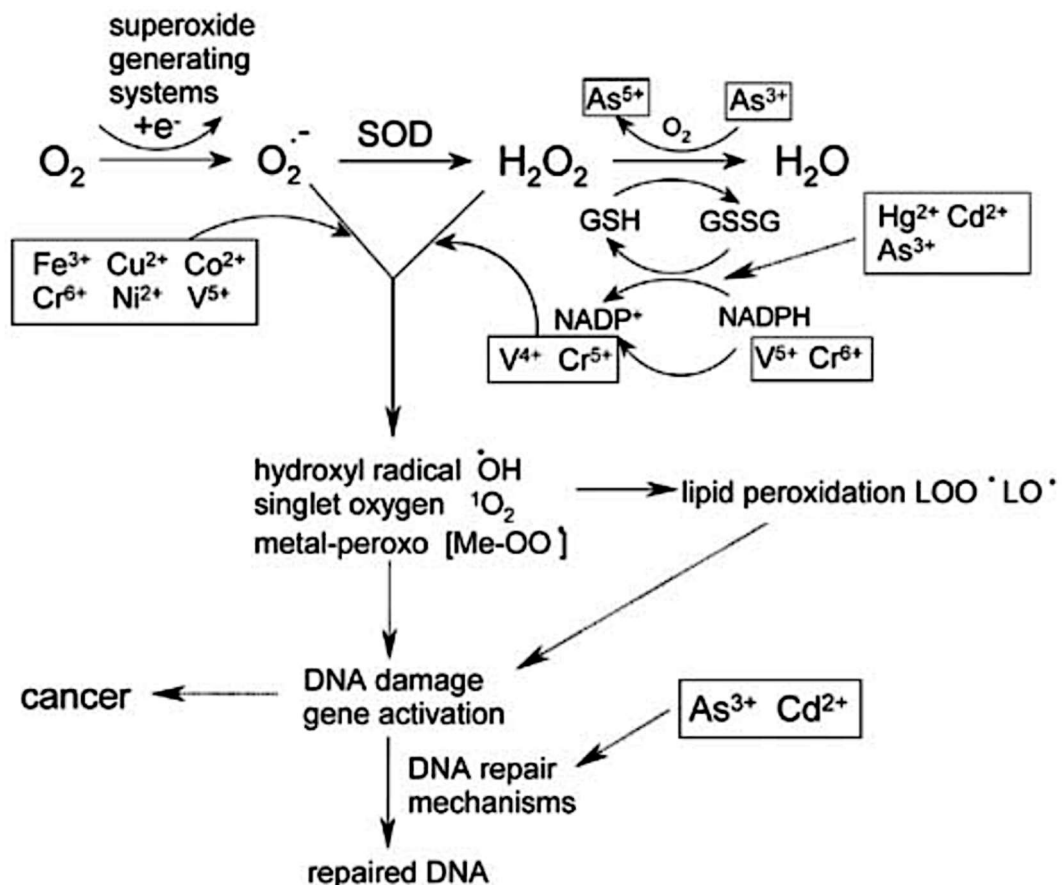


Figure 26 : Mécanismes impliqués dans l'induction d'un stress oxydant par les métaux. Modifié d'après Valko et al. (2005)

Ceci a particulièrement été observé avec le Cr, présent dans les métaux inoxydables et fortement émis lors des procédés de soudage de ces derniers. L'exemple du Cr est donc tout à fait approprié afin d'illustrer l'importance du stress oxydant et de ses conséquences en tant qu'inducteur des mécanismes cellulaires et moléculaires clefs impliqués dans la toxicité des métaux auxquels sont exposés les travailleurs réalisant des activités de soudage. La présence de CrVI confère aux FS une plus grande réactivité. L'absorption cellulaire est un facteur important dans la cancérogenèse induite par le CrVI. Le CrIII présente une cancérogenèse beaucoup plus faible raison de son incapacité à pénétrer dans les cellules. Comme indiqué par la Figure 22, après avoir pénétré dans les cellules, le CrVI est réduit en CrV et CrIV par des réducteurs cellulaires, tels que le glutathion, l'ascorbate, la NADPH et la glutathion réductase/NADPH, ce qui entraîne un cycle redox avant que le CrVI ne soit finalement converti en CrIII, la forme la plus stable parmi les différents états d'oxydation du chrome. Pendant le cycle redox, l'oxygène moléculaire est réduit en radical O_2 , qui produit

H₂O₂ par dismutation. L'H₂O₂ réagit ensuite avec CrV ou CrIV pour générer le radical \cdot OH qui peuvent tous être impliqués dans la cancérogenèse induite par le CrVI. (Antonini et al., 2005) (Liu et al. 2001)

Il a également été démontré que plus la taille des particules est petite, plus la surface spécifique de ces dernières est importante et, par conséquent, plus leur potentiel réactif est important. La fraction ultrafine des FS peut par conséquent être suspectée d'avoir une réactivité chimique et/ou biologique plus importante que les autres fractions, grossière ou fine. De plus, les particules les plus fines ont la capacité de pénétrer plus profondément dans les poumons et d'y résider plus longtemps, provoquant généralement des dommages oxydatifs plus ou moins important (Antonini et al., 1998) (Leonard et al., 2010).

Le Tableau 13 présente les principales études expérimentales sur la mise en évidence d'un stress oxydant en réponse à l'exposition aux FS. Ainsi, les dommages oxydatifs ainsi provoqués par les espèces métalliques issues des métaux présents dans les FS pourraient être dus à la production directe d'ERO et/ou d'ERN, qui varie en fonction de la solubilité des particules de FS. Les particules insolubles des aciers doux ont été décrites comme générant moins d'ERO et/ou d'ERN que les particules solubles des aciers inoxydables. En revanche, elles auraient un temps de résidence dans les poumons plus important que celles issues des aciers inoxydables. Les particules de FS ainsi déposées induisent le recrutement et l'activation de phagocytes, objectivée par l'augmentation du nombre de neutrophiles et de macrophages et par la présence de cytokines pro-inflammatoires, également capables de produire des ERO et des ERN. (Antonini et al. 2005)

L'exposition aux FS de l'acier inoxydable a induit chez le rat une augmentation de l'activité de la lactate déshydrogénase (LDH), enzyme cytosolique constitutive mesurable lorsque que les cellules ont perdu l'intégrité de leurs membranes, dans le liquide du lavage broncho-alvéolaire. (LBA) Une augmentation du MDA et du 4-HNE, deux marqueurs de la peroxydation lipidique, a également été observée dans les homogénats de poumons de ces mêmes rats exposés aux FS de l'acier inoxydable. (Taylor, 2003a)

De plus, Antonini et al. (2005) ont rapporté que les FS des aciers inoxydables seraient également susceptibles de générer des ERO pouvant causer des dommages à l'ADN, une cytotoxicité des macrophages pulmonaires ainsi qu'une apoptose des cellules pulmonaires *in vitro* et *in vivo*. Ces effets seraient à nouveau étroitement reliés à la présence de chrome VI,

soluble et capable de générer directement des ERO via une réaction de type Fenton (Antonini et al., 2005).

Ces observations ont été supportées par d'autres études, menée chez des soudeurs exposés à des FS d'aciers inoxydables, qui ont montré une augmentation, rapide mais réversible, des concentrations plasmatiques et urinaires de 8-OHdG 3 heures après l'exposition. (Graczyk et al., 2015) (Liu et al. 2013)

Enfin, selon des travaux rapportés par Krishnaraj et al. (2017, 2018), l'exposition de rats aux FS d'aciers inoxydables modifierait l'expression de gènes impliqués dans le stress oxydant, la détoxification, l'inflammation, la réparation de l'ADN, la progression du cycle cellulaire et l'apoptose (Krishnaraj et al., 2017) (Krishnaraj et al., 2017).

Tableau 13: Principales études expérimentales sur la mise en évidence d'un stress oxydant en réponse à l'exposition aux Fumées de Soudage (FS).

Type d'étude	Procédé soudage	Fraction d'exposition /durée	Population étudiée	Exposition	Conclusion	Réf.
In vitro/In vivo	MMA-SS (41 % Fe, 29 % Cr, 17 % Mn, 3 % Ni) GMA-MS (85 % Fe, 14 % Mn)	Génération de ROS induite par les fumées de soudage et modification du potentiel de la membrane mitochondriale ®Formation d'adduits P-HNE induits par les fumées de soudage et expression de Nrf2 ®Analyse de l'ARNm par qPCR ®Analyse par Western blot ®Caspases -3/7	Rat SPRAGUE DAWLEY Cellules RAW264.7	Rats : 2.0 mg/rat GMA-MS / MMA-SS FS LBA 1-3 et 10j après l'exposition Cellules : exposées 24h aux concentrations : 0, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, and 100 µg/ml	<i>In Vivo</i> : MMA-SS => augmentation significative de l'expression de COX-2, Nrf2 et HO-1 dans les tissus pulmonaires /p FS GMA-MS <i>In vitro</i> : MMA-SS => réactions inflammatoires activation des voies de signalisation ROS/P-HNE/ERK1/2/Nrf2	(Shoeb et al., 2017a)
In vivo	MMA-SS GMA-MS	Albumine Activité LDH Mesure des radicaux libres Peroxydation lipidique 4-HNE/MDA Mesure de l'inflammation = Cytokines TNF- α , IL-1, IL-6, and IL-10	Rat SPRAGUE DAWLEY	Instillation intratrachéale - 2 mg/rat LBA 3 h et J1, 3 et 6	MMA-SS : ↗ continue du poids des poumons jusqu'au 6e jour + peroxydation lipidique élevée au 3e jour. MMA-SS+GMA-MS : ↗ des macrophages et des neutrophiles (LBA), prolongée jusqu'au 6e jour pour MMA-SS. MMA-SS éosinophiles ++, détérioration d barrière alvéolaire-capillaire. MMA-SS+GMA-MS : cytotoxicité ++, MMA-SS= réponse max à J3. Augmentation TNF- α et IL-6 dans la première fraction du BAL	(Taylor et al. 2003b)

Tableau 12 (suite) : : Principales études expérimentales sur la mise en évidence d'un stress oxydant en réponse à l'exposition aux Fumées de Soudage (FS).

Type d'étude	Procédé soudage	Fraction /durée d'exposition	Population étudiée	Exposition	Conclusion	Référence
Homme (post-mortem) In vivo	MMAW-SS	Examen microscope électronique et optique	Homme (tissus pulmonaires post-mortem) Rat SPRAGUE DAWLEY	Instillation intratrachéale (une fois par semaine 6,6 µg/µL solution saline) SS sur 28 semaines	Accumulations de particules de soudure (agglomérats métalliques Fe, Cr, Ni) déposées et persistent dans les structures pulmonaires.	(Antonini, 2013)
In vitro	MMAW-SS à base de Nickel MMAW-SS à base de Cobalt	Chélation des FS Cytotoxicité : Mesure de l'activité LDH Evaluation de l'activité métabolique : <i>capacité des cellules A549 à réduire le 3-(4,5-diméthiazol-2 yl)-2;bromure de diphenyl tétrazolium (MTT)</i> Inflammation : ARNm et sécrétion de l'IL-8 (RT-qPCR et ELISA) Stress oxydant : Glutathion total réduit (GSH) et oxydé (GSSG) et ERO intracellulaires	Cellules épithéliales alvéolaires humaines A549	Doses d'exposition : 50 ; 42, 25, et 12 mg/ml	Production d'IL-8 à 6h et diminue à 24h Augmentation de l'ARNm IL-8 à 6 et 24 h Production d'ERO après 2 h Epuisement concomitant de l'antioxydant GS Rôle important du stress oxydatif médié par les particules métalliques,	(McNeilly et al., 2004a)

b. INFLAMMATION

i. Généralités sur l'inflammation

L'inflammation est la réponse naturelle de l'organisme à une agression. Elle a pour rôle d'éliminer les agents pathogènes et amorcer le processus de réparation et peut être aiguë ou chronique. Dans le poumon, ce processus implique la sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires et anti-inflammatoires par les cellules épithéliales et les macrophages alvéolaires. Parmi ces médiateurs, les cytokines et les chimiokines sont une grande famille de protéines qui participent à la réponse inflammatoire et ont la capacité d'agir à distance sur d'autres cellules et de réguler leur activité (Figure 27).

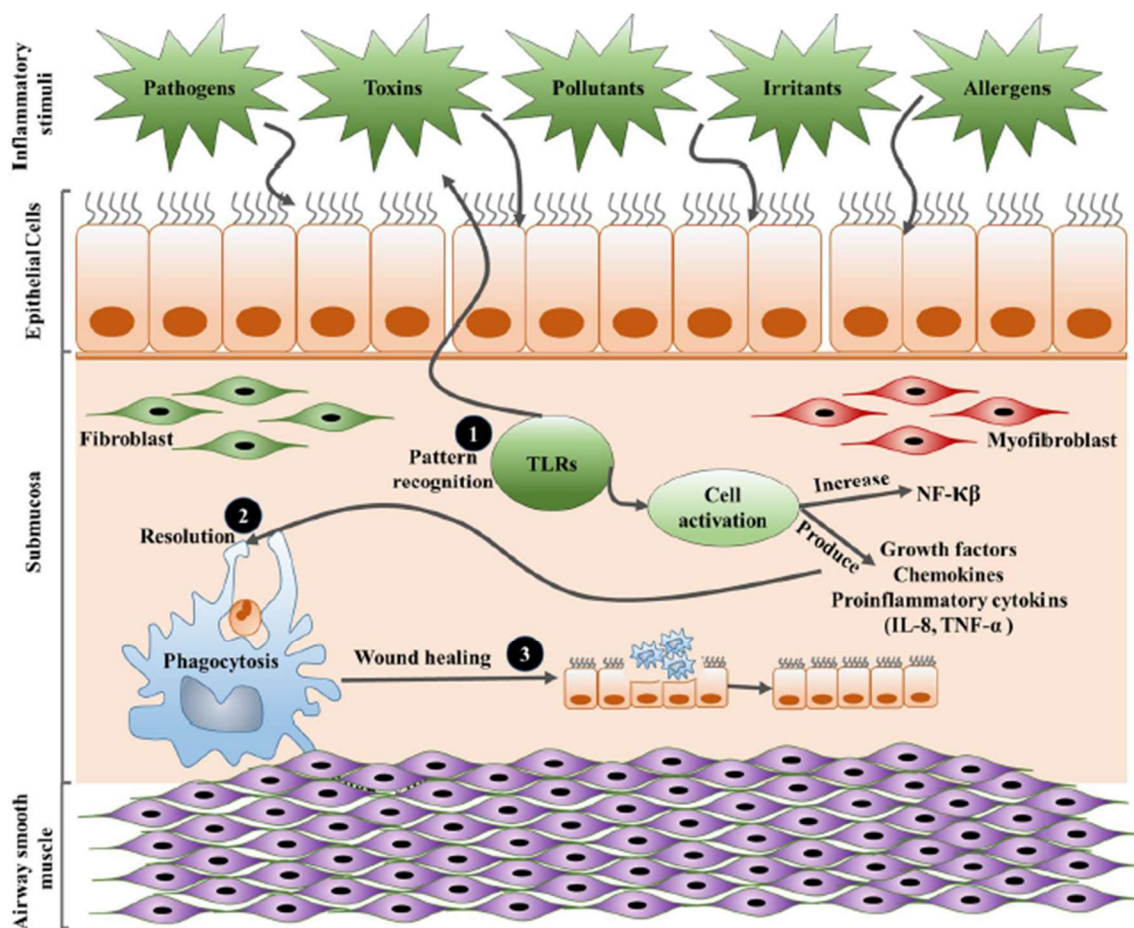


Figure 27 : Réponse inflammatoire générale dans les maladies respiratoires modifié selon Aghasafari et al. (2019b)

L'inflammation aiguë est un mécanisme bénéfique à l'organisme qui aide à isoler la région lésée afin de permettre la mobilisation du système immunitaire qui va se charger de la réparation des dommages. L'inflammation chronique apparaît quant à elle lorsque le système immunitaire est dépassé. Le processus normal de l'inflammation conduit alors à un déséquilibre entre les phases de destruction ciblée et de réparation contrôlée et peut aboutir à des dommages tissulaires.

De manière générale, lorsque le poumon est exposé à un agent pathogène, ce dernier est reconnu par les cellules épithéliales et les macrophages qui vont enclencher la production de facteurs de croissance, de chimiokines, de cytokines, qui ont pour rôle de recruter des autres cellules, les PNN, sur le site de l'infection. Parmi les médiateurs pro-inflammatoires sécrétés par les cellules impliquées dans la réponse inflammatoire, le facteur de nécrose tumorale-alpha (TNF- α) induit l'augmentation de l'expression des molécules d'adhésion dans les cellules endothéliales et des capillaires pulmonaires. Les cellules activées phagocytent les agents pathogènes dans la région lésée pendant la phase de résolution et entament la phase de remodelage tissulaire qui consiste à réparer l'épithélium endommagé.

A noter qu'au niveau pulmonaire, même si la réaction inflammatoire, dans sa phase d'initiation comme dans celle d'exacerbation, requiert la participation de nombreux types cellulaires, chacun avec un rôle bien défini de par ses caractéristiques cellulaires et moléculaires spécifiques, les cellules épithéliales jouent un rôle clef dans l'orchestration de la réaction inflammatoire. (Lumb et Horner, 2013) (Figure 28)

La première phase de la réponse inflammatoire aiguë repose sur l'immunité innée. Les récepteurs de la famille des Pattern Recognition Receptors (PRR) leur permettent de reconnaître des motifs pathogéniques étrangers à l'organisme ou Pathogen Associated Molecular Patterns (PAMP) et des motifs moléculaires associés aux dégâts cellulaires ou Damage-Associated Molecular-Pattern (DAMP). Les récepteurs PRR exprimés à la surface des cellules et des endosomes appartiennent à la famille des Toll Like Receptors (TLR), tandis que les NOD Like Receptor (NLR) sont exprimés dans le cytoplasme. L'association des NLR avec la procaspase-1 forme des complexes protéiques nommés inflammasomes. L'inflammasome le plus étudié à ce jour est le NOD-Like Receptor family, Pyrin domain containing 3 (NLRP3) dont la stimulation conduit à la sécrétion d'IL-1 β . Les différents types de PRR ont des structures différentes et peuvent être activés par différents types de PAMP (e.g. bactéries gram -, gram +, virus) et de DAMP (e.g. ADN mitochondrial, HSP70).

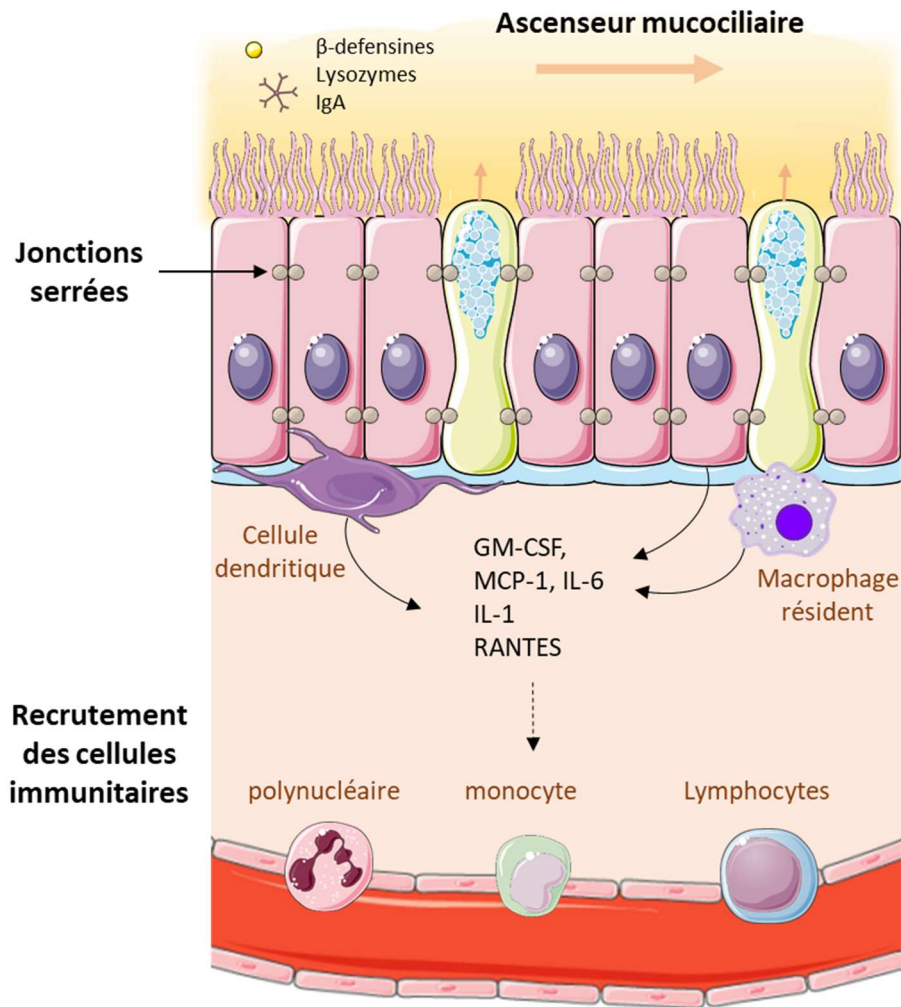


Figure 28 : Rôle de l'épithélium bronchique dans l'immunité innée et la réaction inflammatoire d'après Aghasafari et al. (2019b)

Néanmoins, ils partagent beaucoup de similitudes dans la transduction du signal, notamment pour l'activation du Nuclear Factor-kappa B (NF- κ B), qui conduit à la transcription de certains gènes pro-inflammatoire (Liu et al. 2013). Le facteur de transcription NF- κ B joue un rôle crucial de chef d'orchestre de la réponse inflammatoire en coordonnant la sécrétion des très nombreux acteurs pro- et anti-inflammatoires des différents réseaux cyto-et chemokiniques. (Liu et al. 2017) (Figure 29). Il est notamment étroitement impliqué dans l'activation de l'inflammasome NLRP3 qui nécessite deux signaux, l'amorçage et l'activation (Figure 30). L'amorçage, par la présence d'un corps étranger, conduit à l'activation de la signalisation NF- κ B. Dans le noyau, le NF- κ B actif favorise la transcription de gènes dépendants de NF- κ B, tels que NLRP3, Pro-IL-1 β et Pro-IL-18, qui sont nécessaires à l'activation de l'inflammasome.

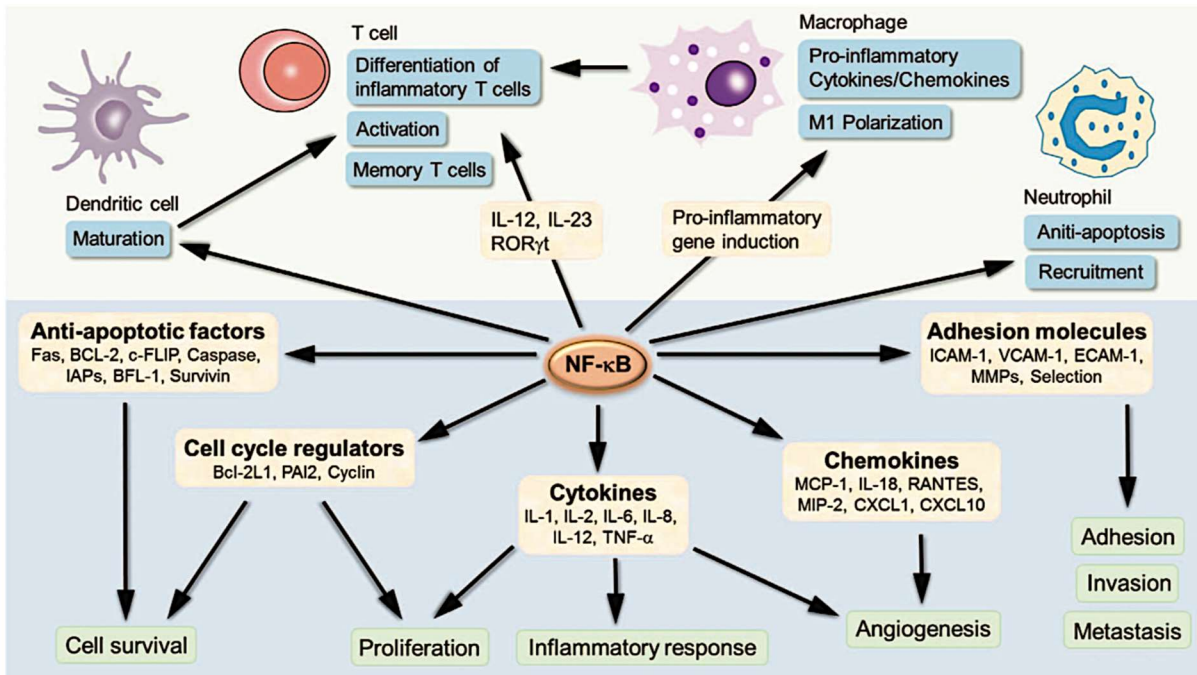


Figure 29 : Gènes cibles du transcription nuclear factor-kappa B ($\text{NF-}\kappa\text{B}$) impliqués dans le développement et la progression de l'inflammation. Modifié d'après Liu et al. (2013)

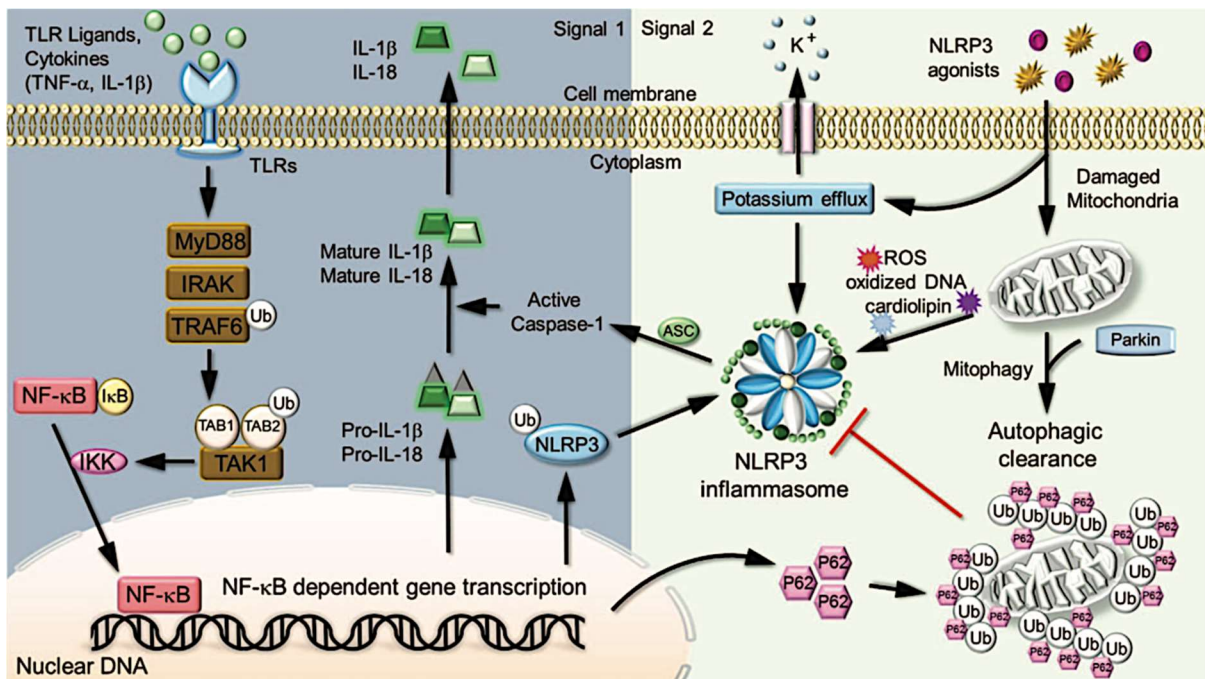


Figure 30 : Rôle du nuclear factor-kappa B ($\text{NF-}\kappa\text{B}$) dans la régulation de l'inflammasome NOD-Like Receptor family, Pyrin domain containing 3 (NLRP3). Modifié d'après Liu et al. (2013)

Le deuxième signal d'activation de l'inflammasome est fourni par les agonistes de NLRP3 qui l'activent NLRP3 pour déclencher l'assemblage de l'inflammasome et la sécrétion d'IL-1 β mature (Liu et al. 2013). En outre, NF- κ B interagit aussi avec Nrf2, acteur crucial dans la régulation de l'homéostasie redox. (Bhandari et al. 2021) (Wardyn, 2015) (Figure 31)

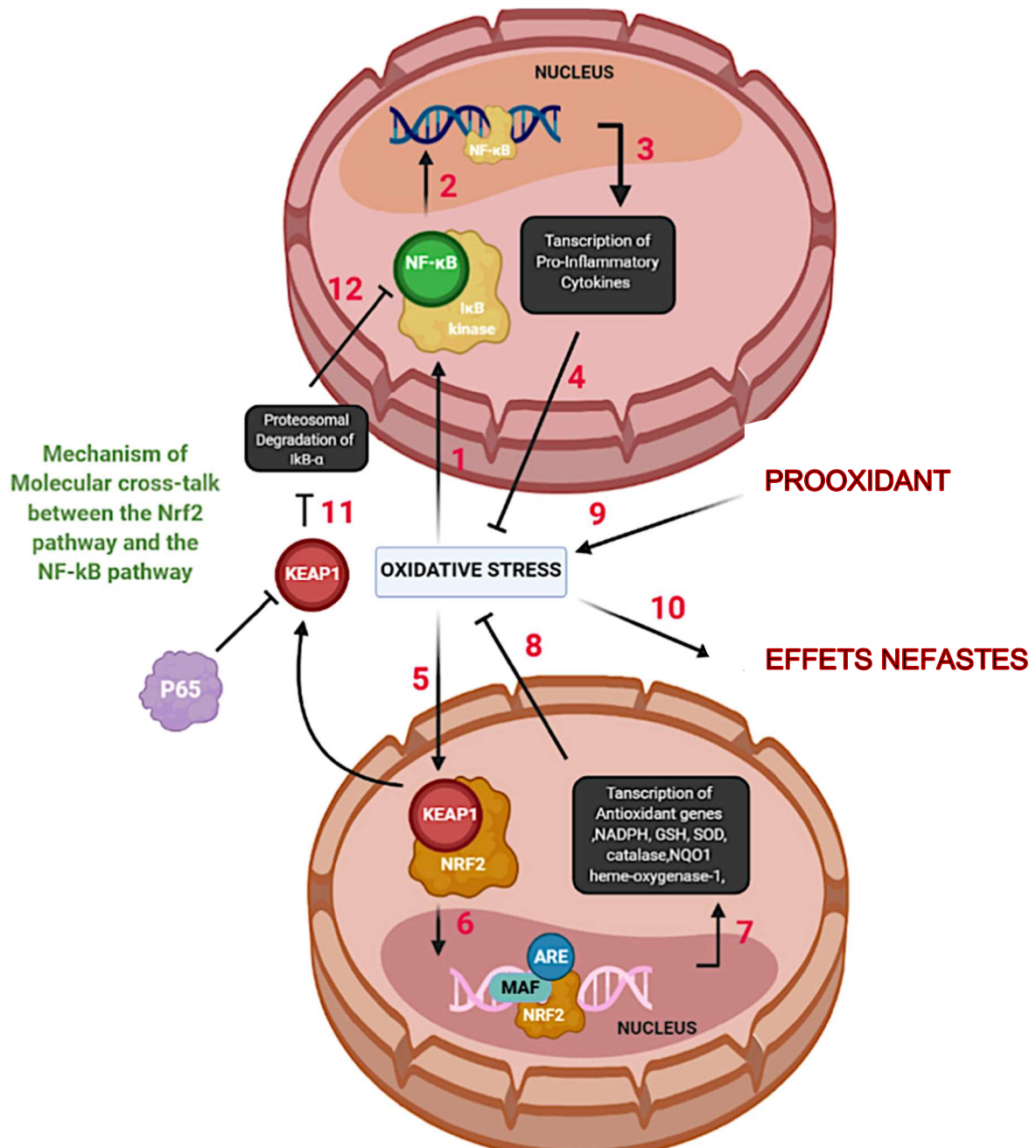


Figure 31 : Interactions entre les voies de signalisation du nuclear factor-kappa B (NF- κ B) et du nuclear factor erythroid-2-related factor 2 (Nrf2). Modifié d'après Bhandari et al. (2021)

Comme indiqué sur la Figure 31, l'interaction entre les voies NF- κ B et Nrf2 est médiée par des stimuli pro-oxydants. L'augmentation du stress oxydatif/de l'orage cytokiniques conduit à l'activation de la kinase IK, qui provoque la phosphorylation de l'I κ B- α , un inhibiteur de NF- κ B, et entraîne la dégradation protéasomale de l'I κ B- α (1). NF- κ B se lie à sa région, la sous-unité p65 après avoir migré dans le noyau. p65 est un inhibiteur de KEAP1 (2). Cela entraîne la transcription de cytokines pro-inflammatoires et d'autres gènes tels que TNF- α , IL- β , IL-6, iNOS, COX-2 (3). La voie de signalisation NF- κ B et ses cytokines pro-inflammatoires qui contribuent aggravent l'état oxydatif (4). Le stress oxydant conduit à l'activation de la voie de signalisation Nrf2 entraînant la dissociation de Nrf2 de son inhibiteur Keap1 (5). Il provoque alors la translocation de Nrf2 vers le noyau et s'associe à la protéine Maf et à l'élément de réponse antioxydant (ARE) (6). La transcription des gènes antioxydants et des enzymes de phase II telles que NADPH, GSH, SOD, catalase, hème-oxygénase-1 et NQO1 se produit, ce qui inhibe les ROS (7). Dans l'ensemble, les interventions génétiques et la transcription qui en résulte montrent des implications positives de la voie de signalisation Nrf2 dans la réduction du stress oxydatif (8). Des stimuli pro-oxydants induisent un stress oxydant (9). Le stress oxydant et l'inflammation entraînent des effets délétères (10). Les éléments libres de Keap1 empêche la dégradation de I κ B- α (11). L'inhibition de la voie NF- κ B est possible. (12).

Par ailleurs, les cellules épithéliales ont également des récepteurs membranaires à activité tyrosine kinase, dont le plus connu est l'Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR). Plusieurs ligands sont capables de se lier à différents domaines de l'EGFR (e.g. Transforming Growth Factor- α (TGF- α), épiréguline, Epidermal Growth Factor (EGF), amphiréguline). L'activation d'EGFR entraîne sa dimerisation, et l'activation d'une ou plusieurs voies de signalisation en aval telles que PhosphoInositide 3-Kinase-AKT (PI3K/AKT), Janus Kinase/Signal Transducers and Activators of Transcription (JAK/STAT), et les MAP kinases (MAPK). (Grove et al. 2018) (Vallath et al. 2014) Ces voies de signalisations impliquent les kinases et jouent toutes un rôle important dans la régulation de la survie et de la prolifération cellulaire. En réponse à ces stimuli, les cellules épithéliales, les macrophages résidents et les cellules dendritiques (cellules sentinelles) initient et orientent la réponse immunitaire non spécifique via l'activation de facteurs de transcription impliqués dans la réaction inflammatoire (NF- κ B), Activator Protein-1 (Ap-1). (Whitsett et Alenghat, 2014) Comme préalablement décrit, l'activation de ces facteurs de transcription conduit à la sécrétion de

médiateurs pro-inflammatoires (e.g. Interleukine 1 (IL-1), Interleukine 6 (IL-6), Tumor Necrosis Factor- α (TNF α), Granulocyte Colony Stimulating Factor (GM-CSF), Monocyte Chemoattractant Protein 1 (MCP-1), Regulated on Activation, Normal T cell Expressed and Secreted (RANTES)). Le microenvironnement résultant provoque le recrutement, la prolifération et l'activation des cellules immunitaires dans la sous-muqueuse telles que les lymphocytes, les macrophages, les mastocytes et les polynucléaires (Figure 28).

La réaction inflammatoire fait partie des processus de l'immunité innée. Elle est non spécifique et a le même mode d'action, conservé au cours de l'évolution, quel que soit l'agent pathogène rencontré. Si l'inflammation est insuffisante, les mécanismes de l'immunité adaptative se mettent en place.

L'immunité adaptative, qui correspond à une phase secondaire de la réaction inflammatoire, est médiée par les lymphocytes. Après phagocytose des agents pathogènes, les cellules présentatrices d'antigènes, à savoir les cellules dendritiques et les macrophages, migrent vers les ganglions lymphatiques et présentent les antigènes spécifiques des pathogènes rencontrés aux lymphocytes T, plus précisément les lymphocytes CD4 et CD8, afin d'initier la réponse adaptative. Les lymphocytes CD8 activés prolifèrent et se différencient en cytotoxiques pour détruire spécifiquement les cellules infectées via l'immunité cellulaire. Les lymphocytes CD4 activés se différencient alors en lymphocytes auxiliaires, qui vont sécréter des cytokines majeures et servir d'intermédiaires clefs dans la réponse immunitaire. (Berger et al. 2000)

Les lymphocytes Th1 sont les lymphocytes auxiliaires de la réponse cellulaire. Ils sécrètent principalement de l'IFN γ , du TNF, de l'IL-1, de l'IL-2 et du GM-CSF. Les cytokines de type Th1 ont tendance à produire une réponse pro-inflammatoire pour éliminer les éléments étrangers. Elles induisent notamment le recrutement et l'activation des macrophages et des lymphocytes cytotoxiques, ainsi que la sécrétion d'ERO et de protéases. (Berger et al. 2000) La réponse Th1 peut être à l'origine de lésions tissulaires, notamment dans le cas d'une inflammation chronique. Elle bloque le développement des Th2 via la production d'IFN γ .

Les lymphocytes Th2 produisent principalement de l'IL-4, IL-5, IL9, IL-13 et l'IL-10. La réponse de type Th2 est associée avec une inflammation éosinophilique et la réaction allergique. Elle induit la production d'immunoglobuline E (IgE) par les lymphocytes B

différenciés en plasmocytes, l'activation des mastocytes et des éosinophiles. L'IL-10 a une activité anti-inflammatoire en inhibant l'activité des cellules Th1 et l'expression du TNF- α et des interférons. L'activité des Th1 et des Th2 est donc mutuellement antagoniste. La réponse immunitaire est polarisée, balance Th1/Th2, en faveur d'un type de réponse en fonction du microenvironnement cytokinique. (Brines et al. 2016)

La résolution de la réaction inflammatoire doit ensuite contribuer à limiter les dommages tissulaires et l'évolution de l'inflammation aiguë en inflammation chronique. Les mécanismes anti-inflammatoires sont notamment médiés par la sécrétion de cytokines et chemokines anti-inflammatoires (e.g., IL-10, TGF- β). Ces mécanismes comprennent non seulement l'inhibition du recrutement et de l'activation des cellules immunitaires, mais aussi leur élimination au niveau des foyers d'inflammation par efferocytose. La sécrétion d'antiprotéases et d'enzymes anti-oxydantes permet de limiter les atteintes cellulaires et tissulaires et, conjointement, les mécanismes de réparation de l'épithélium sont instaurés (Chen et al. 2017) Toutefois, en cas d'exposition récurrente à des stimuli pro-inflammatoire, la réponse anti-inflammatoire est généralement insuffisante pour rétablir l'homéostasie et une transition d'une inflammation aiguë à une inflammation chronique est alors très fréquente (Figure 32).

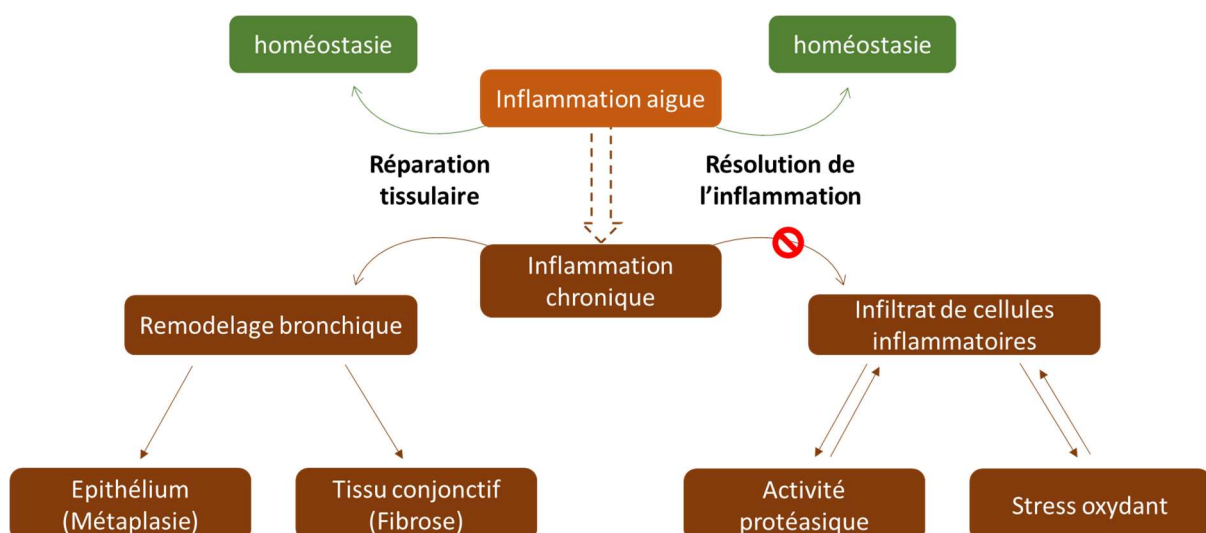


Figure 32 : Evolution d'une réponse inflammatoire aiguë en une réponse inflammatoire chronique. Modifiée d'après Chen et al. (2017)

ii. Inflammation et pathologies pulmonaires

Du fait de leur prévalence élevée, le taux de mortalité associé, et les coûts sanitaires engendrés pour la société, les pathologies respiratoires chroniques telles que l'asthme et la BPCO constituent un enjeu de santé publique majeur. Ces pathologies sont toutes deux caractérisées par une inflammation chronique des voies respiratoires, influencée par des facteurs environnementaux, et des modifications structurelles de l'épithélium pouvant conduire à certaines déficiences fonctionnelles. Malgré certaines similitudes observées au niveau symptomatique, les causes et les mécanismes inflammatoires à l'origine de ces deux pathologies sont différents.

L'asthme et la BPCO sont des pathologies inflammatoires chroniques ayant pour conséquence une diminution de la fonction respiratoire, généralement réversible dans l'asthme intermittent, et partiellement irréversible dans l'asthme sévère et la BPCO. Ces bronchopneumopathies chroniques sont toutes deux caractérisées par une infiltration de cellules immunitaires responsable d'une réaction inflammatoire excessive, et par des modifications structurelles des voies respiratoires, associées à une diminution du flux d'air. Toutefois, les caractéristiques observées lors de l'inflammation et du remodelage tissulaire diffèrent entre ces deux pathologies (Figure 33). Dans l'asthme, les lymphocytes Th2, les éosinophiles et les mastocytes sont prédominants tandis que dans la BPCO, ce sont les lymphocytes Th1 et T CD8, les macrophages et les neutrophiles qui prédominent. Concernant le remodelage tissulaire, les deux pathologies induisent un épaissement de la muqueuse respiratoire, davantage au niveau bronchique dans l'asthme et bronchiolaire dans la BPCO, ainsi qu'une hypertrophie des glandes à mucus, une hyperplasie des cellules caliciformes et une obstruction respiratoire causée par l'exsudat inflammatoire et l'hypersécrétion de mucus. L'hyperréactivité bronchique, l'épaississement de la membrane basale et du muscle lisse bronchique sont des éléments caractéristiques de l'asthme alors que la métaplasie squameuse, la fibrose péribronchiolaire et la destruction des parois alvéolaires sont décrits dans la BPCO. Toutefois, la distinction entre ces deux pathologies n'est pas toujours évidente. En effet, l'infiltration neutrophilique est également observée dans certaines formes d'asthme. De plus, certains patients atteints de BPCO présentent également une infiltration éosinophilique qui pourrait être orchestrée via la sécrétion d'IL-33 par les cellules épithéliales. Alors que les symptômes asthmatiques surviennent davantage chez les enfants et les jeunes adultes, la BPCO touche plus communément les adultes de plus de 40 ans, et il devient plus

complexe de distinguer ces deux pathologies avec l'âge. Environnementalement, 10 % des patients présenteraient des symptômes des deux pathologies (Lumb, 2017). Ce syndrome de chevauchement a été reconnu en 2014 et nommé Asthma-COPD Overlap Syndrome (ACOS) par un consensus des organisations Global initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) et Global Initiative for Asthma (GINA). Les patients asthmatiques ayant progressé vers l'ACOS ont généralement un asthme d'apparition tardive et une fréquence d'exacerbation plus fréquente avant que la BPCO soit diagnostiquée (To et al. 2016).

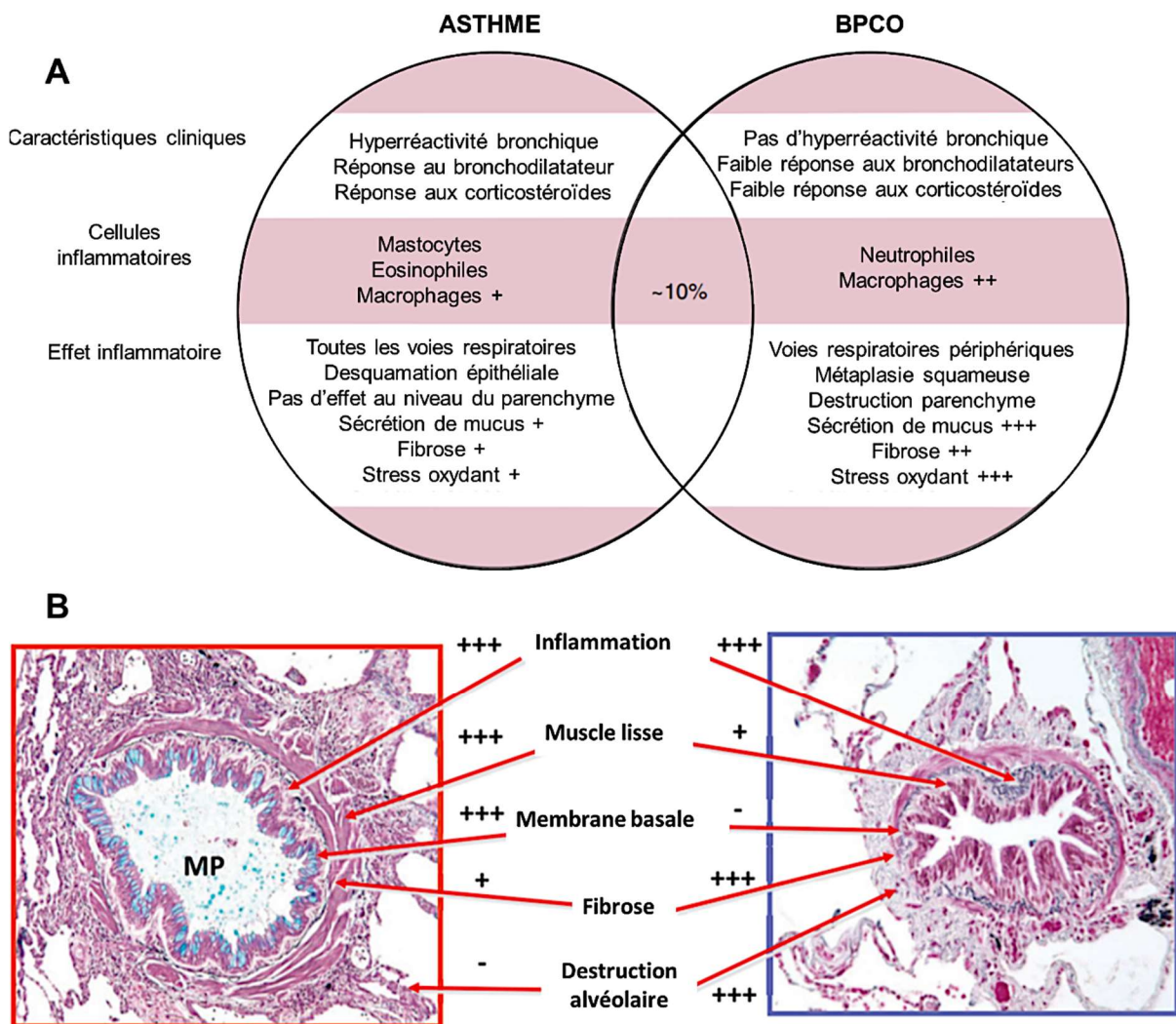


Figure 33 : (A) Synthèse des mécanismes physiopathologiques dans l'asthme et la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) (B) Caractéristiques histologiques de l'asthme et la BPCO. Modifié d'après Lumb et al. 2017 et Barnes et al. 2015.

Par ailleurs, les inflammations pulmonaires aiguës et chroniques sont observées dans différentes maladies respiratoires telles que le syndrome de détresse respiratoire aiguë, l'asthme, la BPCO, la mucoviscidose, la fibrose voire le cancer (Aghasafari et al. 2019a) (Moldoveanu et al. 2009)

iii. FS et inflammation

Les études réalisées afin d'évaluer le pouvoir inflammatoire de l'exposition aux FS sont présentées dans le Tableau 14.

L'inflammation est impliquée dans la plupart des effets néfastes induits par l'exposition aux FS. Les études présentées dans le Tableau 14 supportent le développement d'une inflammation pulmonaire, objectivée par une augmentation significative du nombre de macrophages et de PNN dans le LBA, chez des salariés exposés à des FS d'acier inoxydable ou d'acier doux, 3 et 10 jours après exposition (Antonini et al. 2013) (Shoeb et al., 2017b) (Taylor, 2003c).

Une étude *in vitro*, réalisée sur des cellules alvéolaires A549, a montré que l'exposition à une fraction soluble de FS (MMA - acier inoxydable) induisait une augmentation de la sécrétion de cytokine pro-inflammatoire IL-8 (McNeilly et al., 2004b). Il a été également démontré que la présence de métaux tels que le Cr dans les FS provoquait une diminution des défenses immunitaires chez les rats en altérant la signalisation des macrophages alvéolaires et leur capacité à répondre à l'infection bactérienne (Antonini et al., 2007b).

Plusieurs études *in vivo* utilisant l'instillation intratrachéale ont été menées afin d'étudier l'évolution de l'inflammation due à l'exposition aux FS (Tableau 14). La plupart des études avait pour principal objectif de mettre en évidence les différences de toxicité des FS en fonction des procédés utilisés. Dans deux études, la mesure des niveaux de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α et l'IL-1 β ont été réalisées sur les LBA de rats exposés à des FS d'aciers inoxydables issues de différents procédés. Les résultats des deux études se rejoignent et montrent une augmentation des niveaux de ces deux cytokines jusqu'à la fin de l'exposition avant un retour progressif à la normale après l'arrêt de l'exposition. (Antonini et al., 1996) (Antonini et al. 1997) Une autre étude basée également sur l'évaluation des effets pro-inflammatoires pulmonaires de deux procédés de soudage, acier inoxydable et acier doux, sur une population de rats exposés selon un protocole subaigu et un protocole chronique a

permis de montrer une augmentation des niveaux de TNF- α et d'IL-6 dans le LBA uniquement le premier jour d'exposition. (Taylor et al. 2003c) De plus, Antonini et al. (2014) ont évalué l'atteinte pulmonaire en déterminant les niveaux d'albumine, de LDH et de PNN dans le sang après des expositions de 3 à 63 jours aux FS par instillation intratrachéale. Ils ont rapporté une augmentation des niveaux d'albumine, de LDH et de PNN dans les LBA à 3 et 10 jours puis une diminution à 28 jours pour un retour au niveau de base au 63^e jour. (Antonini et al., 2014)

Plusieurs études chez l'homme ont décrit, en plus de l'inflammation locale, un lien entre l'exposition aux FS et une inflammation systémique. Les travaux de Dierschke et al. (2017) ont montré que l'exposition aux FS induisait une augmentation dans le sang du nombre de neutrophiles et de la concentration en IL-8. (Dierschke et al., 2017a) Ces modifications étaient de courtes durées et s'atténuait dès le lendemain de l'exposition. En fin d'exposition, une augmentation de l'IL-6, cytokine impliquée dans le processus de résolution de l'inflammation, a été constatée dans le lavage nasal des salariés. De plus, Kauppi et al. (2015) ont observé une augmentation des taux de leucocytes et de neutrophiles chez l'homme suggérant qu'une légère réaction inflammatoire systémique se produisait au cours de l'exposition aux FS (Kauppi et al., 2015a). Dans une autre étude, une réponse inflammatoire aiguë systémique a été observée dans une cohorte de soudeurs sains exposée à des niveaux élevés de particules fines (Delcuve et al. 2009a). Cette étude fait état d'une augmentation significative de la Protéine C réactive 16 h après l'exposition aux FS ainsi qu'une augmentation immédiate des neutrophiles sanguins (Kim et al. 2005).

Tableau 14: Principales études sur la mise en évidence d'une réponse inflammatoire en réponse à l'exposition aux Fumées de Soudage (FS).

Type d'étude	Procédé soudage	Fraction /durée d'exposition	Population étudiée	Exposition	Conclusion	Référence
<i>In vitro</i>	GMAW-SS	Dépôt des particules dans le poumon Nombre de neutrophiles et de macrophages alvéolaires Cytotoxicité : LDH et albumine Inflammation : cytokines, niveau de TNF- α , IL-2, IL-6, IL-10, IL-12, et chemokines, MCP-1, MIP-2 dans la première fraction du BALF à différents points d'exposition. Production d'ERO/ERN par les macrophages activés (chimioluminescence) Inoculation bactérienne intratrachéale	Rats SPRAGUE DAWLEY	15 ou 40 mg/m ³ . 3 h/jour pendant 1, 3 ou 10 jours	Afflux de PMN après seulement 6 jours Particules SS : \searrow signalisation chimiotactique + fonction + MA pendant l'exposition. Expo FS/SS retarde la surproduction des chimiokines PMN, MIP-2 Suppression de la fonction des MA \nearrow significative des cytokines + chimiokines dans FS/SS après infection /p T0 = \nearrow de la signalisation inflammatoire Production d'IL-2 par les cellules T a \searrow pour FS/SS après l'infection /p T0. FS/SS peut modifier directement l'activité des cellules T, entraînant un \searrow de la clairance des bactéries.	(Antonini et al., 2007a)

Tableau 13 (suite) : Principales études sur la mise en évidence d'une réponse inflammatoire en réponse à l'exposition aux Fumées de Soudage (FS).

Type d'étude	Procédé soudage	Fraction /durée d'exposition	Population étudiée	Exposition	Conclusion	Référence
Homme	GMAW-MS	<p>Auto-questionnaire : Examens médicaux : auscultation des poumons, spirométrie et rhinométrie acoustique avant et immédiatement (30-60 min) après l'exposition.</p> <p>DEP enregistré avant, pendant et après et immédiatement après l'exposition.</p> <p>Stress oxydant : lavage nasal (NL), urine et des échantillons de sang avant, immédiatement et après expo EBC prélevé avant expos, en début de pause, juste après expo Cytokines ICAM, IL-6, IL-8 & TNF-α dans le lavage nasal IL-6 & IL-8 dans le sérum 8-oH-dG dans les urines Leucotriène B4 dans l'EBC Protéines des cellules club dans le sérum</p>	<p>Soudeurs de 6 entreprises différentes avec symptômes respiratoires des voies aériennes basses et soudeurs sans symptômes</p>	<p>Chambre d'exposition : exposition des soudeurs aux FS-GMAW-MS 1mg/m³ avec un délai moyen entre les deux expositions de deux semaines (min-max : 1-8 semaines). Temps d'expo= 5,5 h+ pause déjeuner de 1 h après 2,5 h d'exposition. L'exposition a eu lieu le lundi, en s'assurant que les soudeurs n'avaient pas été exposés aux fumées de soudure pendant au moins 48 h avant l'exposition</p>	<p>Pas d'effets des FS sur les symptômes et la fonction pulmonaire. Diminution significative du CBE LT-B4 après expos. Augmentation de l'IL-6 NL immédiatement après expo deux groupes non symptomatiques. Tendance d'augmentation des neutrophiles sanguins soudeurs symptomatiques. Le lendemain matin diminution des neutrophiles + l'IL-8 sérique pour les trois groupes après l'expo. Soudeurs symptomatiques =taux d'EBC LT-B4 dix fois supérieur aux deux groupes sans symptômes.</p>	(Dierschke et al., 2017b)

Tableau 13 (suite) : Principales études sur la mise en évidence d'une réponse inflammatoire en réponse à l'exposition aux Fumées de Soudage (FS).

Type d'étude	Procédé soudage	Fraction /durée d'exposition	Population étudiée	Exposition	Conclusion	Référence
Homme	MMAW-MS MMAW-SS	Sang : avant chacun des tests de provocation, après chacun des tests de provocation + le jour suivant les tests DEP, VEMS et NO exhalé avant expo FS/MS, et 22 h après expo FS/MS & SS. Auto-questionnaire IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α , endothelin-1 et E-Selectine dans le plasma	Patients (soudeur-tôlier-assembleur-ouvrier métallurgistes) + asthme professionnel	Chambre d'exposition	Légère réaction inflammatoire systémique à la suite des tests de provocation par les fumées de soudure. Augmentation observée dans les leucocytes du sang périphérique, les neutrophiles et les plaquettes, et une diminution du niveau d'hémoglobine et du nombre d'érythrocytes. .	(Kauppi et al., 2015b)

En se référant à l'ensemble des données de la littérature scientifique, Shoeb et al. (2017) ont proposé un diagramme schématisant les mécanismes cellulaires et moléculaires par lesquels les FS de l'acier inoxydable induisent une toxicité via des altérations des statuts redox et inflammatoires. (Shoeb et al. 2017a) (Figure 34)

Toutefois, il est important de noter que ces mécanismes ont été proposés pour une exposition aux FS de l'acier inoxydable, dans leur ensemble, et n'intègrent pas spécifiquement le rôle de la fraction ultrafine des FS.

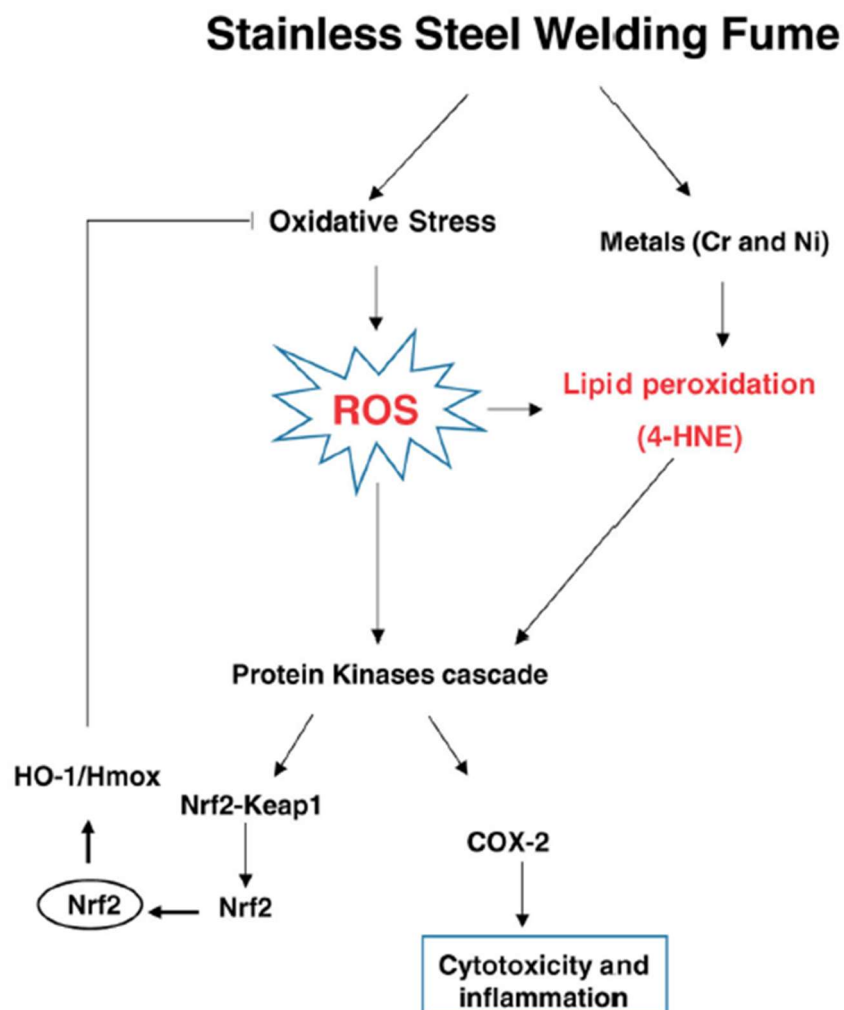


Figure 34 : Diagramme schématisant le mécanisme proposé par lequel les fumées de soudage (FS) de l'acier inoxydable induisent la cytotoxicité par la génération d'un stress oxydant et l'activation des médiateurs inflammatoires adapté selon Shoeb et al. (2017)

c. Epigénétique

i. Généralités sur les mécanismes épigénétiques

Les cellules reçoivent en permanence des signaux les informant sur leur environnement, de manière à pouvoir s'adapter aux différentes situations de stress auxquelles elles sont confrontées. Ces stimuli, y compris ceux liés aux comportements des individus, peuvent conduire à des modulations de l'expression des gènes, sans toutefois en affecter leurs séquences nucléotidiques. Ces modifications que l'on définit comme « épigénétiques » sont souvent transitoires mais peuvent parfois persister lorsque le signal initiateur disparaît. Elles sont transmissibles d'une cellule à l'autre mais, contrairement aux mutations génétiques, elles sont le plus souvent réversibles (Delcuve et al. 2009a).

La Figure 35 décrit les principaux mécanismes épigénétiques actuellement identifiés. Ces derniers comprennent non seulement la méthylation de l'ADN, qui est principalement impliquée dans l'inactivation de gènes et joue un rôle clé dans le maintien de la différenciation cellulaire, mais aussi les modifications post-traductionnelles d'histones (e.g., méthylation, acétylation, phosphorylation), qui conditionnent le compactage de l'ADN au sein de la chromatine et peuvent modifier l'accessibilité des enzymes et différents facteurs indispensables à la transcription des gènes. En outre, un autre mécanisme épigénétique existe, en particulier un système mettant en jeu des petites molécules d'ARN non codants ou microARN (miARN) qui, en interagissant avec des ARNm cibles, conduisent généralement à l'inhibition de leur traduction en protéines. (Gartstein et Skinner 2018)

De nombreuses études ont révélé que les modifications épigénétiques, pouvaient être associées aux processus de vieillissement et de cancérogénèse ainsi qu'à l'apparition de nombreuses maladies telles que le diabète, la maladie d'Alzheimer ou encore des pathologies respiratoires telle que l'asthme et la BPCO. (Lovinsky-Desir and Miller, 2012)

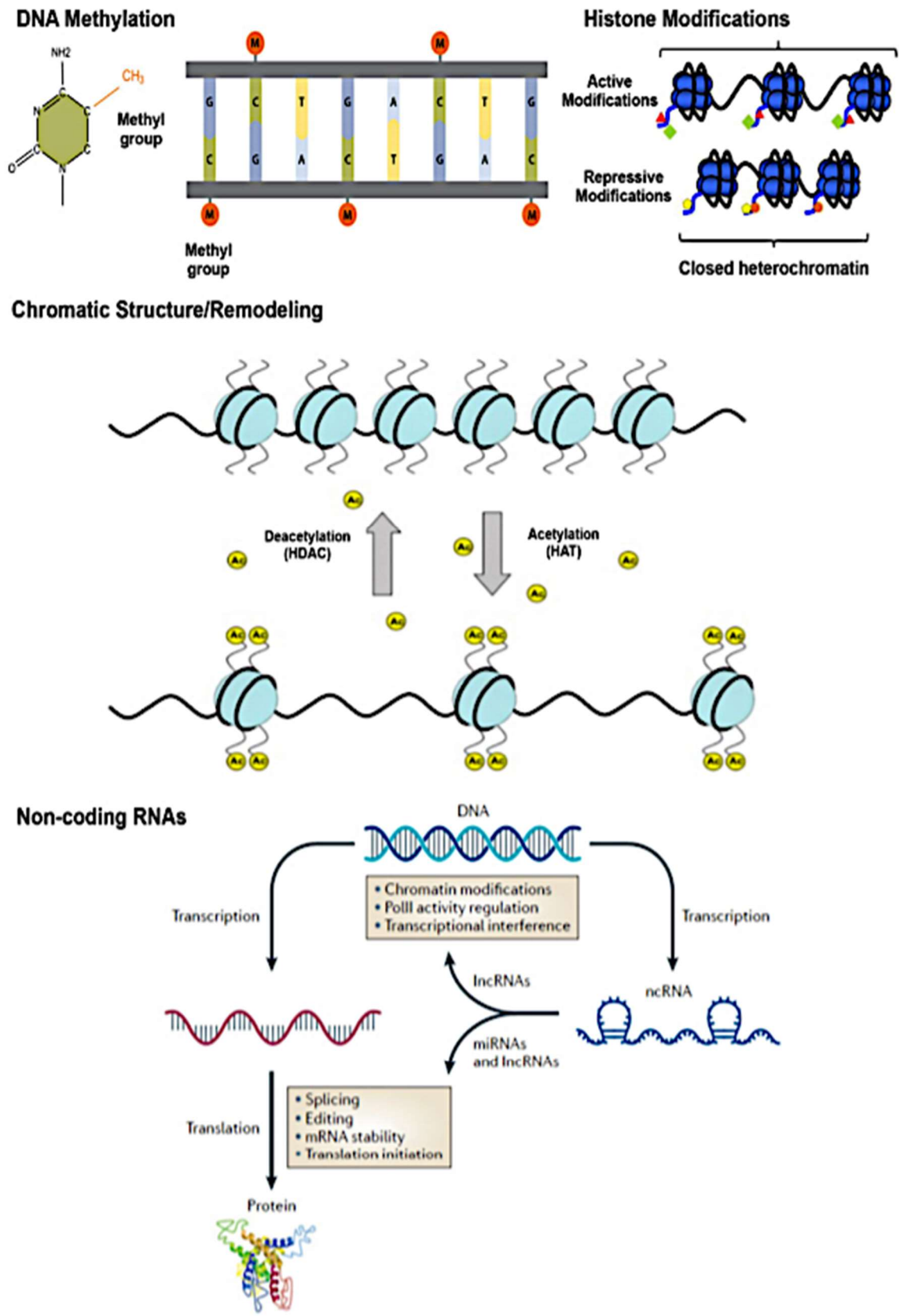


Figure 35 : Mécanismes épigénétiques. Modifié selon Gartstein et al.(2018)

ii. Modification des Histones

La lecture de l'information génétique est conditionnée par l'accessibilité de l'ADN aux enzymes telles que l'ARN polymérase II et aux facteurs indispensables à la transcription des gènes. Les modifications post-traductionnelles des histones vont modifier cette accessibilité en modulant la compaction chromatinienne autour des gènes.

Dans le génome humain, l'ADN linéaire est très compact et organisé en chromosomes. L'ADN est enroulé autour d'histones pour former des nucléosomes, qui sont les unités structurales de base de la chromatine. Les nucléosomes se composent de 146 paires de bases d'ADN enroulées autour d'un octamère d'histones composé de deux exemplaires de chacune des histones H2A, H2B, H3 et H4. Une histone de liaison, l'histone H1, repose sur la structure nucléosomale, en maintenant en place l'ADN enroulé autour du nucléosome (Figure 36). Au-delà de sa liaison au nucléosome, la protéine H1 se lie à l'ADN de liaison entre les nucléosomes, aidant ainsi à stabiliser la fibre chromatinienne (Delcuve et al. 2009b).

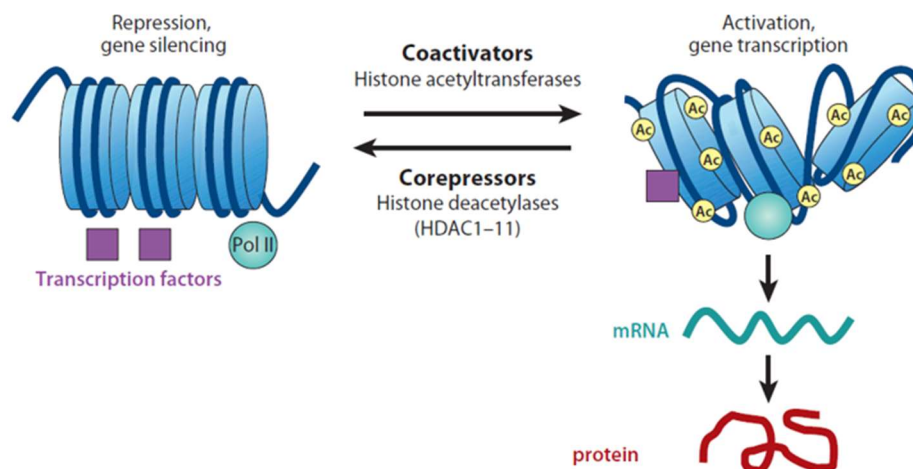


Figure 36 : Remodelage de la chromatine et expression des gènes, modifié selon Barnes (2009)

Les principales modifications post-traductionnelles connues des histones sont l'acétylation, la méthylation, la phosphorylation et l'ubiquitinylation. Des niveaux modifiés d'acétylation et de méthylation des histones sont associés à des changements de taux de transcription. Les diverses modifications des histones ont des effets fonctionnels distincts et sont reconnues par des modules de protéines de régulation transcriptionnelle (Wolffe and Matzke, 1999) (Figure 37).

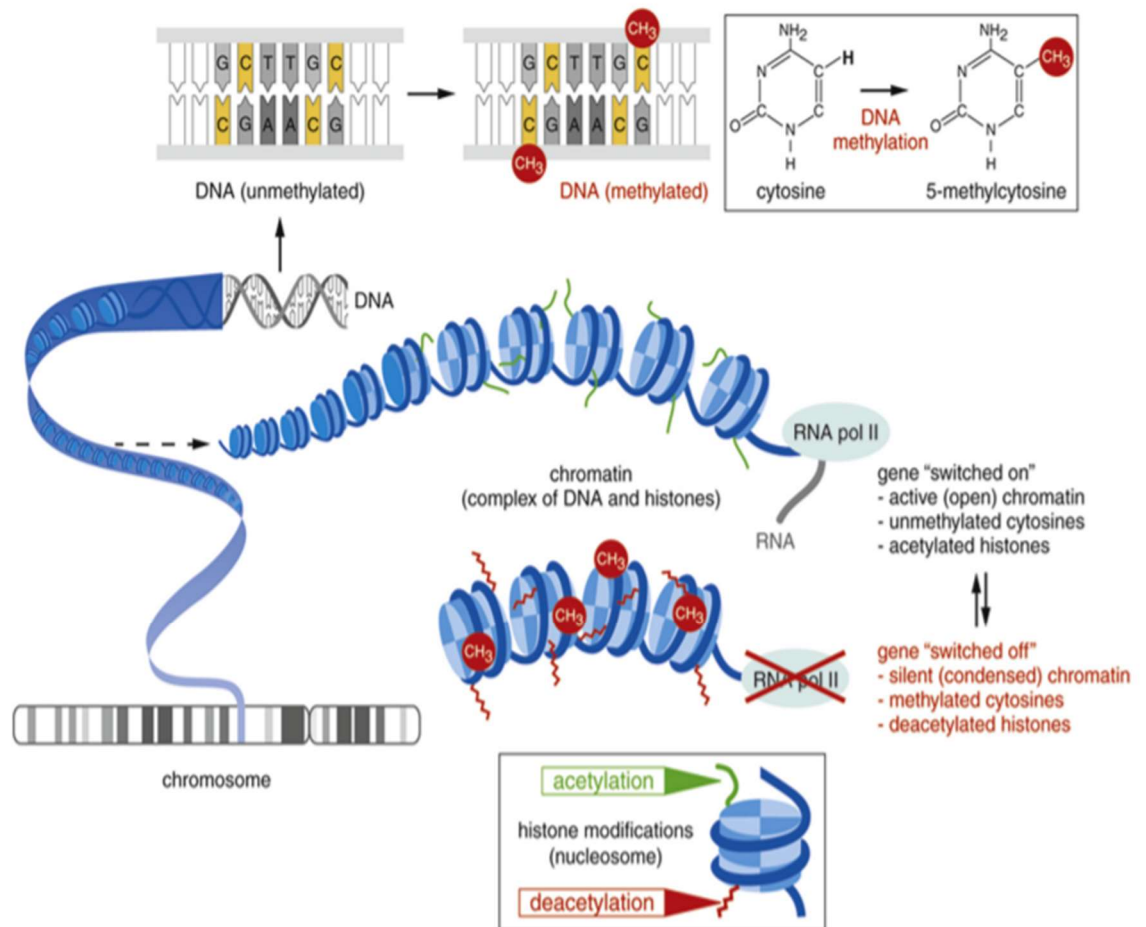


Figure 37 : Modifications de la chromatine médiées par la méthylation de l'ADN et l'acétylation des histones, modifié selon Krishnendu et al. (2015)

Parmi les modifications, l'acétylation est celle qui a été analysée le plus précisément à l'heure actuelle. L'acétylation des histones est catalysée par les histones acétyltransférases (HAT) et s'est avérée importante dans la régulation de la transcription, de la réplication, de la réparation des dommages à l'ADN et de la condensation chromosomique. La forme transcriptionnellement active de la chromatine, appelée euchromatine, présente des niveaux plus élevés d'acétylation des histones que la forme transcriptionnellement silencieuse appelée hétérochromatine. On pense que l'acétylation des histones entraîne la décondensation de l'hétérochromatine dans la structure plus détendue de l'euchromatine. Cette décondensation augmente l'accessibilité des protéines régulatrices, telles que les facteurs de transcription et les éléments de réparation de l'ADN, à l'ADN sous-jacent. Ainsi, l'acétylation des histones joue un rôle important dans les processus actifs associés au remodelage de la chromatine (Verdone, 2006).

Les résidus lysine (K) et arginine (R) des queues N-terminales des histones, chargés positivement, s'associent par des liaisons électrostatiques à l'ADN, chargé négativement. Lorsque ces résidus deviennent acétylés (-COCH₃), grâce à l'action des histones acétyltransférases (HAT), les interactions électrostatiques sont diminuées et la chromatine est décondensée. À l'inverse, les histones désacétylases (HDAC) ôtent ces motifs acétylés et favorisent la compaction. Les HAT et HDAC appartiennent à des complexes protéiques contenant également des histones méthyltransférases (HMT) et déméthylases (HDMT) qui modulent l'activité des HDAC/HAT et permettent, en cas de transfert de motifs méthyles (-CH₃) sur d'autres résidus proches, d'obtenir un niveau de compaction supérieur, par exemple via la triméthylation sur les sites H3K27 ou H3K9, ou un niveau de compaction inférieur via la triméthylation du site H3K4 (de Planell-Saguer et al. 2014).

iii. Méthylation de l'ADN

La méthylation de l'ADN est une modification chimique covalente, ayant pour résultat l'addition d'un groupement méthyle (CH₃) sur le cinquième carbone du noyau pyrimidique d'une cytosine. La méthylation de l'ADN se produit essentiellement sur les cytosines associées aux dinucléotides CpG et aboutit à la formation de 5-méthylcytosines. Chez les mammifères, la méthylation de l'ADN réprime la transcription en inhibant directement la liaison de certains facteurs transcriptionnels ou indirectement via le recrutement de protéines qui se lient aux dinucléotides CpG méthylés (methyl binding protein ou MBD). (Baccarelli and Bollati, 2009)

Il existe deux types de réactions de méthylation de l'ADN, les réactions de méthylation de novo et de maintenance. Les réactions de méthylation de novo de l'ADN correspondent à l'ajout de groupements méthyles sur les cytosines des îlots CpG localisés sur les 2 brins d'ADN et sont principalement à l'origine de l'hyperméthylation des gènes. Les réactions de méthylation de maintenance de l'ADN représentent l'ajout d'un groupement méthyle sur la cytosine d'un dinucléotide CpG localisé sur le brin néosynthétisé de l'ADN, à la suite de la réplication de l'ADN. (Chen et al., 2017)

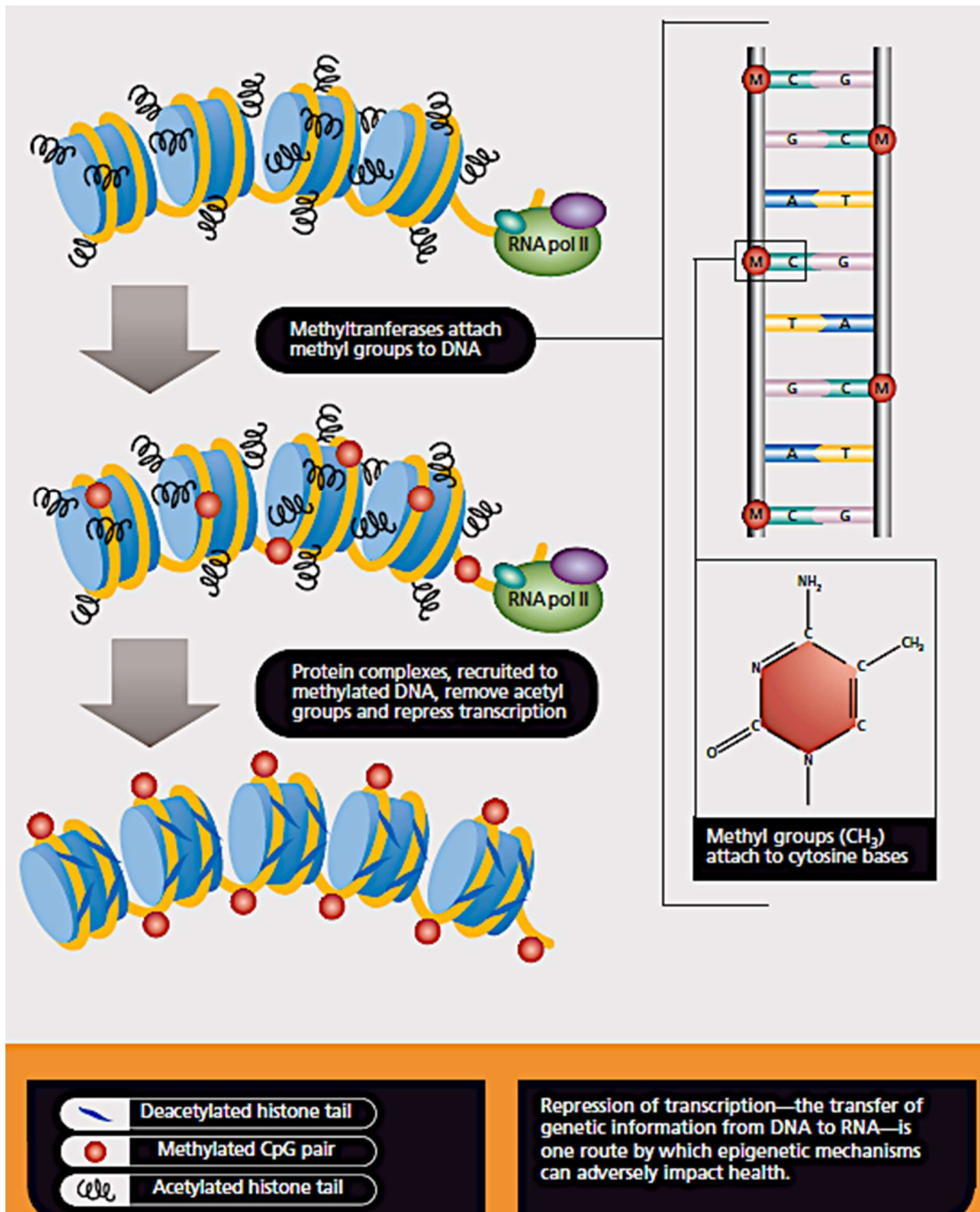


Figure 38 : Mécanisme de méthylation de l'ADN modifié selon Weinhold et al. (2006)

Les enzymes responsables de la méthylation de l'ADN sont des ADN méthyltransférases (ou DNMT). Ces enzymes catalysent le transfert d'un groupement méthyle sur la cytosine à partir du donneur S-adosyl méthionine (SAM). Les protéines de la famille des DNMT comportent 5 membres : DNMT1, DNMT2 (TRDMT1), DNMT3A, DNMT3B

et DNMT3L. La protéine DNMT1 est considérée comme étant l'enzyme majoritairement impliquée dans les réactions de maintenance de méthylation de l'ADN mais peut aussi catalyser des réactions de méthylation de novo. Les DNMT 3a et 3b interviennent dans la réaction de méthylation de novo. La DNMT 3a est impliquée dans la méthylation des séquences régulatrices de l'expression des gènes alors que la 3b participe à la méthylation des séquences « satellites » des Centromères. (Szyf et al. 2007)

Le génome humain est composé à 55 % de séquences de répétitions représentés par deux éléments nucléotidiques courts (ALU) et longs (LINE-1) qui sont fortement méthylés pour en supprimer l'expression. En condition de stress cellulaire, ces éléments sont déméthylés ce qui augmente leur activité en tant que séquences rétro-transposables. (Kile et al., 2013) L'hypométhylation globale de l'ADN était associée à une plus grande instabilité génomique et à une dérégulation de l'expression des gènes ? (Gravina and Vijg, 2010)

La méthylation de l'ADN est un phénomène essentiel à la régulation de nombreux processus cellulaires tels que le développement embryonnaire, la transcription, la structure de la chromatine, l'inactivation du chromosome X, l'empreinte génomique et la stabilité des chromosomes. Des altérations dans l'établissement et/ou le maintien de la méthylation de l'ADN sont associées à des processus pathogènes.

La méthylation de l'ADN est un mécanisme épigénétique de plus en plus incriminé dans les maladies chroniques. Par exemple, certaines publications indiquent que des différences de méthylations de certains gènes tels que ceux de l'IFN γ , de l'IL6 et de l'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS) peuvent être associés à la régulation du débit des voies aériennes supérieures (Lepeule et al., 2012). En particulier, la méthylation du gène de l'iNOS contribue à la régulation de la production de NO et jouerait un rôle important dans l'asthme, l'obstruction chronique des voies aériennes et dans certains processus pathologiques affectant le système cardiovasculaire.

L'exposition aux particules fines de FS peut avoir un impact sur la méthylation de l'ADN. Une association positive entre l'exposition à ces particules et une légère augmentation de la méthylation de l'ADN au niveau du gène iNOS a déjà été décrite (Kile et al., 2013). Une association positive entre cette augmentation et l'ancienneté au poste de chaudronnier a également été observée.

iv. **Dérégulation des micro-ARN**

Les microARN sont des ARN non codants de 21 à 25 nucléotides qui contrôlent l'expression des gènes au niveau post-transcriptionnels en inhibant leur traduction en protéines et/ou en induisant la dégradation de leurs ARNm correspondants (Rothschild, 2013). Les miARNs sont transcrits dans le noyau par une ARN polymérase de type II sous la forme de longs précurseurs tige-boucle appelés miARNs primaires (pri-miARN). Ceux-ci sont ensuite clivés par un complexe protéique formé, notamment, de la ribonucléase III Drosha et deux partenaires DGCR8 pour former des produits intermédiaires appelés miARN précurseurs ou pre-miARN qui seront ultérieurement transportés de manière active, depuis le noyau vers le cytosol, par l'exportine 5. Les pré-miARN se lient dans le cytoplasme au triple complexe protéique composé par Dicer, ou ribonucléase III, TRBP ou protéine de liaison à l'ARN, et Ago2 ou protéine de la famille Argonaute ayant une activité endonucléasique, pour être clivés en miARN simples brins (Kim et Nam 2006). Dicer et TRBP sont alors libérés, tandis que Ago2 forme avec les miARN matures les complexes RISC qui ont la capacité de se lier aux ARNm cibles. Dans la majorité des cas, les miARN empêchent la traduction des ARNm cibles en se liant à leur région 3'-UTR. Cependant, ils peuvent également interagir avec d'autres régions de l'ARNm, notamment au niveau des régions 5'-UTRs et des exons (Hou et al., 2011). De manière générale la complémentarité entre les miARN et les ARNm cibles régit le mode opératoire de l'inhibition d'expression des ARNm cibles. Dans le cas d'une complémentarité incomplète, la traduction des ARNm cibles est réprimée, tandis que la complémentarité complète des ARNm entraîne leur hydrolyse par Ago2.

Un seul miRNA peut se lier à de nombreuses cibles ARNm différentes et les réguler et, inversement, plusieurs miRNA différents peuvent se lier à un seul ARNm cible et le contrôler en coopération (Sato et al., 2011). Depuis leur découverte, les miARN sont connus pour réguler l'expression d'un très grand nombre de protéines, et on suppose qu'ils pourraient réguler plus de 30 % du génome humain. Ainsi, des centaines d'ARN et des milliers de cibles semblent composer des réseaux de régulation remarquablement complexes, assurant ainsi la médiation de nombreuses facettes de la fonction des cellules eucaryotes. (Hou et al. 2011)

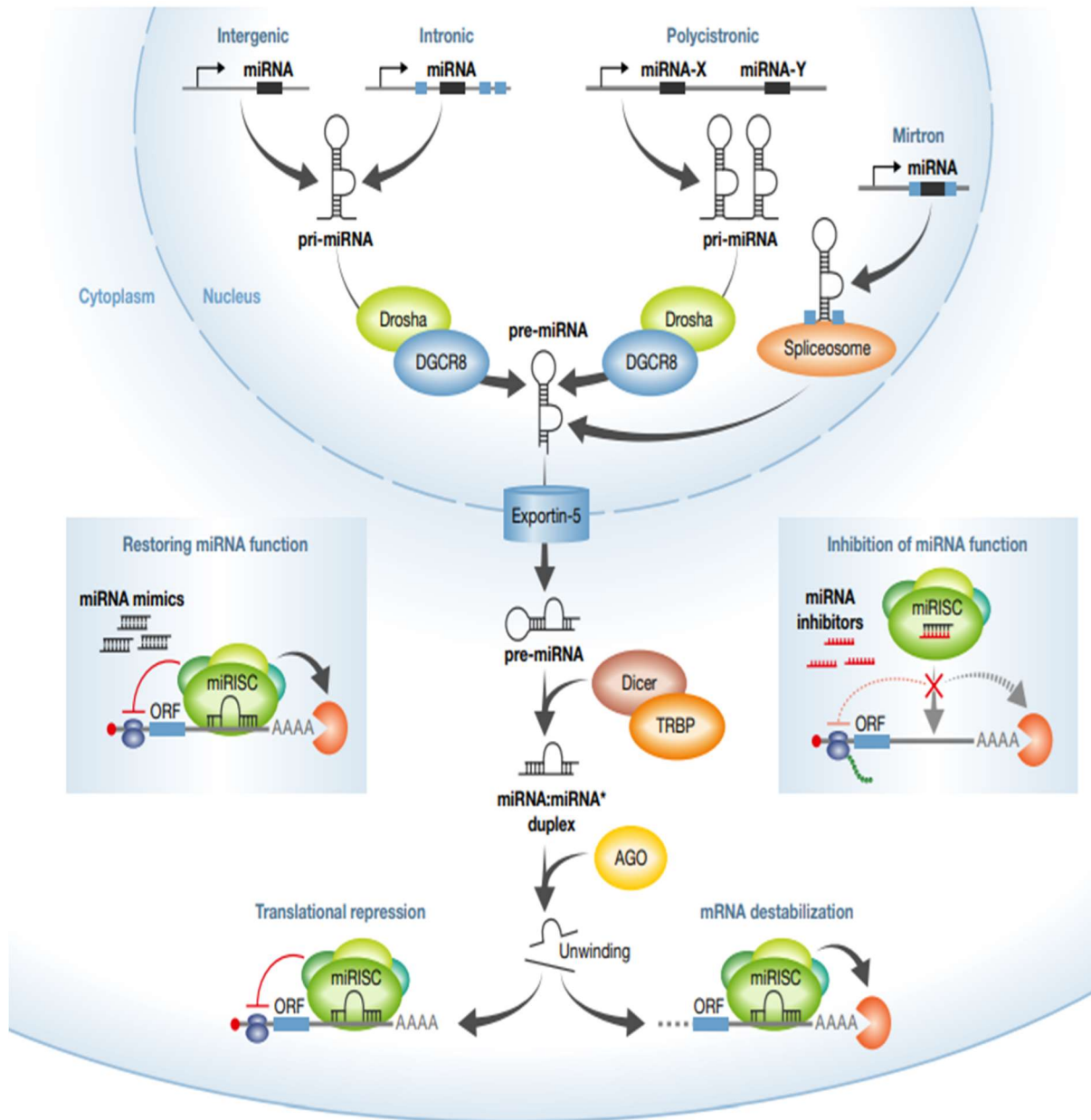


Figure 39 : Biogénèse des miARN et modulation de l'activité des miARN modifié selon Van Rooij et al. (2014)

Différentes études montrent l'importance des miARN dans la régulation de processus tels que la croissance, la différenciation, l'apoptose et la cancérogenèse des cellules. En outre, on peut s'attendre à ce que les miARN jouent un rôle important dans le diagnostic et le pronostic d'un grand nombre de maladies humaines, puisque la composition qualitative des miARN de chaque tissu est différente selon l'état de santé de l'homme.

Les microARN sont impliqués dans la régulation de nombreuses fonctions biologiques et sont de plus en plus utilisés en tant que biomarqueurs de certaines pathologies.

Les mécanismes de modification de l'expression des miRNA induites par l'exposition à l'environnement ne sont pas encore totalement définies. Les produits chimiques présents dans l'atmosphère respirable peuvent provoquer des altérations des miARN en augmentant le stress oxydatif et/ou en déclenchant des réponses inflammatoires.

v. **FS et épigénétique**

Actuellement, très peu d'études ont été réalisées afin d'évaluer l'implication des mécanismes épigénétiques dans la toxicité des FS en général, et de leur fraction particulaire, en particulier. Néanmoins, certains mécanismes épigénétiques ont déjà été investigués suite à l'exposition à la fraction particulaire fine de la pollution atmosphérique. L'exposition aux PM_{2,5} ambiantes et à leurs composants métalliques a été montrée comme modifiant l'expression de deux miRNA liés à l'inflammation, à savoir le miR-21 et le miR-222. (Hou et al. 2011). Dans une étude sur des ouvriers de fonderie dans une aciérie à four électrique, une augmentation de l'expression des miR-222 et des miR-21 a également été constatée. (Bollati et al., 2010). Une autre étude a apporté des preuves supplémentaires de l'impact de l'exposition aiguë aux particules sur les mécanismes de régulation des gènes et ont identifié de nouveaux miARN, dérégulés suite à l'exposition à des particules, qui pourraient contrôler l'expression des gènes inflammatoires (Jardim et al ; 2011). Une analyse transcriptomique sur des salariés d'une fonderie exerçant dans une atmosphère riche en PM métalliques, a permis d'identifier les miR-421, miR-146a, miR29a et let7-g comme associés à l'expression de gènes inflammatoires sensibles à cette exposition. (Motta et al., 2013)

Même si très peu de données sont actuellement disponibles dans la littérature sur les altérations épigénétiques possiblement impliquées dans la toxicité des FS en général, et de leur fraction particulaire, en particulier, les résultats des études montrant le rôle très important de ces mécanismes dans la toxicité de la fraction particulaire fine de la pollution atmosphérique renforce l'intérêt d'investiguer ces mêmes mécanismes dans le cas spécifique d'une exposition professionnelle à la fraction ultrafine des FS.

CHAPITRE II : PROBLEMATIQUE

Le soudage est une technique largement utilisée en milieu professionnel. L'exposition aux FS concerne des centaines de milliers de salariés en France. La toxicité respiratoire de ces fumées a été démontrée au cours des dernières décennies. En 2017, elles ont été classées comme cancérigène (groupe 1) par le CIRC sur la base de preuves suffisantes chez l'homme pour l'induction de cancer du poumon. A ce jour, bien que de nombreuses études épidémiologiques confirment le potentiel très toxique des FS, leurs mécanismes d'action cellulaires et moléculaires ne sont encore que partiellement élucidés. La principale difficulté siége dans la complexité de la composition des FS qui renferment un mélange de gaz et de particules, de natures et de tailles différentes. Les propriétés physiques et chimiques des FS sont assez complexes car la plupart des matériaux de soudage sont des mélanges d'alliages de métaux, très variables en fonction des différents aciers, pouvant contenir du Fe, du Mn, du Cr, et du Ni. La présence et la combinaison de différents éléments métalliques, dont certains déjà très bien décrits pour leur toxicité pulmonaire voire leur cancérogénicité pulmonaire, est un facteur déterminant dans la réponse pathologique du tractus respiratoire suite à l'exposition aux FS. La distribution granulométrique des particules des FS est un facteur très important pour évaluer leur danger car elle conditionne leurs modalités de pénétration, de déposition, d'absorption, et de rétention des particules dans les poumons. Les particules de FS, dont la plus grande partie en nombre appartiennent à la fraction ultrafine, ont la faculté d'atteindre les régions les plus profondes des poumons et d'y exercer leur toxicité eu égard à leurs très grandes réactivités chimique et biologique.

L'état de l'art sur les effets délétères de l'exposition des FS, préalablement décrit, a très fortement souligné le manque d'information sur le rôle joué par leur fraction particulaire ultrafine dans la toxicité pulmonaire voire la cancérogénicité pulmonaire et la nécessité d'investiguer urgemment les mécanismes cellulaires et moléculaires, tels que le stress oxydant, l'inflammation, et surtout les altérations épigénétiques et leurs répercussions sur la régulation de certaines voies de signalisation cellulaire. Une meilleure connaissance de ces mécanismes physiopathologiques sous-jacents permettrait de mieux caractériser le danger que représente spécifiquement la fraction particulaire ultrafine des FS afin de pouvoir

intégrer cette fraction à la réglementation actuellement en vigueur, de manière à instaurer une métrologie des atmosphères de travail de même qu'une biométrie plus adaptées.

Dans notre travail de thèse, une attention toute particulière a donc été apportée aux caractéristiques physiques et chimiques de la fraction particulaire ultrafine des FS et à la toxicité spécifique de cette fraction par une évaluation des mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués. Après avoir généré des FS à partir d'un banc de soudage expérimental utilisant le procédé de soudage MIG puis avoir collecté la fraction particulaire ultrafine, une caractérisation physique et chimique de cette dernière a été réalisée. Un modèle de cellules épithéliales bronchiques humaines a ensuite été utilisé afin de rechercher les mécanismes cellulaires et moléculaires spécifiquement impliqués dans la pathogénèse pulmonaire voire la cancérogénèse pulmonaire de ces particules ultrafines, avec un intérêt très particulier pour le stress oxydant, la réponse inflammatoire, les altérations épigénétiques et surtout leurs répercussions en termes de dérégulation des voies de signalisation cellulaire.

CHAPITRE III : MATERIELS ET METHODES

A. Génération des FS

La stratégie de recherche développée dans ce travail requérant une masse suffisante de PUF de FS afin de réaliser non seulement les analyses physico-chimiques mais aussi celles toxicologiques sur les mêmes particules, l'hypothèse d'une dose d'exposition moyenne de notre modèle cellulaire à une concentration létale à 10 % (CL10) égale à $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ a été utilisée pour calculer la masse de particules nécessaire, à savoir *a minima* 1,2 mg.

Le recueil de ces 1,2 mg de particules de FS et leur séparation en fonction de leur diamètre aérodynamique équivalent pouvaient être réalisées selon deux approches :

- ▶ Prélèvements atmosphériques réalisés directement sur le terrain
- ▶ Recueil contrôlé des particules à partir d'un banc de soudage

Le prélèvement atmosphérique de FS réalisé en condition réelles dans le cadre d'une activité professionnelle a fait apparaître les freins suivants :

- ▶ Le soudage est associé à des opérations de meulage et de ponçage. Les particules recueillies ne contiendraient donc pas uniquement des particules issues du soudage d'éléments métalliques. Les activités annexes de l'atelier pourraient également contaminer l'échantillon avec d'autres polluants tels que des solvants, des HAP, etc. et ainsi interférer sur la toxicité. Ces activités et polluants annexes ne sont pas l'objet du présent travail.
- ▶ La séparation des particules nécessite l'utilisation d'un impacteur (décrit au paragraphe suivant) qui n'est pas un système portatif. Il aurait pu être placé à proximité du salarié mais pas au niveau de sa zone de respiration. Les prélèvements auraient été représentatifs de l'environnement proche du salarié et pas de son exposition propre.

C'est pourquoi le recours à une méthode contrôlée à partir d'un banc de soudure pour le captage des particules a été préféré. Ce type d'installation permet de maîtriser les paramètres de soudage tels que la vitesse de déroulement du fil et de déplacement de la plaque ainsi que la distance entre la buse et la plaque qui sont éléments susceptibles d'être à

l'origine de variations de l'intensité des émissions. L'ensemble des caractéristiques des recueils est ainsi maintenu d'un passage à un autre garantissant la répétabilité de l'opération.

B. Collecte des particules

Les particules de FS sont obtenues à l'aide d'un générateur de soudage associé à un système d'aspiration et un impacteur en cascade. La soudure est réalisée selon le procédé « Metal Active Gas » (MAG SAF PRO) sous Shield Gaz M21 (i.e., 82 % Argon et 18 % de CO₂) avec un fil d'apport en acier inoxydable (i.e., 316LSi Ø1 mm : mm avec Fe 50-60 %, Cr 10-25 %, Ni 10- 15 %, Mn 1-3 %) sur une plaque d'acier inox dégraissé (Figure 40).

Le déplacement de la plaque et de la torche est assuré par un système automatisé. L'ensemble est installé dans une enceinte dont la partie basse est équipée d'une grille perforée permettant la compensation de l'air extrait en partie haute. Ce banc permet de générer de façon stable et reproductible, en nombre, masse, distribution granulométrique et composition chimique, les particules des FS.

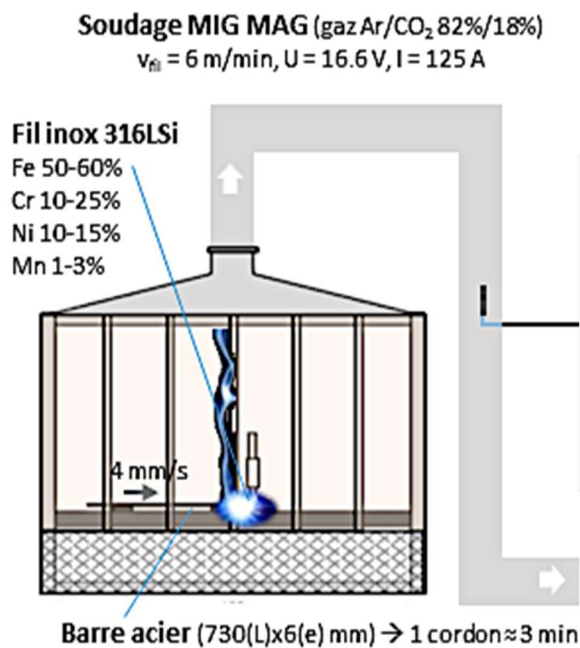


Figure 40: Schéma et photo du banc de soudage utilisé pour la génération et la collecte des particules des Fumées de Soudage (FS)

Les FS sont simultanément aspirées avec un débit de 120 m³/h. La sonde de prélèvement est située dans le flux d'air et reliée à un diviseur de débit permettant de répartir le flux de particules de façon homogène vers des dispositifs permettant :

- ▶ De déterminer la distribution granulométrique de la concentration en nombre en temps réel, avec un impacteur basse pression à mesure électrique ELPI+
- ▶ De collecter les particules en les séparant en fonction de leur granulométrie, sur des filtres en polycarbonate avec deux impacteurs en cascade SIOUTAS munis de 4 supports d'impaction en polycarbonate (PC) 25 mm (Whatman®, porosité 0,8 µm, Servi Lab, Le Mans, France) et d'un filtre terminal en PC 37 mm (Whatman®, porosité 0,8 µm). Cet impacteur permet de collecter les particules en fonction de leur diamètre aérodynamique sur 5 étages : < 0,25 µm, 0,25 – 0,50 µm, 0,50 – 1 µm, 1 – 2,5 µm et > 2,5 µm. Débit de prélèvement 9 L/min.
- ▶ De récolter des particules pour des analyses complémentaires (distribution en masse, potentiel oxydant, CrVI)

Tous les supports de prélèvement ont fait l'objet d'une détermination gravimétrique en conditions contrôlées avant et après échantillonnage pour évaluer la masse de particules collectées. La masse des particules collectées a été préalablement déterminée par analyse gravimétrique. Les échantillons de FS collectés ont été extraits dans de l'eau MilliQ aux ultrasons à 500W, 20 KHz (Vibracell™, Sonics & Materials Inc, Newton, Connecticut, Etats-Unis) en salle blanche. Les particules collectées sont congelées à -25°C. La fraction ultrafine < 250 nm (PUF) a été retenue pour la suite des analyses.

C. Caractérisation physico-chimique des particules

1. Extraction des particules de FS

Les échantillons de FS collectés sur filtres en polycarbonate ont été extraits aux ultrasons (VIBRACELL) en salle blanche dans 3 bains successifs d'eau ultrapure (eau MilliQ). La méthode d'estimation de la masse totale collectée sur filtres individuels repose sur la différence de pesée des filtres de collecte avant et après prélèvement. La suspension de PUF (< 250 nm) issues des FS a été conservée à -20°C en attendant son utilisation pour la caractérisation physico-chimique et l'approche toxicologique.

2. Distribution granulométrique en milieu liquide

Le diamètre hydrodynamique des PUF est mesuré directement en suspension dans l'eau milliQ (1,91 µg/µL) en utilisant la technologie de diffusion de la lumière dynamique (DLS) avec le Zetasizer® nano ZS (Malvern Instrument, Malvern, Royaume-Uni). Cet appareil permet d'observer la distribution des particules ultrafines en fonction de leur taille grâce à la diffraction de la lumière au contact des particules. Il réalise la mesure de façon dynamique pendant un laps de temps fixé à 2 minutes. La suspension de PUF est passée brièvement aux ultrasons (Sonifier SFX150, Branson Ultrasonics, Danbury, Connecticut, Etats-Unis) : 45 W à la fréquence de 40 kHz durant 2 secondes, pour faciliter la séparation des particules et observer les phénomènes d'agrégation en répétant la mesure dans un délai de 5 minutes. La mesure du potentiel zêta est effectué à température ambiante (25°C ± 2) pour évaluer le potentiel de répulsion des particules entre elles.

3. Dosage des métaux

Les analyses sont effectuées en triplicats pour trois sous-échantillons de 100 µg de PUF et pour deux dilutions différentes (1/2 et 1/10). Les échantillons de PUF ont été pesés et minéralisés en milieu acide (HNO₃/H₂O₂/HF) pour les analyses élémentaires. La composition chimique en métaux est évaluée par dosage par spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif (ICP-AES, Perkin Elmer, Courtaboeuf, France). Cette méthode permet un dosage simultané de nombreux métaux. Trente éléments à l'état de trace et 7 éléments majeurs ont été dosés : (Ag, As, Ba, Be, Bi, Cd, Ce, Co, Cr, Cs, Cu, La, Li, Mn, Mo, Ni, Pb, Pd, Pt, Rb, Sb, Se, Sn, Sr, Th, Ti, Tl, U, V, Zn, Al, Ca, Fe, K, Mg, Na, Si). Les analyses ont été effectuées en triplicats pour trois sous-échantillons de 100µg de PUF et pour deux dilutions différentes (1/2 et 1/10).

4. Dosage du chrome hexavalent

Le dosage du chrome hexavalent (CrVI) est réalisé selon les recommandations pour la métrologie des polluants dans le cadre d'évaluation des risques sanitaires en environnement professionnel, conformément aux dispositions relatives en vigueur. Les prélèvements ont été réalisés dans les mêmes conditions que la collecte, sur cassette Millipore® fermée (CFC)

munie d'un filtre en fibre de quartz 37 mm (Whatman[®]) imprégné de sulfate de magnésium et carbonate de sodium, avec un débit de prélèvement de 9 L/min. Les analyses en CrVI suivant la méthode MétroPol M-43, protocole à une extraction –NaOH+Na₂CO₃) du CrVI total ("FicheMetropol-METROPOL_43.pdf," n.d.). L'analyse est réalisée par chromatographie ionique couplée à un détecteur ultraviolet.

D. Caractérisation du potentiel oxydant des particules

1. Dosage acellulaire de l'oxydation du CM-H2DCFDA

Dans ce dosage, les ERO produits par les particules des FS convertissent la sonde 5-(et-6) chlorométhyl-2, 7-dichlorodihydrofluorescéine diacétate (CM-H2DCF-DA) non fluorescente en 2, 7-dichlorofluorescéine (DCF) fluorescent, selon la méthode préalablement décrite par Crobeddu et al. (2020). En bref, la sonde CM-H2DCFDA est d'abord activée par une incubation avec 10 mM de solution de NaOH et ensuite neutralisée avec 10 X phosphate tamponné salin (PBS) sans calcium ni magnésium (Life Technologies, Thermo Fisher scientifique). Les suspensions de particules, à des concentrations, de 10 à 100 µg/mL ont été incubées avec 16,5 M de CM-H2DCF dans une plaque à 96 puits. La fluorescence générée par l'oxydation de la sonde est lue régulièrement pendant 4 h avec des longueurs d'ondes d'excitation et d'émission à 485 nm et 520 nm, respectivement, à 37 °C avec un lecteur de microplaques multimode Spark[®] (TECAN Männedorf, Autriche) ... Les résultats ont été normalisés par rapport au témoin négatif, ne contenant pas de particules.

2. Dosage de la déplétion du glutathion réduit

Le dosage de la déplétion du glutathion réduit (GSH) mesure la variation de concentrations de cet antioxydant en présence des suspensions de particules, à des concentrations, de 10 à 100 µg/mL, selon la méthode préalablement décrite par Crobeddu et al. (2020). Des particules de 10 à 100 µg/mL ont été incubées pendant 4 h à 37 °C dans une solution contenant des concentrations physiologiques (200 M) de GSH dans du NaCl (0,9 %) à pH 7,4 avec une agitation permanente. Après incubation, les concentrations des formes réduites (GSH) et oxydées (GSSG) du glutathion ont été déterminées grâce à une méthode par luminescence (GSH/GSSG-Glo™ Assay, Promega, Madison, Wisconsin, Etats-Unis) avec un

lecteur de microplaques multimode Spark® (TECAN Männedorf, Autriche). Le pourcentage de déplétion a été calculé grâce au ratio entre les formes oxydées et réduites du glutathion (i.e., GSSG/GSH) et exprimées par rapport au témoin négatif, ne contenant pas de particules.

E. Modèle expérimental d'exposition aux particules de FS

Le modèle cellulaire utilisé pour cette étude in vitro est la lignée de cellules épithéliales bronchiques humaines BEAS-2B (ATCC® CRL-9609™, Virginie, USA). Les cellules BEAS-2B sont cultivées dans des flasques T75 CellBind (Corning®, New York, USA), à 37°, sous 5 % de CO₂, dans un milieu de culture défini LHC-9 (Life Technologies, Carlsbad, Californie, États-Unis). Ce milieu est complété par une solution de deux antibiotiques : Pénicilline et Streptomycine, à la concentration de 1% (V/V). A 80 % de confluence, les cellules sont repiquées dans des plaques de culture. Pour l'étude de cytotoxicité, les BEAS-2B sont cultivées en plaque 96 puits (0,33 cm² par puits), et en plaque 6 puits CORNING CellBind (9,5 cm²) pour l'analyse des autres paramètres des mécanismes cellulaires et moléculaires étudiés (i.e., stress oxydant, inflammation, transcriptomique, épigénétique). L'entretien des cellules BEAS-2B s'effectue selon les recommandations du fournisseur.

F. Détermination des doses d'exposition des cellules aux particules de FS

1. Préparation de la gamme de concentration d'exposition

Deux modes d'exposition sont testés :

- ▶ Aiguë, exposition de 24 h avec une dose unique de PUF.
- ▶ Répété, trois expositions successives de 24 h. La gamme de concentration croît de 0,1 µg à 50 µg par cm² de tapis cellulaire (0,1 ; 0,2 ; 0,5 ; 1 ; 2 ; 5 ; 10 ; 20 ; 50 µg/cm²). La réalisation de la gamme de concentration se fait à partir d'aliquots d'une suspension de PUF dans l'eau ultra-pure à la concentration de 1,91 µg/µL. L'analyse est réalisée à raison de 8 puits par dose sur une plaque 96-puits sur trois expériences indépendantes. Ce test permettra de sélectionner les 2 doses d'exposition qui seront utilisées ultérieurement afin d'étudier les mécanismes cellulaires et moléculaires de la toxicité des particules de FS ;

une première dose équivalente à la DL10 sera choisie, la deuxième dose correspondant à 6 fois la DL10. La DL10 correspond à la concentration pour laquelle 90 % des cellules sont encore viables.

2. Etude de la viabilité cellulaire

L'analyse de viabilité cellulaire ou cytotoxicité est réalisée par mesure de l'ATP intracellulaire. La diminution de la production d'ATP par les BEAS-2B en fonction de la concentration de PUF de FS est un marqueur d'effet cytotoxique. La détection de l'ATP se fait par luminescence. Les résultats sont représentés par une courbe sigmoïde décroissante. Cette analyse est réalisée à l'aide du kit CellTiter Glo™ analysis (Promega, Madison, Wisconsin, Etats-Unis) et la luminescence est mesurée avec un lecteur de microplaques multimode Spark® (TECAN Männedorf, Autriche) après exposition des cellules à des doses croissantes de PUF (exprimée en $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, rapporté à la surface du puit).

3. Détermination des doses d'exposition

La première concentration retenue pour chaque condition d'exposition est la DL10. Elle correspond à la concentration pour laquelle 10 % des cellules sont mortes, soit 90 % des cellules encore viables. La deuxième concentration retenue a été choisie de façon à avoir un taux de mortalité cellulaire compris entre 30 et 40 % et à avoir une dose commune entre les 2 conditions d'exposition. Elle correspond à 6 fois la DL10.

4. Mode d'exposition des cellules aux particules de FS

Pour la détermination des différents paramètres d'analyse, les cellules sont cultivées en plaques 6 puits CORNING CellBind®.

Chaque condition d'exposition a donné lieu à 3 séries d'exposition :

- ▶ 1ère série d'exposition : 3 puits par dose ont été exposés, par paramètre étudié.
- ▶ 2ème série d'exposition : 1 puits par dose exposé par paramètre étudié.
- ▶ 3ème série d'exposition : 1 puits par dose exposé par paramètre étudié.

Lors de chaque série d'exposition, 2 doses 1 x DL10 et 6 x DL10 d'exposition ont été testées et comparées à un témoin non exposé. Au total, 5 mesures par paramètre étudié, pour les 2 conditions d'exposition, étaient disponibles. L'arrêt des expositions et la récupération du matériel cellulaire ont été réalisés avec les solutions adaptées à chaque type d'analyses.

G. Etude du stress oxydant

Le stress oxydant induit par les PUF de FS a été évalué en mesurant la production d'ERO intracellulaire, les protéines carbonylées dans le lysat cellulaire des cellules exposées ou en quantifiant les lésions oxydatives de l'ADN de ces cellules (8-hydroxydesoxyguanine, 8-OHdG). La peroxydation lipidique, un autre marqueur du stress oxydant, a également été analysée avec la concentration de 4-HNE, un des produits bien connus de la peroxydation lipidique. La mise en place des défenses anti-oxydantes par les cellules BEAS-2B exposées a également été évaluée par l'activation de la voie de signalisation NRF2 de même que par la détermination du rapport glutathion réduit/oxydé (GSH/GSSG).

1. Analyse des ERO intracellulaires

Le production intracellulaire des ERO a été évaluée grâce à la sonde fluorescente 5-(and-6)-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (carboxy-H2DCFDA) (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA). Cette sonde, perméante, entre dans les cellules puis, en présence des estérases et des ERO intracellulaires, est désacétylée et oxydée en 2',7'-dichlorofluorescein (DCF) qui fluoresce. L'intensité de la fluorescence ainsi mesurée est dépendante de la quantité intracellulaire de ROS présents. Les cellules BEAS-2B ont été incubées pendant 40 minutes à 37°C avec la sonde carboxy-H2DCFDA à 10 µM dans une solution saline (Hanks' Balanced Salt Solution, HBSS). Après incubation, la sonde a été éliminée et les solutions d'exposition ont été ajoutées aux cellules. Après l'exposition, les milieux ont été remplacés par du PBS et les signaux de fluorescence ont été mesurés à des longueurs d'onde d'excitation et d'émission, respectivement de 485 et 525 nm, avec un lecteur de microplaques multimode Spark® (TECAN Männedorf, Autriche). Un contrôle négatif, non exposé, et un contrôle positif, exposé à la ménadione 24 h à 50 µM, ont été utilisés.

2. Analyse des protéines carbonylées

La recherche de protéines carbonylées est effectuée à l'aide du kit OxiSelect™ Protein Carbonyl ELISA (Cell Biolabs Inc, Paris, France). Après les expositions, les cellules sont lysées à l'aide d'un tampon RIPA, supplémenté d'inhibiteurs de phosphatases et de protéases. Cette technique colorimétrique utilise le potentiel de réaction des protéines carbonylées avec le dinitrophenylhydrazine (DNPH). Le produit de la réaction de dérivatisation (DNP-hydrazone protéine) se lie à un anticorps anti-DNP (épitope DNP). L'utilisation d'un anticorps secondaire conjugué à la peroxydase (HRP) permet la révélation de la liaison anti-DNP/DNP-hydrazone protéine. La quantification se fait par comparaison à une gamme d'étalonnage préparée à partir d'un mélange de sérum-albumine bovine oxydée/réduite. L'absorbance à la longueur d'onde de 450 nm, mesurée avec un lecteur de microplaques multimode Spark® (TECAN Männedorf, Autriche), est proportionnelle à la concentration en protéines carbonylées dans le milieu selon une relation linéaire.

3. Analyse de la 8-OHdG

Après exposition, les cellules sont lysées et les ADN extraits selon le protocole du kit QIAamp DNA Mini™ kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). Après extraction les échantillons d'ADN sont quantifiés à l'aide du spectrophotomètre SPARK® (TECAN). Le dosage de la 8-hydroxy-2'-désoxyguanosine (8-OHdG) est réalisé à l'aide du kit OxiSelect™ Oxidative DNA Damage ELISA (Cell Biolabs Inc) avec une prise d'essai identique à tous les échantillons de 2,5 µg d'ADN digéré. L'étape préliminaire de digestion de l'ADN sous forme de mono nucléotides est réalisée à l'aide d'une nucléase P1 (et d'une phosphatase alcaline Fujifilm Wako Chemicals, Neuss, Allemagne) après dénaturation des doubles brins d'ADN par chauffage à 100°C durant 2 minutes. Le dosage de la 8-OHdG est ensuite réalisé grâce à un ELISA compétitif. La concentration en 8-OHdG des échantillons d'ADN est inversement proportionnelle à l'absorbance mesurée avec un lecteur de microplaques multimode Spark® (TECAN Männedorf, Autriche) à la longueur d'onde de 450 nm. La régression non linéaire, courbe sigmoïdale inverse, obtenue à partir de la gamme de calibration permet de déduire les concentrations des échantillons de l'étude.

4. Analyse du 4-HNE

Le 4-Hydroxynonenale (4-HNE) est un produit de la peroxydation lipidique. Sa mesure permet d'évaluer le niveau de stress oxydant induit par l'exposition aux particules de FS. L'analyse a été réalisée sur les protéines extraites après exposition des cellules BEAS-2B. La méthode utilisée est un ELISA compétitif qui utilise le kit de la technologie MSD (Meso Scale Discovery, Maryland, USA). Cette technologie utilise la détection par électrochimiluminescence permettant des mesures hautement sensibles. Ainsi, la plaque est coâtée avec un antigène 4-HNE de référence (Hydroxynonenal modified Bovine Serum Albumin) (Abcam) puis, après blocage, l'échantillon est ajouté en même temps que l'anticorps anti-4HNE (Abcam). Les 4-HNE de l'échantillon entre alors en compétition avec les 4-HNE de référence pour leur liaison sur l'anticorps. Après addition d'un anticorps de détection SULFO-TAG (MSD), les plaques ont été lues, à la longueur d'onde de 620 nm, sur le lecteur MESO QuickPlex® (MSD).

5. Analyse de la voie de signalisation NRF2

Analyse de la capacité de liaison à l'ADN du facteur de transcription NRF2 : En condition de stress oxydant, le facteur de transcription NRF2 migre vers le noyau pour se fixer aux séquences Antioxidant Response Element (ARE) des gènes impliqués dans la réponse anti-oxydante. Cette réponse anti-oxydante a été évaluée grâce au kit TransAM® Nrf2 (Active Motif). Dans ce kit, une plaque ELISA est pré-coâtée avec des oligonucléotides mimant les séquences ARE. Les protéines NRF2 actives présentes dans les échantillons vont venir se fixer sur ces séquences ARE. Les liaisons NRF2 active-ARE sont ensuite reconnues par un anticorps primaire spécifique. Après ajout d'un anticorps secondaire couplé à la peroxydase HRP, la réaction colorimétrique est quantifiée par spectrophotométrie avec un lecteur de microplaques multimode Spark® (TECAN Männedorf, Autriche).

L'expression des gènes codant pour les enzymes *NQO1* et *HMOX* : connues pour leur rôle anti-oxydant et régulées par le facteur NRF2, l'expression des gènes codant pour les enzymes *NQO1* et *HMOX* a également été mesurée en RT-qPCR. La purification des ARN totaux a été réalisée sur colonne grâce au kit AllPrep® DNA/RNA/miRNA Universal Kit (Qiagen®, Courtaboeuf, France). La quantité et la pureté des ARN extraits ont été évaluées sur le spectrophotomètre Spark (Tecan). Les ARNm ont ensuite été rétrotranscrits en ADNc

avec le High-Capacity cDNA Reverse Transcription en suivant les recommandations du fournisseur (ThermoFisher Scientific). L'expression des gènes codant pour les enzymes *NQO1* et *HMOX* a également été mesurée en RT-qPCR grâce à la technologie Taqman®, appliquée sur le StepOnePlus (ThermoFisher Scientific).

6. Evaluation du statut en glutathion

Le glutathion total (addition des formes oxydée, GSSG, et réduite, GSH) au sein des cellules BEAS-2B ainsi que le ratio entre ces deux entités apportent des indications sur le statut oxydatif des cellules. Le glutathion oxydé (GSSG) ou réduit (GSH) est évalué dans cette étude par une mesure de luminescence à l'aide du kit GSH/GSSG-Glo™ Assay (Promega) avec un lecteur de microplaques multimode Spark® (TECAN Männedorf, Autriche). L'analyse s'effectue après exposition, à partir du lysat cellulaire obtenu par précipitation des protéines par l'acide métaphosphorique. La relation entre la concentration en glutathion (réduit ou oxydé) est proportionnelle au signal de luminescence détecté. Cette relation, saturable à forte concentration, est représentée par une hyperbole. Il s'agit d'une mesure simultanée du glutathion total et du glutathion oxydé permettant d'en déduire par soustraction le glutathion réduit. L'activité enzymatique de la glutathion S-transférase, essentielle à la réaction, est active à pH proche de 7.

H. Analyse de la réponse inflammatoire

1. Analyse de la capacité de liaison à l'ADN du facteur de transcription NF-κB

Le facteur de transcription NF-κB agit comme un chef d'orchestre de la réponse inflammatoire. Présent en condition normale lié à son inhibiteur IκB dans le cytoplasme, NFκB est libéré sous forme active dans le noyau suite à de nombreux stimuli notamment inflammatoires. Le facteur de transcription ainsi libéré se lie au niveau des promoteurs des gènes cibles pour déclencher, notamment, les médiateurs de la réponse inflammatoire. Cette activation du facteur NFκB a été quantifiée grâce au kit TransAM NFκB p65 (Active Motif). Ce kit fournit un oligonucléotide contenant un site sur lequel peuvent se fixer les facteurs NFκB. Les complexes NFκB activés, contenus dans les échantillons, se lient spécifiquement à cet oligonucléotide permettant ainsi leur détection grâce à un anticorps primaire dirigé contre la sous-unité p65 de NFκB. L'activité du facteur de transcription peut ainsi être quantifiée par

spectrophotométrie avec un lecteur de microplaques multimode Spark® (TECAN Männedorf, Autriche) après ajout d'un anticorps secondaire couplé à une HRP.

2. Analyse de la sécrétion des cytokines

La sécrétion de huit cytokines inflammatoires dans le surnageant de culture des BEAS-2B exposées est évaluée simultanément à l'aide du système MAGPIX® (Technologie Luminex®, Merck-Millipore, Guyancourt, France). Cette technique immunologique utilise des microparticules (billes) magnétiques fluorescentes, spécifiques et pré-cotées avec des anticorps reconnaissant les analytes d'intérêt à doser : MCP-1 (monocyte chemoattractant protein 1), IL-8 (interleukine 8), IL-1 β (interleukine 1 β), TNF- α (tumor necrosis factor- α), GRO- α (growth-regulated oncogene- α), GM-CSF (granulocyte macrophage colony stimulating factor), IL-6 (interleukine 6), CCL5 (chemokine ligand 5 ou RANTES). Les cytokines sont ensuite révélées avec un anticorps spécifique biotinylé (biotine ou vitamine B7) lui-même couplé avec de la streptavidine conjuguée à de la phycoérythrine (PE). La spécificité est liée à la combinaison de la fluorescence par microparticule (spécifique pour chaque analyte) et celle émise par la PE. La gamme de calibration est préparée dans les mêmes conditions, simultanément aux échantillons inconnus, à partir d'un standard compris dans le kit d'analyse. La régression de cette gamme (logistique 4- paramètres) calculée par l'appareil, permet de déduire la concentration des échantillons inconnus. Les analyses sont réalisées en dupliqua. Les concentrations en cytokines dans les différentes conditions d'exposition sont ensuite interprétées en se rapportant à la condition non exposée.

3. Expression génique des cytokines par RT-qPCR

Les niveaux d'expression génique des cytokines ont été vérifiés par RT-qPCR. La purification des ARN totaux a été réalisée sur colonne grâce au kit AllPrep® DNA/RNA/miRNA Universal Kit (Qiagen®, Courtaboeuf, France). La quantité et la pureté des ARN extraits ont été évaluées sur le spectrophotomètre Spark (Tecan). Les ARNm ont ensuite été rétrotranscrits en ADNc avec le High-Capacity cDNA Reverse Transcription en suivant les recommandations du fournisseur (ThermoFisher Scientific). Les ARNm ont ensuite été rétrotranscrits en ADNc avec le High-Capacity cDNA Reverse Transcription en suivant les recommandations du fournisseur (ThermoFisher Scientific). L'expression des gènes codant

pour les différentes cytokines a également été mesurée en RT-qPCR grâce à la technologie Taqman®, développée sur le StepOnePlus (ThermoFisher Scientific).

I. Analyse transcriptomique des voies de signalisation cellulaire

1. Extraction des ARN

Après exposition, les cellules BEAS-2B sont lysées dans 0,7 mL de QIAzol (Qiagen). Les ARN totaux sont ensuite extraits selon le protocole du kit miRNeasy mini™ (Qiagen) qui permet d'extraire en même temps ARNm et miARN. Le protocole d'extraction inclut une étape de digestion à la DNase I permettant l'élimination de toute trace d'ADN génomique résiduel. Les ARN totaux extraits sont quantifiés à l'aide du spectrophotomètre SPARK® (TECAN).

2. Amplification des ADNc par OPENARRAY

Le profil d'expression d'un panel de 672 gènes impliqués dans des voies de signalisations importantes chez l'Homme : les gènes codant pour les voies JAK-STAT, NFκB, Akt, GPCR, cAMP et MAP kinase sont bien représentées. Panel analysé à l'aide d'OpenArrays® avec le système QuantStudio™ 12K Flex équipé du robot AccuFill™ (Applied Biosystems™, Life Technologies). Cette technique consiste à réaliser des RT-PCR quantitatives en temps réel à très haut-débit avec la technologie Taqman® sur des lames pouvant contenir jusqu'à 3072 sondes. Dans un premier temps, les échantillons d'ARN à la concentration fixe de 200 ng/μL sont rétro-transcrits en ADNc (ADN complémentaire) à l'aide de l'enzyme Superscript™ IV VILOTM Mastermix (Invitrogen™). L'amplification est ensuite réalisée à l'aide du TaqMan® OpenArray® Real-time MasterMix (Life Technologies) et de lames préconfigurées TaqMan® OpenArray® Human Signal Transduction Panel (Applied Biosystems™,).

3. Analyse statistique des résultats de l'expression génique

L'analyse statistique est réalisée à l'aide de l'application en ligne (Applied Biosystems™ Relative Quantification, ThermoFisher). Le cycle de réplification seuil (CT) est la pierre angulaire la différence du niveau d'expression. Les ARNm sont mis en évidence lorsqu'ils sont surexprimés ou sous-exprimés significativement, après normalisation par l'expression d'un

gène dont l'expression est constante entre les échantillons (gène de ménage), avec une valeur seuil à 1,5 (fold-change ou FC). La comparaison des moyennes du CT dans un groupe d'échantillon par rapport au groupe contrôle non exposés permet d'obtenir la p-value : valeur seuil de significativité fixé à 0,05. Le fold-change (facteur multiplicatif de réplication de l'ADN spécifique recherché) et la p-value constituent les deux paramètres permettant la représentation des résultats sous forme de Volcano Plot, utilisés classiquement en analyse transcriptomique.

J. Analyse des modifications épigénétiques

1. Analyse de la méthylation globale de l'ADN

Après exposition, les cellules sont lysées et les ADN extraits selon le protocole du kit QIAamp DNA Mini™ kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). Après extraction les échantillons d'ADN sont quantifiés à l'aide d'un lecteur de microplaques multimode Spark® (TECAN Männedorf, Autriche). La méthylation globale de l'ADN est ensuite dosée par méthode ELISA grâce au kit Global DNA Methylation LINE-1 (Active Motif, Carlsbad, USA). Les échantillons d'ADN sont d'abord digérés puis hybridés à une sonde biotinylée LINE-1. 30 ng d'échantillons sont déposés en duplicat sur une plaque précoâtée à la streptavidine. Un premier anticorps, spécifique de la 5-Méthylcytosine, est ajouté puis un second anticorps couplé à une peroxydase HRP est utilisé pour permettre la détection des fragments méthylés. La révélation colorimétrique est réalisée par spectrophotométrie.

2. Analyse de la modification des histones

L'acétylation des histones a été mesurée en quantifiant l'expression des protéines H3K9, H3K27 et H3 total par ELISA. Les histones ont été extraites et purifiées en suivant les instructions du kit Histone extraction kit (Active Motif, Carlsbad, USA). Les échantillons protéiques ont été dosés par la méthode de Bradford. L'analyse de l'expression des protéines H3 totale a été réalisée avec le kit Total Histone H3 Elisa (Active Motif) sur 1 µg de protéines totales purifiées. Ensuite, les niveaux de lysine 9 et lysine 27 acétylées sur l'histone H3 ont été mesurés sur, respectivement, 0,5 et 1 µg de protéines totales avec les kits Histone H3 acetyl Lys 27 ELISA et Histone H3 acetyl Lys 9 ELISA. Le test consiste, dans un premier temps, en une capture des histones H3 grâce aux anticorps anti-H3. L'anticorps primaire, spécifique

de la modification d'intérêt, est ensuite ajouté. Enfin, l'ajout de l'anticorps secondaire couplé au conjugué HRP (horseradish peroxidase) dirigé contre l'anticorps primaire permet, en présence d'une solution de révélation, de quantifier le niveau d'expression des histones H3 et de leurs modifications. La densité optique est analysée par spectrophotométrie avec un lecteur de microplaques multimode Spark® (TECAN Männedorf, Autriche).

L'analyse des modifications d'histone a été complétée par la mesure de l'activité enzymatique des protéines HAT et HDAC responsables de l'acétylation et la désacétylation des histones. L'activité enzymatique de ces protéines a été mesurée avec, respectivement, les kits HAT Assay et HDAC Assay (Active Motif). Incubée en présence d'acetyl-CoA et d'histones H3, l'enzyme HAT va catalyser le transfert de groupements acetyl de l'acetyl-CoA vers les histones H3. Cette réaction libère le groupement fluorescent sulfhydryle (SH) de la Coenzyme A (CoA-SH) qui, en présence d'une solution de révélation, émet à 450nm après excitation à 360nm. Le kit HAT Assay a été réalisé en suivant les recommandations du fournisseur. Le signal fluorescent a été analysé avec un lecteur de microplaques multimode Spark® (TECAN Männedorf, Autriche). Ce signal est proportionnel à l'activité du HAT. Le kit HDAC Assay repose sur l'incubation d'un substrat peptidique, qui contient des lysines acétylées, avec les échantillons. L'enzyme HDAC désacétyle alors les résidus lysines qui réagissent avec la solution de révélation et libèrent des produits fluorescents. Le signal fluorescent est mesuré avec un lecteur de microplaques multimode Spark® (TECAN Männedorf, Autriche) à la longueur d'onde d'excitation de 340 nm et longueur d'onde d'émission de 440 nm.

3. Expression des MicroARN

a. Extraction des ARN

Après exposition, les cellules BEAS-2B sont lysées dans 0,7 mL de QIAzol (Qiagen). Les ARN totaux sont ensuite extraits selon le protocole du kit miRNeasy mini™ (Qiagen) qui permet d'extraire en même temps ARNm et miARN. Le protocole d'extraction inclut une étape de digestion à la DNase I permettant l'élimination de toute trace d'ADN génomique résiduel. Les ARN totaux extraits sont quantifiés à l'aide du spectrophotomètre SPARK® (TECAN).

i. Amplification des ADNc par OPENARRAY

L'analyse de l'expression des microARN est également réalisée par OpenArray®. Dans un premier temps, les miARNs à la concentration de 33,3 ng/μL sont rétro-transcrits en ADNc à l'aide du kit TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription (Life Technologies) puis pré-amplifiés à l'aide de TaqMan® PreAmp MasterMix (Life Technologies) et des primers Megaplex™ pool A et B (Life Technologies). L'amplification est réalisée par TaqMan® OpenArray® Real-time MasterMix (Life Technologies) en utilisant le QuantStudio™ 12K Flex équipé du robot AccuFill™ (Applied Biosystems™, Life Technologies). L'expression de 754 miARNs est ensuite quantifiée en utilisant les lames préconfigurées Taqman® OpenArray® Human miRNA Panel (Applied Biosystems™,).

ii. Analyse statistique des résultats de l'expression des miARN

L'analyse statistique est réalisée à l'aide de l'application en ligne (Applied Biosystems™ Relative Quantification, ThermoFisher). Le cycle de réplification seuil (CT) est la pierre angulaire la différence du niveau d'expression. Les miARN sont mis en évidence lorsqu'ils sont surexprimés ou sous-exprimés significativement, après normalisation par l'expression d'un gène dont l'expression est constante entre les échantillons (gène de ménage), avec une valeur seuil à 1,5 (fold-change ou FC). La comparaison des moyennes du CT dans un groupe d'échantillon par rapport au groupe contrôle non exposés permet d'obtenir la p-value : valeur seuil de significativité fixé à 0,05. Le fold-change (facteur multiplicatif de réplification de l'ADN spécifique recherché) et la p-value constituent les deux paramètres permettant la représentation des résultats sous forme de Volcano Plot, utilisés classiquement en analyse transcriptomique.

K. Etude de la mort cellulaire par apoptose

1. Analyse de l'apoptose par cytométrie en flux

La sonde Annexin V- Pacific Blue™ (ThermoFisher Scientific) a été utilisée pour détecter les cellules apoptotiques. Lors de l'apoptose, les résidus phosphatidylsérines (PS), normalement présents sur la surface cytoplasmique des membranes, sont externalisés. L'annexine V fixe avec une forte affinité ces résidus PS. Ainsi, couplée au fluorophore Pacific Blue, l'annexine V conjuguée permet la détection des cellules apoptotiques. Néanmoins, une

cellule en apoptose tardive ou en nécrose peut présenter un défaut de son intégrité membranaire. Ainsi, l'annexine V entre dans la cellule et se fixe également aux PS intracellulaires à l'origine d'un marquage non spécifique de l'apoptose précoce. C'est pourquoi, la sonde SYTOX® AADvanced™ dead cell stain (ThermoFisher Scientific) a été utilisée en complément de la sonde Pacific Blue™-Annexin V. Cette sonde, qui possède une forte affinité pour les acides nucléiques, ne pénètre que les cellules dont la membrane plasmique est perméabilisée. Ainsi, l'utilisation simultanée de la sonde SYTOX® AADvanced™ avec la sonde Pacific Blue™-Annexin V permet de discriminer les cellules en apoptose précoce des cellules en apoptose tardive ou en nécrose.

Après exposition des cellules aux particules de FS, les cellules ont été détachées de leur support de culture grâce à la trypsine puis incubées 30min à 37°C dans du milieu de culture LHC-9 (ThermoFisher Scientific). Cette étape permet aux cellules de récupérer d'éventuels dommages subis par leur membrane cellulaire à la suite du traitement avec la trypsine. Les cellules ont ensuite été centrifugées puis remises en suspension dans l'Annexin Buffer 1X (ThermoFisher Scientific) avant d'être marquées par la sonde Pacific Blue™-Annexin V pendant 30 minutes. Après incubation, la sonde SYTOX® AADvanced™ a été ajoutée à la suspension cellulaire et incubée pendant 10 minutes à température ambiante. La lecture de la fluorescence a été réalisée sans rinçage sur le cytomètre Attune NxT (ThermoFisher Scientific). Des cellules traitées à la staurosporine pendant 24h à 2.5µM ont été utilisées comme témoins positifs. L'analyse de l'apoptose en cytométrie a été réalisée en triplicata.

2. Analyse des activités des caspases 3/7, 8 et 9

Les activités de certaines caspases initiatrices (i.e., caspase 8 et caspase 9) et des caspases exécutrices (i.e., e caspase 3 et caspase 7) ont été déterminées avec les tests Caspase Glo® 3/7, Caspase Glo® 8 et Caspase Glo® 9, comme recommandé par le fabricant (Promega). Des cellules traitées à la staurosporine pendant 24h à 2.5µM ont été utilisées comme témoins positifs.

L. Analyses statistiques

Pour la caractérisation physique et chimique et la détermination du potentiel oxydant des PUF des FS, tous les paramètres ont été analysés en triplicat ($n = 3$). Pour l'ensemble des mécanismes cellulaires et moléculaires étudiés dans le cadre de l'approche toxicologique, hormis l'expression des mARN et miARN, dont les analyses statistiques ont préalablement été décrites, trois expériences indépendantes ont été réalisées : pour chaque paramètre étudié, des triplicats ($n = 3$) ont été analysés pour la première expérience et des simplicats ($n = 1$) pour les deux autres, soit au total 5 observations ($n = 5$). Les variables aléatoires quantitatives continues ont été exprimés par leurs moyennes et leurs écart-types et une représentation graphique de chacune de ces variables a été réalisée. Des comparaisons, pour chacune des variables aléatoires quantitatives continues, ont été réalisées entre les différents groupes de cellules exposées aux PUF des FS et le groupe non exposé, grâce au test t de Student, après vérification de la normalité de leur. Le risque de première espèce consenti était de 0,05 ($p < 0,05$). Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel SPSS v27 (SPSS, Paris, France).

CHAPITRE IV : RESULTATS

A. Caractérisation physico-chimique des particules de FS

1. Collecte des particules des FS

La campagne de génération des FS a été réalisée entre le 10 et le 13 septembre 2018. Cinquante-sept cordons de soudure ont permis de collecter 133 mg de particules de diamètres aérodynamiques équivalents inférieurs à 250 nm à l'aide des impacteurs SIOUTAS. La concentration moyenne en masse de l'ensemble des particules des FS était de $40,1 \pm 3,9$ mg/m³ sur l'ensemble de la collecte. Les concentrations en nombre étaient comprises entre 6,6 et $11,7 \times 10^6$ particules/cm³ sur l'ensemble de la collecte. La fraction renfermant les particules de diamètres aérodynamiques équivalents inférieurs à 250 nm représentait de manière répétable environ 87 % en masse de la quantité collectée pour chaque génération de particules. Après extraction des particules en milieu liquide, la concentration finale des PUF dans l'eau milliQ était de 1,91 µg/µl. Cette solution a été répartie en aliquots de 500 µL, et immédiatement conservés à -20°C.

2. Distribution granulométrique des particules des FS en milieu liquide

L'analyse de la distribution granulométrique en nombre des particules des FS dans la fraction collectée, à savoir les particules ayant des diamètres aérodynamiques équivalents inférieurs à 250 nm, a été utilisée afin de déterminer le diamètre hydrodynamique moyen des PUF remises en suspension. Les distributions granulométriques des particules mesurées après sonication au bac à ultrasons ou sonication avec une sonde à ultrasons sont respectivement décrites dans les Figure 41-A et Figure 41-B.

Le tableau 15 détaille les résultats de chacune de ces analyses. Le diamètre hydrodynamique initial des particules, en nombre, dans les conditions expérimentales de notre étude était de 968,7 nm après utilisation du bac à ultrasons, et de 42,78 nm après utilisation de la sonde à ultrasons. Le bac à ultrasons s'est avéré moins efficace que la sonde à ultrasons pour disperser les agrégats des particules des FS dont les diamètres aérodynamiques équivalents étaient inférieurs à 250 nm. La formation d'agrégats est néanmoins très rapide : par exemple, en une minute après leur sonication par la sonde à

ultrasons, le diamètre hydrodynamique moyen, en nombre, des particules des FS a évolué de 42,78 à 108,5 nm.

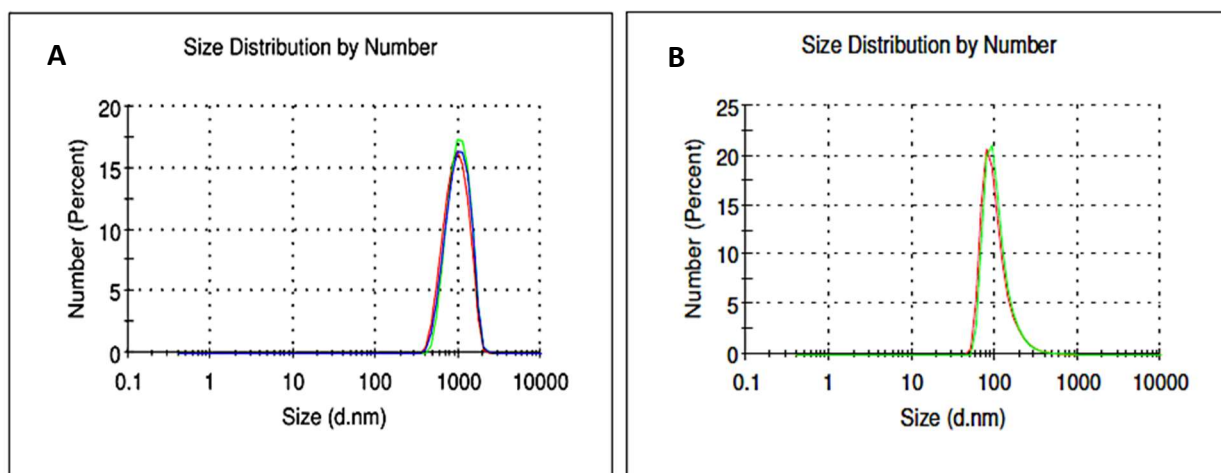


Figure 41 : Distribution granulométrique des particules des fumées de soudage en fonction de leur nombre après sonication au bac à ultrasons (A) ou à l'aide d'une sonde à ultrasons (B).

Tableau 15: Distribution granulométrique des particules des fumées de soudage en milieu liquide selon deux modes de sonication : bac à ultrasons versus sonde à ultrasons.

Mesures	Taille (nm)					
	A			B		
	1	2	3	1	2	3
Résultats des 3 mesures successives (intervalle de 30 secondes entre chaque mesure)	968,7	1035	1019	42,78	104,4	108,5

Les résultats de l'analyse granulométrique des particules des FS dont les diamètres aérodynamiques équivalents étaient inférieurs à 250 nm ont montrés que le plus grand nombre d'entre-elles étaient, après sonication, assimilables à des PUF, de par leurs diamètres hydrodynamiques équivalents (i.e., 42,78 nm - 108,5 nm)

3. Composition métallique des particules des FS

Les résultats de l'analyse par ICP-AES de la composition des PUF des FS en éléments traces métalliques (ETM) a montré la présence exclusive d'oxydes métalliques. La Figure 42 présente les principaux oxydes, représentant 99,5% en masse de la composition des PUF. Bien que 37 éléments aient été dosés, seuls les éléments présents à une concentration supérieure à 1 ppm ont été représentés.

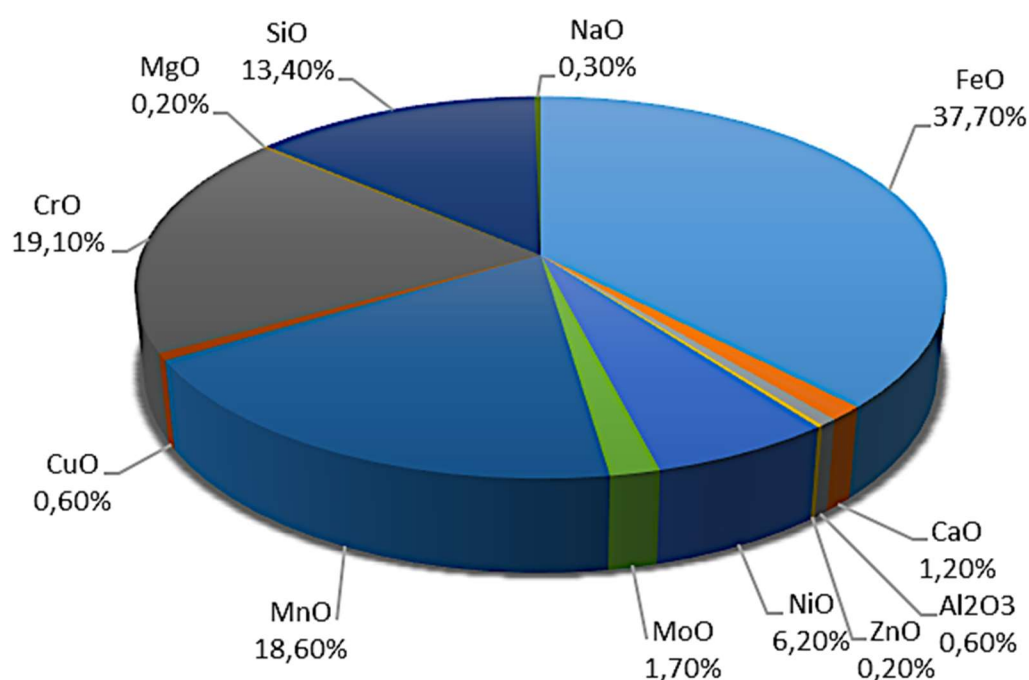


Figure 42 : Représentation graphique de la composition élémentaire relative des PUF de FS (ng/ μ g).

Les 7 éléments majeurs mesurés sont le Fe, la Si, le Mo, le Ca, le Mn, le Cr, et le Ni, très majoritairement sous forme d'oxydes. Cette composition chimique est très proche de celles déjà décrites dans la littérature pour les particules des FS générées selon le même procédé de soudage, à savoir le GMAW sur acier inoxydable (Antonini et al., 2004) (Falcone et al., 2017) (Antonini et al., 2011).

Concernant le Chrome VI, les concentrations mesurées étaient de $160 \pm 10 \mu\text{g}/\text{m}^3$, soit $4.3 \pm 0.3 \mu\text{g}$ de CrVI sur le support par cordon de soudure.

4. Potentiel oxydant des PUF des FS

Le potentiel oxydant des PUF a été déterminé par deux tests acellulaires, celui du CM-H2DCFDA et celui de la déplétion en glutathion réduit (GSH). Après l'incubation de la sonde CM-H2DCFDA en présence continue des PUF à 10, 50 et 100 µg/mL, les intensités relatives de fluorescence étaient respectivement multipliées par les facteurs 7,57, 21,14 et 57,97, par rapport au témoin négatif ($p < 0,001$). L'intensité relative de fluorescence du contrôle positif (i.e., H2O2, 100 µM) était 27,74 fois plus élevée que celle du contrôle négatif ($p < 0,001$). Des oxydations du glutathion réduit (GSH) en glutathion oxydé (GSSG) ont été observées en présence des PUF des FS. Après l'incubation des PUF à 10, 50 et 100 µg/mL pendant 4 h à 37°C en présence de GSH (200 µM), les ratios GSSG/GSH ont respectivement été multipliés par des facteurs 14,86, 58,36 et 122,43, par rapport au témoin négatif ($p < 0,001$). Le contrôle positif a conduit à une augmentation de 50,70 fois du ratio, par rapport au témoin négatif ($p < 0,001$).

B. Toxicité pulmonaire des PUF de FS

1. Etude de la cytotoxicité des PUF des FS

L'analyse de viabilité cellulaire a été effectuée au travers de trois expositions indépendantes afin de définir le mieux possible la DL10 après expositions aiguë et répétées aux PUF de FS (Figure 43).

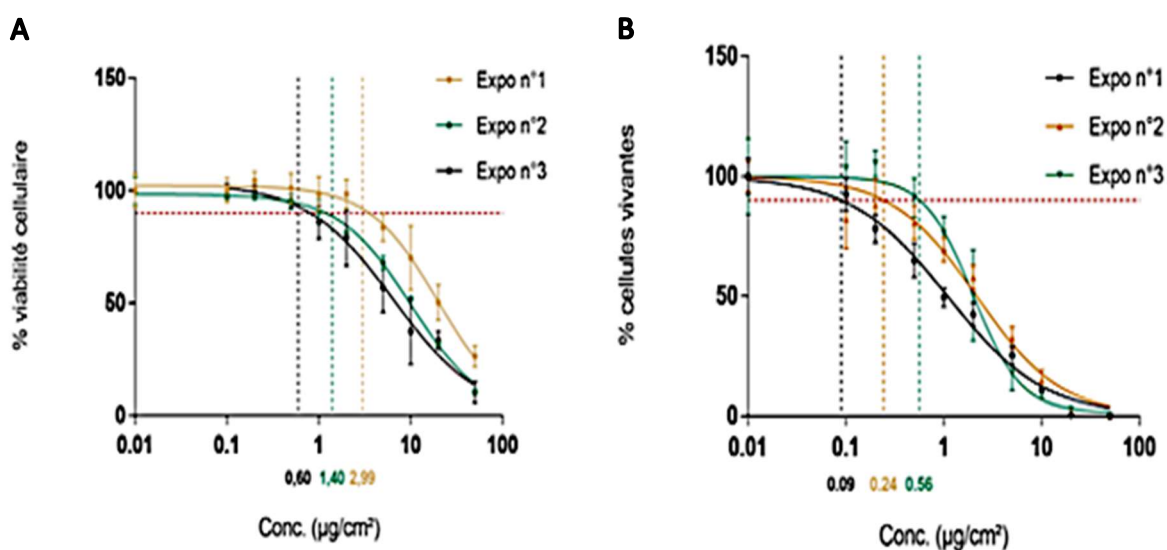


Figure 43 : Représentation graphique des courbes de viabilité cellulaire évaluée par 3 expositions indépendantes des cellules BEAS-2B à des concentrations (µg/cm²) des PUF des FS : après une exposition aiguë (A) ou des expositions répétées (B).

Les DL10 calculées pour chaque expérience, après régression non linéaire, sont respectivement de 0,6, 1,40 et 2,99 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ pour l'exposition aiguë et de 0,09, 0,24 et 0,56 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ pour les expositions répétées (Figure 43). Après regroupement des données des trois expériences indépendantes, les DL₁₀ moyennes pour les expositions aiguë et répétées aux PUF de FS ont été calculées et sont représentées sur la Figure 44.

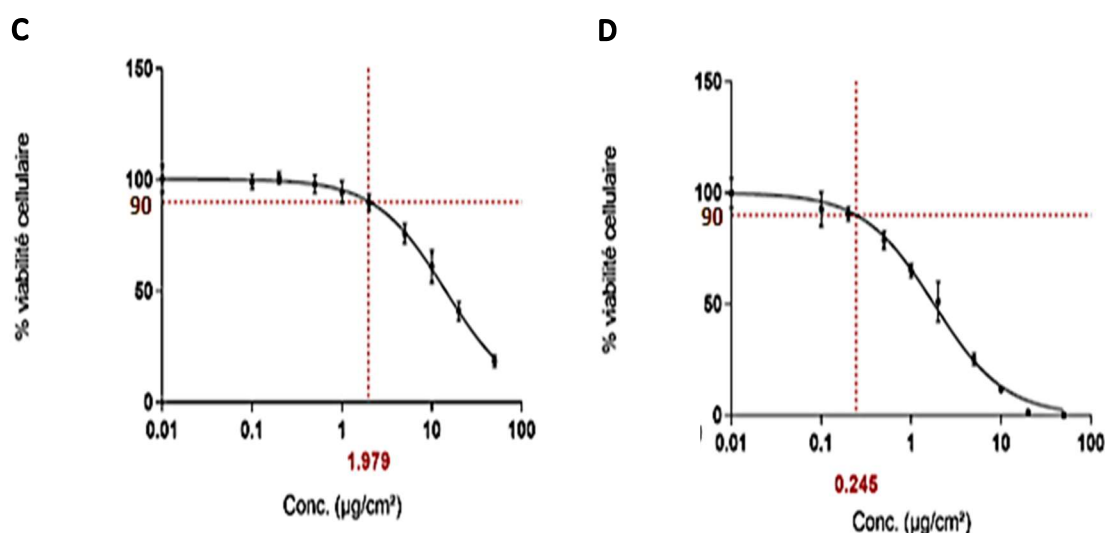


Figure 44 : Représentation graphique des courbes moyennes de viabilité cellulaire évaluée par 3 expositions indépendantes des cellules BEAS-2B à des concentrations ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) des PUF de FS : après une exposition aiguë (A) ou des expositions répétées (B).

Les DL10 moyennes, calculées, sont respectivement de 1,97 et 0,25 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ pour les expositions aiguës et répétées des cellules BEAS-2B aux PUF de FS. Les doses d'expositions choisies pour les analyses toxicologiques ultérieures sont les suivantes :

- ▶ 1,5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (DL10) et 9 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (DL10 x 6) pour l'exposition aiguë
- ▶ 0,25 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (DL10) et 1,5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (DL10 x 6) pour l'exposition répétée

La DL10 est la première concentration utilisée pour chaque condition d'exposition, aiguë ou répétée. Les concentrations plus élevées, choisies, correspondent à 6 fois chaque DL10, de manière à induire dans les conditions expérimentales un effet cytotoxique plus important (i.e. mortalité de l'ordre de 40%) dans les cellules BEAS-2B et de permettre d'utiliser une dose d'exposition commune aux PUF entre les deux stratégies d'exposition des cellules BEAS-2B (i.e., 1,5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$).

2. Évaluation du stress oxydant après exposition aux PUF des FS

a. Production intracellulaire d'ERO par les PUF des FS

La production des ERO intracellulaires a été évaluée grâce à la sonde CM-H₂DCFDA. Comme montré par la Figure 45, l'exposition des cellules BEAS-2B aux PUF de FS a induit une augmentation significative de la fluorescence, et ce, quelles que soient la dose et/ou la durée de l'exposition. Ces résultats témoignent de l'effet cytotoxique des particules de FS sur les cellules BEAS-2B.

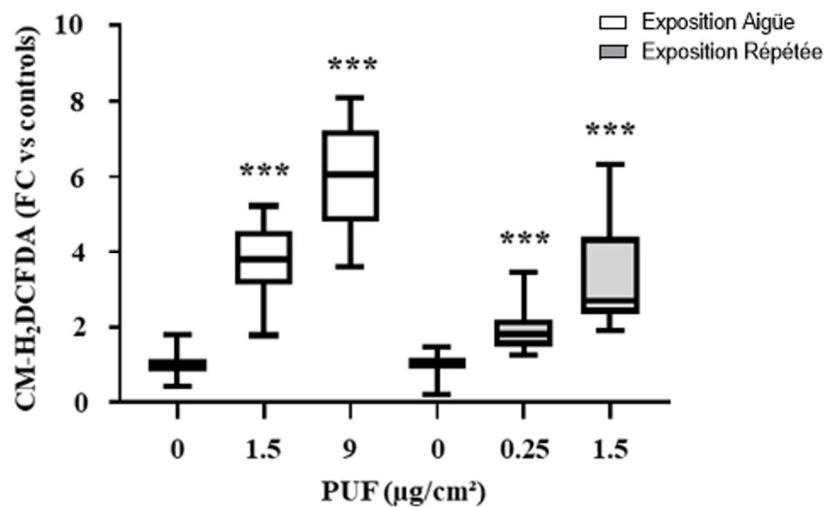


Figure 45 : Production intracellulaire des espèces réactives de l'oxygène (ERO) évaluée par la mesure de la fluorescence de la sonde CM-H₂DCFDA après exposition des cellules BEAS-2B aux particules ultrafines (PUF) des fumées de soudage. (Test t de Student, versus contrôles, n = 5, *** = p < 0,001)

b. Activation de la voie de signalisation Nrf2 par les PUF des FS

La réponse antioxydante provoquée par l'exposition des cellules BEAS-2B aux PUF des FS a premièrement été évaluée par la mesure de la capacité de fixation de Nrf2 à la séquence ARE de l'ADN (Figure 46). Les résultats ont montré une augmentation significative de la capacité de fixation de Nrf2 après exposition aiguë des cellules BEAS-2B aux PUF des FS à la dose de 9 µg/cm² (p < 0,001). L'activation de cette voie de signalisation a aussi été retrouvée suite à l'exposition répétée des cellules BEAS-2B aux PUF des FS à la dose de 0,25 et à la dose de 1,5 µg/cm² (p < 0,01 et p < 0,001).

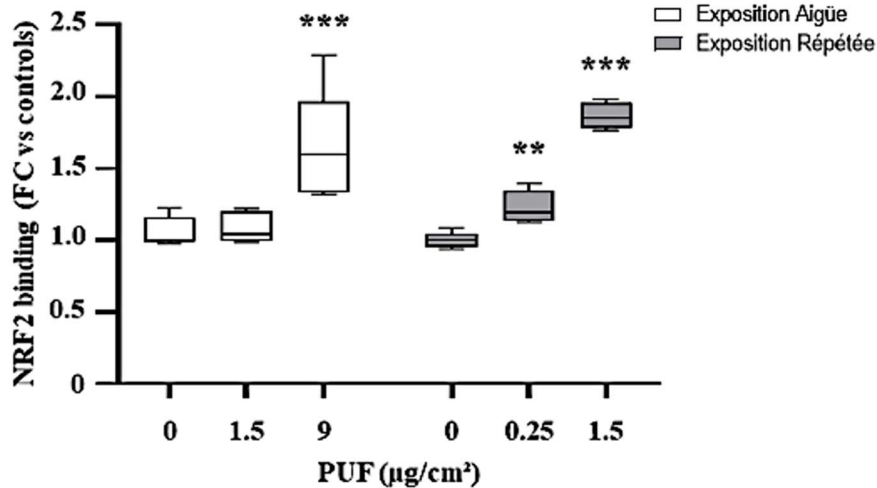


Figure 46 : Capacité de fixation du nuclear factor erythroid-2-related factor 2 (Nrf2) à la séquence Antioxidant Response Element de l'ADN après exposition des cellules BEAS-2B aux particules ultrafines (PUF) des fumées de soudage. (Test t de Student, versus contrôles, n = 5, ** = $p < 0.01$ et *** = $p < 0,001$)

L'évaluation de la réponse antioxydante a été complétée par la mesure de l'expression génique de deux enzymes : *HMOX* et la *NQO-1*. L'induction de l'expression génique de ces deux enzymes antioxydantes est sous la dépendance de l'activation de la voie de signalisation Nrf2. Comme montré sur la Figure 47, l'exposition des cellules BEAS-2B aux PUF des FS a déclenché l'activation de la voie de signalisation Nrf2. En effet, en condition aiguë, le niveau d'expression de *HMOX-1* est multiplié respectivement par 1,5 et 3, après exposition des cellules BEAS-2B à des doses de 1,5 µg/cm² et 9 µg/cm² de PUF ($p < 0.05$ et $p < 0.01$). En condition répétée, l'exposition a aussi augmenté significativement le niveau d'expression de *HMOX* mais dans une moindre mesure (FC < 1,5, $p < 0.05$). A l'instar de *HMOX-1*, le niveau d'expression de *NQO-1* a été significativement augmenté après exposition aiguë des cellules BEAS-2B à des doses de 1,5 µg/cm² et 9 µg/cm² de PUF ($p < 0.05$ et $p < 0.01$) et, à nouveau dans une moindre mesure, après exposition répétée des cellules BEAS-2B à des doses de 0,25 µg/cm² et 1,5 µg/cm² de PUF ($p < 0.05$).

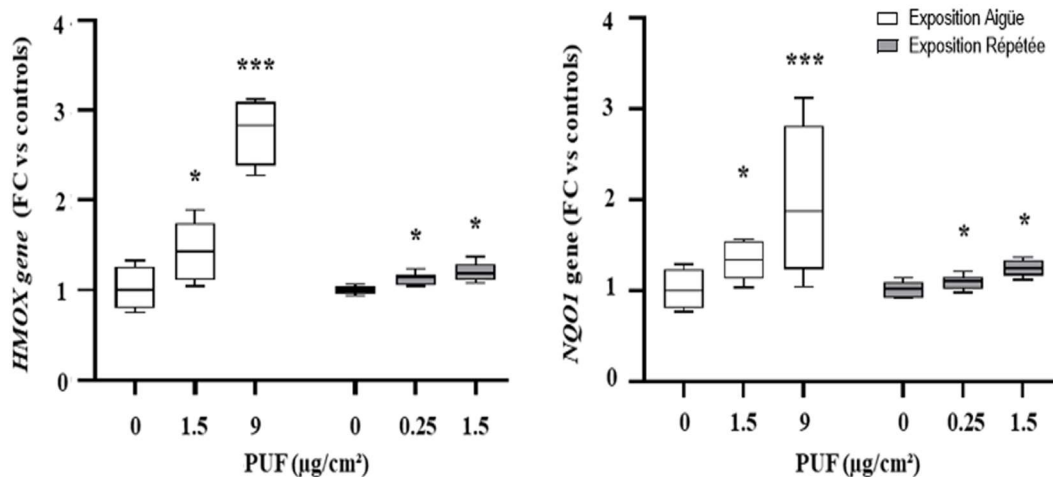


Figure 47 : Expression des gènes codant pour les enzymes antioxydantes, Hème Oxygénase-1 (HMOX) et NADPH Quinone Oxydoréductase 1 (NQO-1) après exposition des cellules BEAS-2B aux particules ultrafines (PUF) des fumées de soudage. (Test t de Student, versus contrôles, n = 5, * = $p < 0.05$ et *** = $p < 0,001$)

c. Altération du statut du glutathion après exposition aux PUF des FS

La mesure du ratio entre les concentrations intracellulaires des formes oxydée et réduite du glutathion (GSSG/GSH) a montré une oxydation significative de la forme réduite, antioxydante, de ce tripeptide dans les cellules BEAS-2B exposées aux PUF des FS par rapport aux cellules non exposées (Figure 48). En effet, le ratio GSSG/GSH est multiplié par un facteur 2 après l'exposition aiguë des cellules BEAS-2B aux PUF des FS à la dose de 1,5 µg/cm² et par un facteur 12 après l'exposition aiguë des cellules BEAS-2B aux PUF des FS à la dose de 9 µg/cm², par rapport aux cellules BEAS-2B non exposées ($p < 0.001$). Bien que des résultats identiques aient été observés suite à l'exposition répétée des cellules BEAS-2B aux PUF des FS à la dose de 0,25 µg/cm² et à celle de 1,25 µg/cm², l'oxydation du GSH en GSSG était moins importante. En effet, l'exposition répétée des cellules BEAS-2B aux PUF des FS à la dose de 0,25 µg/cm² n'a provoqué qu'une légère augmentation, certes significative, du ratio GSSG/GSH par rapport aux cellules non exposées, et celle des cellules BEAS-2B aux PUF des FS à la dose de 1,5 µg/cm² n'a provoqué qu'une augmentation que d'un facteur 2 de ce ratio ($p < 0.001$). L'altération du statut redox du glutathion pourrait indiquer un dépassement des défenses antioxydantes cellulaires face aux ERO produites par les PUF des FS.

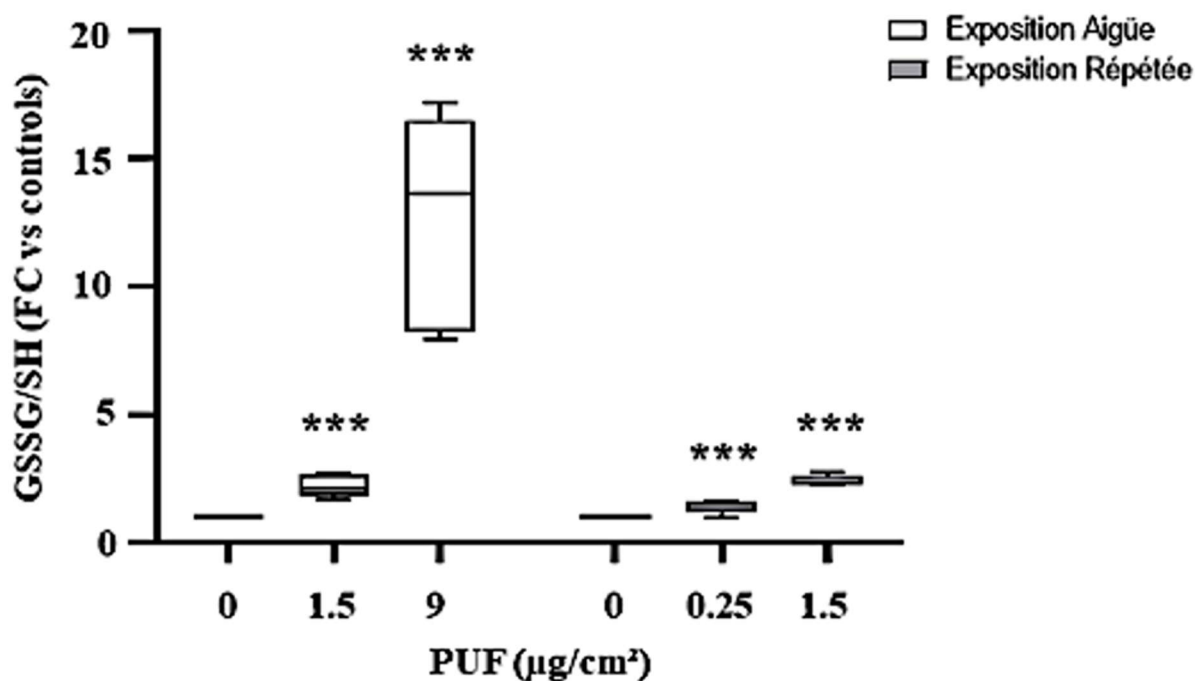


Figure 48 : Ratio entre les formes oxydée et réduite du glutathion (GSSG/GSH) après exposition des cellules BEAS-2B aux particules ultrafines (PUF) des fumées de soudage. (Test t de Student, versus contrôles, $n = 5$, *** = $p < 0,001$)

d. Production de la 8-OHdG après exposition aux PUF des FS

Le stress oxydant peut provoquer des lésions à l'ADN qui se traduisent par la formation d'adduits oxydatifs, mutagènes, au niveau de certaines bases particulièrement sensibles, formant plus particulièrement la 8-OHdG. Comme le montre la Figure 49, une augmentation significative de la concentration en 8-OHdG a été observée après l'exposition aiguë ou l'exposition répétée des cellules BEAS-2B aux PUF des FS à la dose la plus élevée utilisée pour chaque exposition, à savoir, $9 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ et $1,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, par rapport aux cellules BEAS-2B non exposées ($p < 0.01$ et $p < 0.05$).

e. Production de protéines carbonylées après exposition aux PUF des FS

La production excessive d'ERO peut aussi conduire à l'oxydation de certaines acides aminés des protéines, observable par la détermination des concentrations en protéines carbonylées (CO-PROT). Les concentrations en protéines carbonylées dans les cellules BEAS-2B exposées aux PUF des FS par rapport aux cellules non exposées sont présentées sur la Figure 50. Seule l'exposition des cellules BEAS-2B aux PUF des FS à la dose de $9 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ a

provoqué une augmentation significative de la concentration en CO-PROT par rapport aux cellules BEAS-2B non exposées ($p < 0.01$).

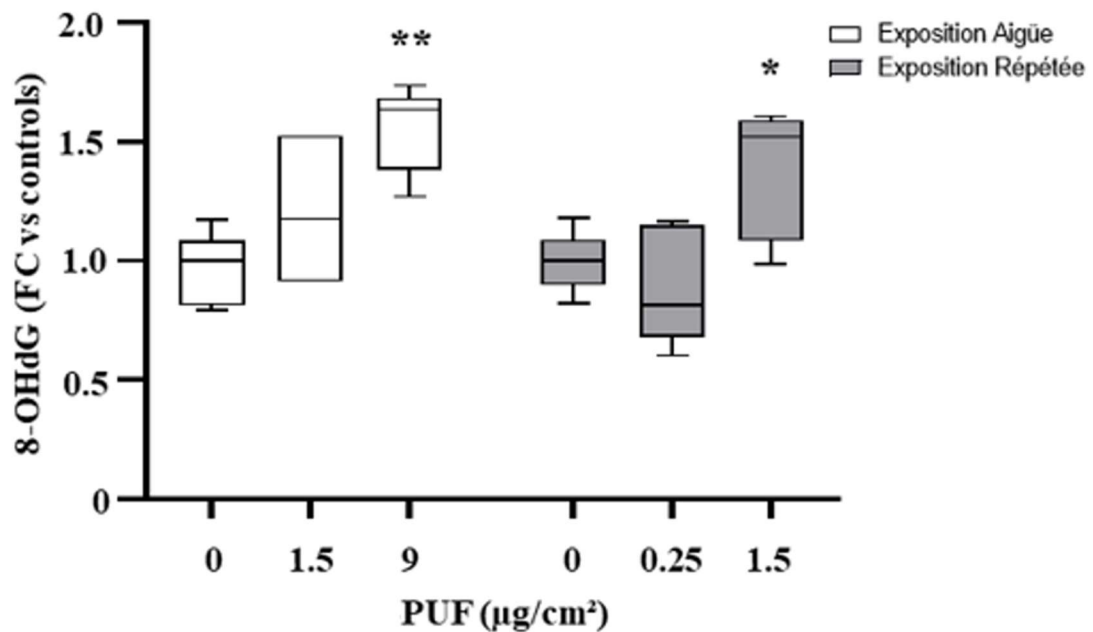


Figure 49 : Concentration en 8-hydroxy-2'-désoxyguanosine (8-OHdG) après exposition des cellules BEAS-2B aux particules ultrafines (PUF) des fumées de soudage. (Test t de Student, versus contrôles, $n = 5$, * = $p < 0,05$ et ** = $p < 0,01$)

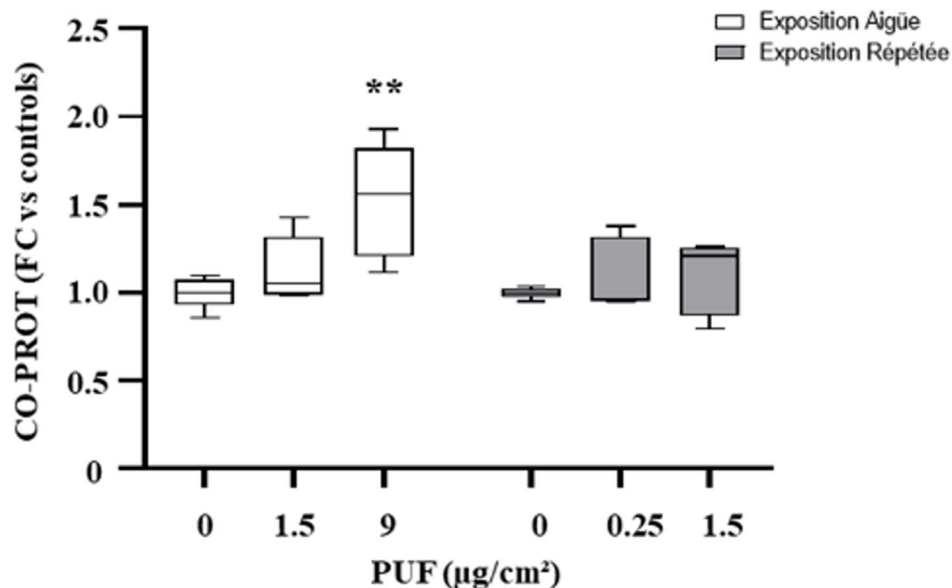


Figure 50 : Concentrations en protéines carbonylées (CO-PROT) après exposition des cellules BEAS-2B aux particules ultrafines (PUF) des fumées de soudage. (Test t de Student, versus contrôles, $n = 5$, ** = $p < 0,01$)

f. Production du 4-HNE après exposition aux PUF des FS S

Le 4-HNE est un aldéhyde généralement produit lors de la dégradation oxydative des acides gras polyinsaturés des phospholipides membranaires, encore appelée peroxydation lipidique. La détermination des concentrations en 4-HNE dans les cellules BEAS-2B exposées aux PUF des FS, par rapport aux cellules non exposées, est décrite par la Figure 51. Aucune production significative de cet aldéhyde, mesuré sous la forme de ses adduits avec la BSA, n'a été observée après l'exposition aiguë des cellules BEAS-2B aux PUF des FS aux deux doses testées, par rapport aux cellules BEAS-2B non exposées. En revanche, les concentrations en adduits 4-HNE-BSA ont été significativement augmentées suite à l'exposition répétée des cellules BEAS-2B aux PUF des FS à la dose de 0,25 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ et à celle de 1,25 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ($p < 0,01$ et $p < 0,05$), par rapport aux cellules BEAS-2B non exposées.

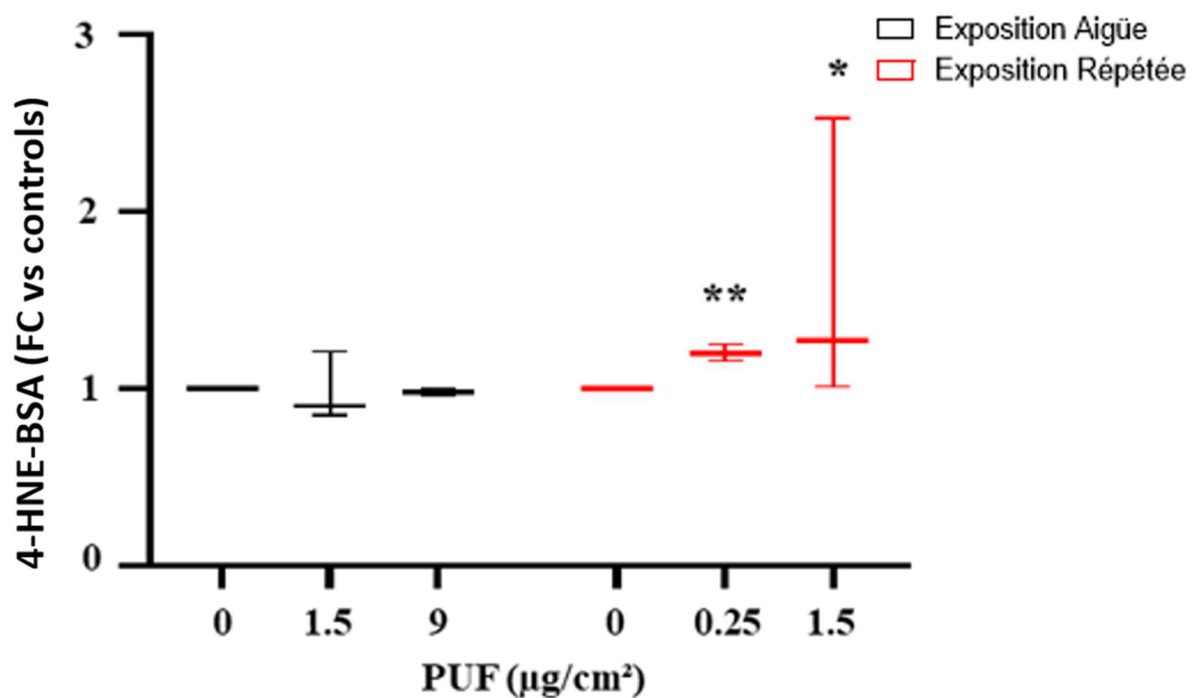


Figure 51 : Concentrations en adduits 4-hydroxynonéal (4-HNE) -sérum albumine bovine (BSA) après exposition des cellules BEAS-2B aux particules ultrafines (PUF) des fumées de soudage. (Test t de Student, versus contrôles, $n = 5$, ** = $p < 0,01$)

3. Analyse de la réponse inflammatoire après exposition aux PUF des FS

a. Activation de la voie de signalisation du facteur NF- κ B par les PUF des FS

La réponse inflammatoire possiblement provoquée par l'exposition des cellules BEAS-2B aux PUF des FS a premièrement été évaluée par la mesure de la capacité de fixation du facteur NF- κ B à l'ADN (Figure 52). Les résultats ont montré une augmentation significative de la capacité de fixation de NF- κ B après exposition aiguë des cellules BEAS-2B aux PUF des FS uniquement à la dose de 9 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, par rapport aux cellules BEAS-2B non exposées ($p < 0,001$). L'activation de cette voie de signalisation a aussi été retrouvée à la suite de l'exposition répétée des cellules BEAS-2B aux PUF des FS uniquement à la dose la plus forte, à savoir 1,5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, par rapport aux cellules BEAS-2B non exposées ($p < 0,01$).

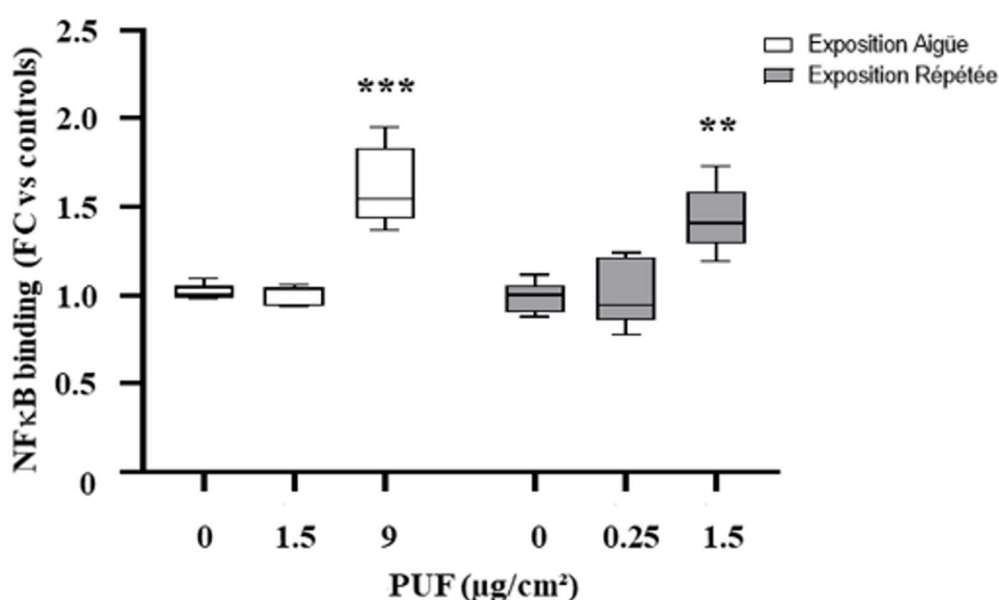


Figure 52 : Capacité de fixation du nuclear factor-kappa B (NF- κ B) à l'ADN après exposition des cellules BEAS-2B aux particules ultrafines (PUF) des fumées de soudage. (Test t de Student, versus contrôles, $n = 5$, ** = $p < 0,01$ et *** = $p < 0,001$)

b. Sécrétion des cytokines pro-inflammatoires après exposition aux PUF des FS

La sécrétion de sept cytokines pro-inflammatoires a été déterminée dans les surnageants de culture des cellules BEAS-2B exposées aux PUF de FS afin d'évaluer le possible développement d'une réponse inflammatoire. Comme le montre la Figure 53 pour quelques cytokines (e.g., IL-6, IL-1 β , et TNF- α), de manière surprenante, les concentrations en ces médiateurs de l'inflammation ont été diminuée (IL-6) ou inchangée (IL-1 β , et TNF- α) dans les

surnageants des cellules BEAS-2B exposées, de manière aiguë ou répétée, aux différentes doses des PUF des FS, par rapport aux cellules BEAS-2B non exposées. A noter les relativement faibles concentrations détectées dans les surnageants de culture, y compris ceux des cellules BEAS-2B exposées aux PUF des FS, et la grande variabilité des réponses en termes de sécrétion de cytokines qui existe au sein d'un même groupe d'exposition.

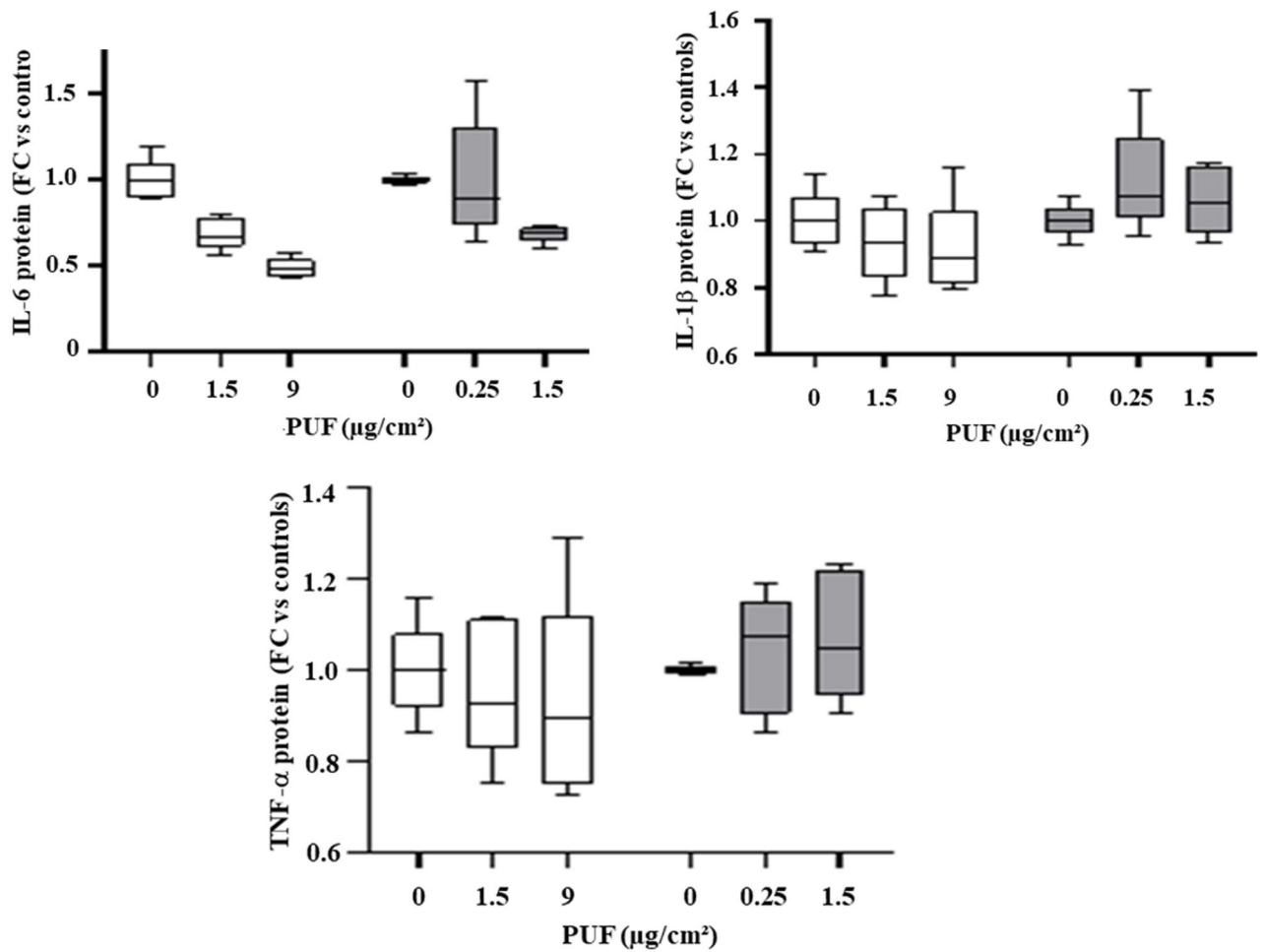


Figure 53 : Concentrations en Interleukine-6 (IL-6), Interleukine-1 bêta (IL-1β) et Tumor Necrosis Factor-alpha (TNF-α) dans les surnageants de culture des cellules BEAS-2B après exposition aux particules ultrafines (PUF) des fumées de soudage. (Test t de Student, versus contrôles, n = 5)

c. Expression génique des cytokines inflammatoires après exposition aux PUF de FS

Afin de compléter les résultats quelque peu surprenants, préalablement obtenus dans notre projet de recherche, sur la sécrétion des médiateurs de l'inflammation par cellules BEAS-2B exposées, de manière aiguë ou répétée, aux PUF des FS, les expressions géniques de certaines de ces cytokines et chemokines (i.e. *IL-1 β* , *IL-6*, *IL-8* et *TNF- α*) ont aussi été évaluées (Figures 54 et 55). Concernant l'*IL-1 β* , une augmentation significative de la transcription de ce gène a été rapporté dans les cellules BEAS-2B exposées aux PUF des FS, de manière aiguë, aux deux doses testées ($p < 0,01$ et $p < 0,05$), et de manière répétée, uniquement à la plus forte dose ($p < 0,001$). Une augmentation de l'expression génique du *TNF- α* a aussi été observée mais uniquement après exposition aiguë des cellules BEAS-2B à la plus forte dose des PUF des FS, par rapport aux cellules BEAS-2B non exposées ($p < 0,01$). Au contraire, une légère tendance à la réduction de l'expression génique de *TNF- α* a été constatée après exposition répétée des cellules BEAS-2B aux deux doses de PUF de FS testées.

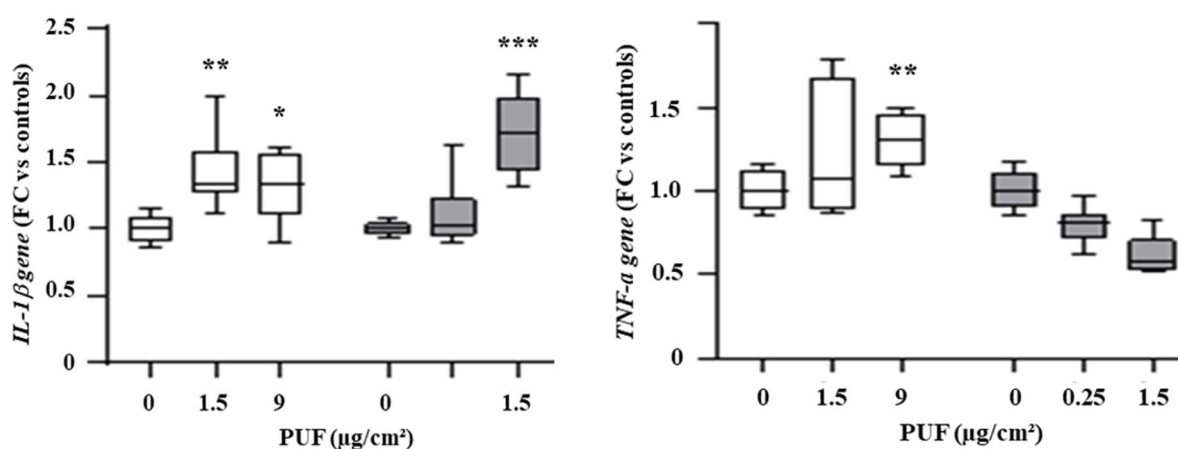


Figure 54 : Expressions géniques de l'Interleukine-1 bêta (*IL-1 β*) et du Tumor Necrosis Factor-alpha (*TNF- α*) dans les cellules BEAS-2B après exposition aux particules ultrafines (PUF) des fumées de soudage. (Test t de Student, versus contrôles, $n = 5$, $* = p < 0,05$, $** = p < 0,01$, et $*** = p < 0,001$)

Au contraire, aucune variation significative de l'expression génique des *IL-6* et *IL-8* n'a été rapportée dans les cellules BEAS-2B quelle que soit leur exposition aux PUF des FS, par rapport aux cellules BEAS-2B non exposées (Figure 55).

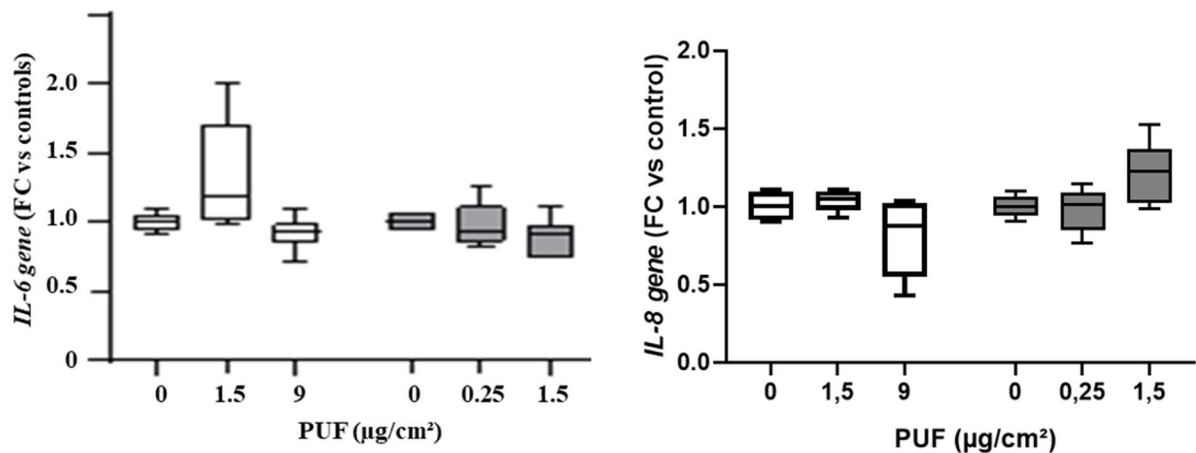


Figure 55: Expressions géniques de l'Interleukine-6 (IL-6) et de l'Interleukine-8 (IL-8) dans les cellules BEAS-2B après exposition aux particules ultrafines (PUF) des fumées de soudage. (Test *t* de Student, versus contrôles, *n* = 5)

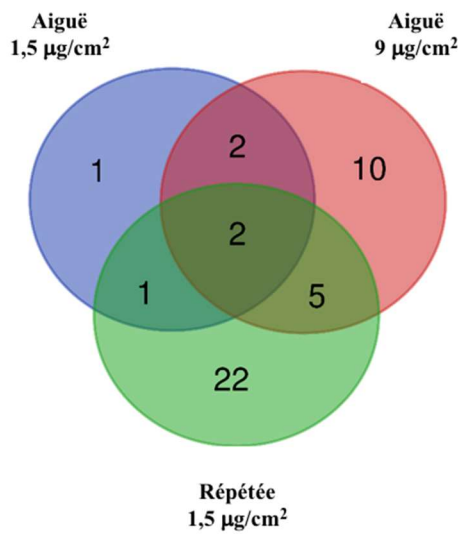
4. Voies de signalisation induites par l'exposition aux PUF des FS

En complément des résultats précédemment acquis dans notre projet de recherche et afin de déterminer plus en avant les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la toxicité des PUF des FS dans les cellules BEAS-2B, un ensemble de Gènes Significativement Dérégulés (GSD), décrits comme des acteurs clés de la régulation des principales voies de signalisation cellulaire, a été étudié. Les Figures 56-A et 56-B montrent les gènes régulés, respectivement sous- et surexprimés, à savoir :

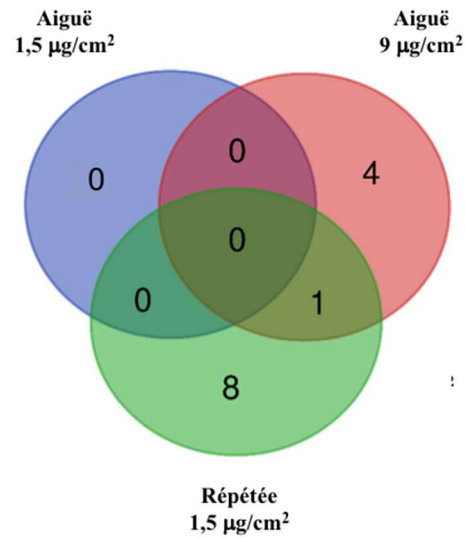
- ▶ 6 GSD, sous-exprimés, ont été signalés dans les cellules BEAS-2B exposées de manière aiguë à la dose la plus faible de PUF des FS.
- ▶ 24 GSD (i.e., 19 sous- et 5 surexprimés) dans les cellules BEAS-2B exposées de manière aiguë à la dose la plus élevée de PUF des FS.
- ▶ 39 GSD (i.e., 30 sous- et 9 surexprimés) dans les cellules BEAS-2B exposées de manière répétée à la dose la plus élevée de PUF des FS.

Comme le montrent les figures 57-A et 57-B, seuls 2 GSD, sous-exprimés, (i.e., *kinase dépendante de la cycline 4 : CDK4* et la *sérine/thréonine-protéine kinase MTOR : MTOR*) ont été rapportés comme communs à toutes les conditions d'exposition des cellules BEAS-2B aux PUF des FS.

A



B



Exposition/Dose (µg/cm ²)	Gènes sous-exprimés	Exposition/Dose (µg/cm ²)	Gènes surexprimés
Aiguë 1,5 µg/cm ² Aiguë 9 µg/cm ² Répétée 1,5 µg/cm ²	<i>CDK4, MTOR</i>	Aiguë 9 µg/cm ² Répétée 1,5 µg/cm ²	<i>PDK1</i>
Aiguë 1,5 µg/cm ² Aiguë 9 µg/cm ²	<i>HSPD1, RHEB</i>	Aiguë 1,5 µg/cm ²	-
Aiguë 1,5 µg/cm ² Répétée 1,5 µg/cm ²	<i>RHEB</i>	Aiguë 9 µg/cm ²	<i>HMOX1, FOSB, MAP4K1, MYC</i>
Aiguë 9 µg/cm ² Répétée 1,5 µg/cm ²	<i>JAK2, HMBS, LEF1, BCL2, PENK</i>	Répétée 1,5 µg/cm ²	<i>FZD8, CCL20, HK2, ENO2, GAPDH, IL8, CSF2, GYS1</i>
Aiguë 1,5 µg/cm ²	<i>SMAD4</i>		
Aiguë 9 µg/cm ²	<i>PP3CA, IKBKG, AREG, MYD88, PPARG, MAP3K7, CASP1, RAS1, TCF7, NCAM1</i>		
Répétée 1,5 µg/cm ²	<i>LPAR2, CCNB1, TLR4, TLR6, MAP4K1, CDKN2A, GALR2, HSPA5, NKD1, CALCRL, IL12A, MAPKAPK3, SCL44A2, KSRI, GATA3, ODC1, WISP3, MEF2C, SOXS2, WNT5B, ADORA1, INHA</i>		

Figure 56 : Gènes significativement sous- (A) et surexprimés (B) dans les cellules BEAS-2B après exposition aux particules ultrafines (PUF) des fumées de soudage (FC < 0,5 ou FC > 2, p < 0,05).

De plus, les gènes codant pour les Heat Shock Protein Family D (Hsp60) Member 1 (HSPD1) et Ras Homolog, MTORC1 Binding (REHB) étaient tous les deux sous-exprimés dans les cellules BEAS-2B exposées de manière aiguë aux deux doses testées de PUF des FS. Seul le gène *REHB* a été sous-exprimé à la dans les cellules BEAS-2B exposées de manière aiguë à la dose la plus faible de PUF des FS et dans les cellules BEAS-2B exposées de manière répétée à la dose la plus élevée de ces mêmes particules. Au moins 6 GSD, 5 sous-exprimés (i.e., *Janus Kinase 2 : JAK2*, *Hydroxyméthylbilane Synthase : HMBS*, *facteur de liaison de l'amplificateur lymphoïde : 1LEF1*, *BCL2 Régulateur de l'apoptose : BCL2*, *Proenkephaline : PENK*) et 1 surexprimé (i.e., *Pyruvate Déshydrogénase Kinase 1 : PDK1*), étaient communs aux cellules BEAS-2B exposées de manière aiguë et de manière répétée à la dose la plus élevée des PUF des FS.

5. Modifications épigénétiques induites par l'exposition aux PUF des FS

a. Acétylation des histones H3K9 et H3K27 induite par les PUF des FS

L'acétylation des histones H3 sur les sites spécifiques K9 et K27, normalisée par rapport à la concentration d'histones H3 totales, a été déterminée dans les cellules BEAS-2B exposées de manière aiguë ou de manière répétée aux PUF des FS, comme le montre la Figure 57. Une diminution significative de l'acétylation des histones H3K9 a été observée après exposition aiguë des cellules BEAS-2B aux deux doses de PUF de FS ($p < 0,01$ et $p < 0,001$). Étonnamment, ces diminutions significatives de l'acétylation des histones H3K9 n'a pas été retrouvée après exposition répétée des cellules BEAS-2B aux PUF de FS, quelle que soit la concentration testée. Concernant les histones H3K27, une diminution significative de leur acétylation a été observée dans les cellules BEAS-2B exposées, de manière aiguë ou surtout de manière répétée, aux PUF des FS, pour l'ensemble des doses testées, par rapport aux cellules BEAS-2B non exposées ($p < 0,05$, $p < 0,01$, et $p < 0,001$).

b. Altérations des activités des HAT et des HDAC induites par les PUF des FS

L'activité des HDAC et des HAT, enzymes respectivement responsables de la désacétylation et de l'acétylation des histones, a été évaluée dans les cellules BEAS-2B suite à leur exposition de manière aiguë ou de manière répétée aux PUF de FS (Figure 58).

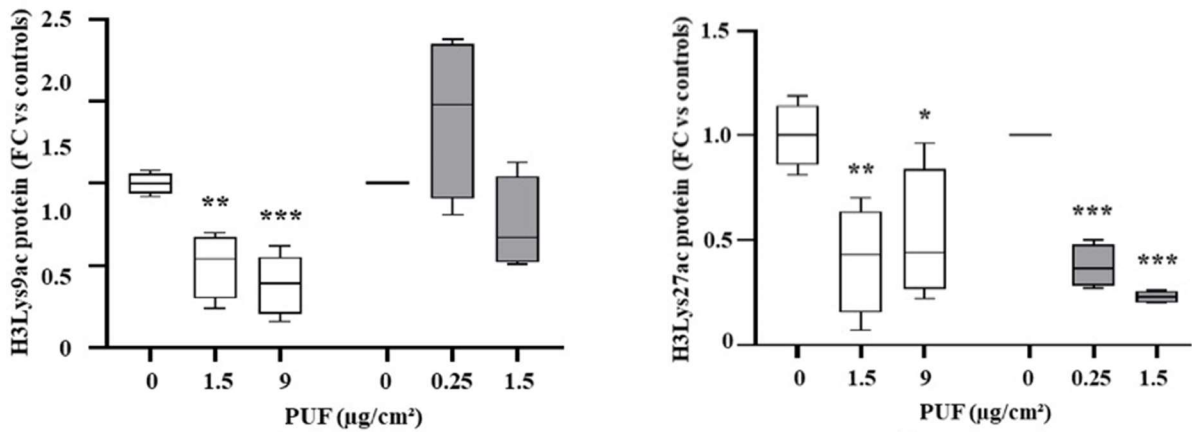


Figure 57: Acétylation des histones H3K9 et H3K27 dans les cellules BEAS-2B après exposition aux particules ultrafines (PUF) des fumées de soudage. (Test t de Student, versus contrôles, $n = 5$, $* = p < 0,05$, $** = p < 0,01$, et $*** = p < 0,001$)

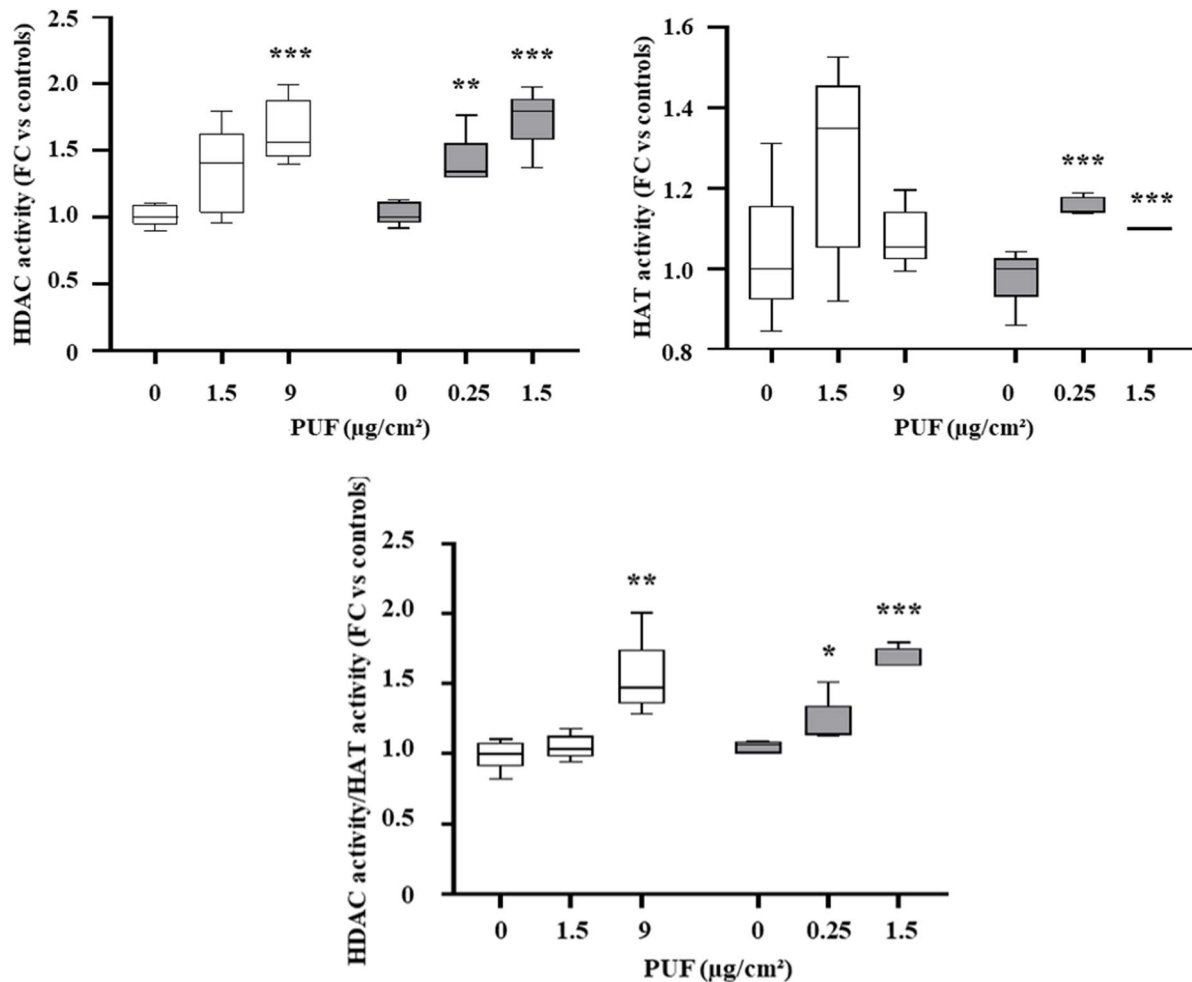


Figure 58 : Activités des Histone Désacétylases (HDAC) et des Histone Acétyltransférases (HAT), et leur ratio, dans les cellules BEAS-2B après exposition aux particules ultrafines (PUF) des fumées de soudage. (Test t de Student, versus contrôles, $n = 5$, $* = p < 0,05$, $** = p < 0,01$, et $*** = p < 0,001$)

Une augmentation significative de l'activité des HDAC a été observée dans les cellules BEAS-2B exposées aux PUF des FS, de manière aiguë, uniquement à la dose la plus élevée ($p < 0,001$), et de manière répétée, aux deux doses testées ($p < 0,01$ et $p < 0,001$). Une augmentation significative de l'activité de l'HAT a aussi été détectée dans les cellules BEAS-2B exposées aux PUF des FS, mais uniquement de de manière répétée, aux deux doses testées, par rapport aux cellules BEAS-2B non exposées ($p < 0,001$). Ces modifications des activités de ces deux enzymes s'est aussi traduit par une augmentation significative du ratio de leurs activités, i.e., HDAC/HAT, dans les cellules BEAS-2B exposées aux PUF des FS, de manière aiguë, uniquement à la dose la plus élevée ($p < 0,01$), et de manière répétée, aux deux doses testées ($p < 0,05$ et $p < 0,001$), ce qui supporterait la déacétylation des histones préalablement décrite après exposition à ces PUF (Figure 57).

c. Méthylation de l'ADN induite par les PUF des FS

Afin de compléter l'étude des modifications épigénétiques induites par l'exposition des cellules BEAS-2B aux PUF des FS, le taux de méthylation globale de l'ADN a été quantifié (Figure 59). Aucune différence significative n'a toutefois été observée quelle que soit l'exposition considérée, par rapport aux cellules BEAS-2B non exposées

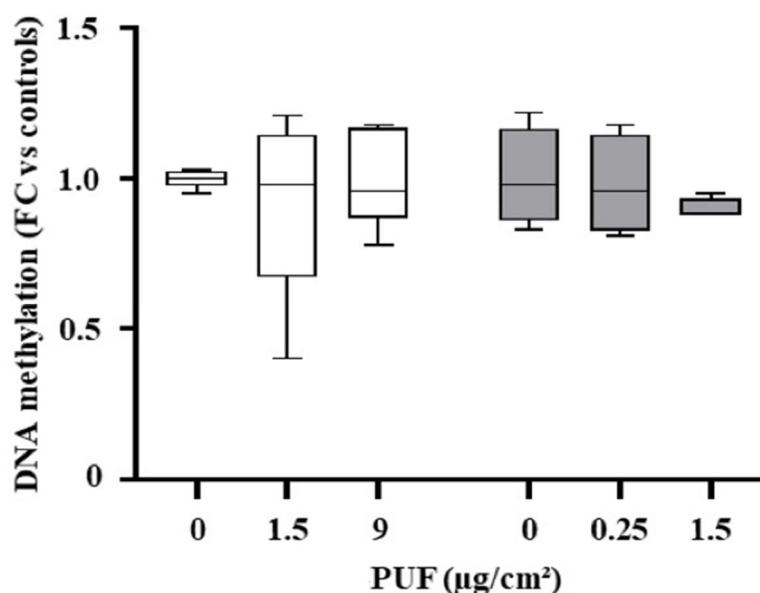
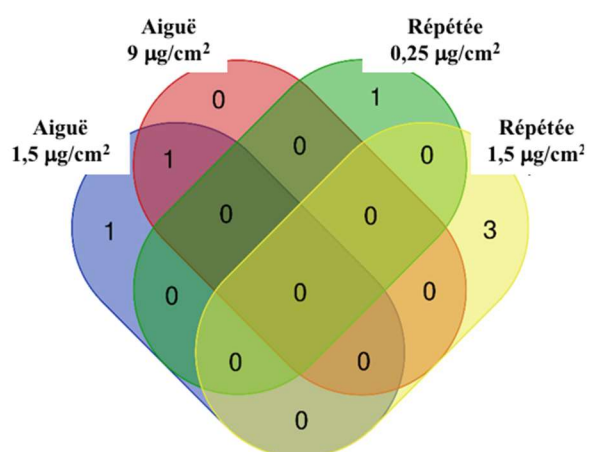


Figure 59 : Taux de méthylation de l'ADN dans les cellules BEAS-2B après exposition aux particules ultrafines (PUF) des fumées de soudage. (Test t de Student, versus contrôles, $n = 5$)

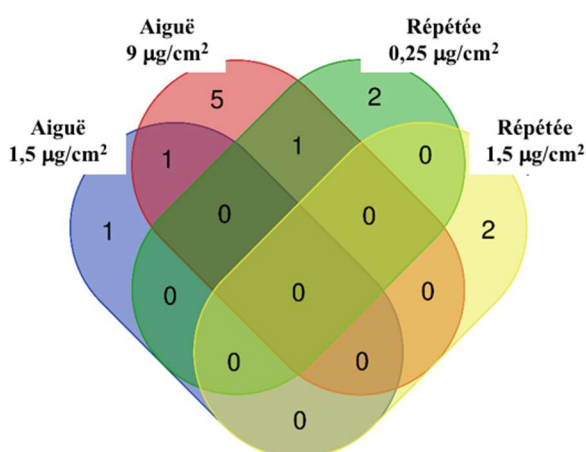
d. Altération des profils de miARN par les PUF des FS

Afin de poursuivre notre compréhension des mécanismes épigénétiques directement impliqués dans la toxicité des PUF des FS des cellules BEAS-2B, les miRNA significativement dérégulés (miRSD) ont été étudiés (Figures 60-A et 60-B).

A



B



Exposition/Dose (µg/cm ²)	miARN sous-exprimé
Aiguë 1,5 µg/cm ² Aiguë 9 µg/cm ²	miR-551b#
Aiguë 1,5 µg/cm ²	miR-92a-3p
Répétée 0,25 µg/cm ²	miR-548-3p
Répétée 1,5 µg/cm ²	miR-1233, miR-339-3p, miR-378a-5p

Exposition/Dose (µg/cm ²)	miARN surexprimé
Aiguë 1,5 µg/cm ² Aiguë 9 µg/cm ²	miR-331-5p
Aiguë 9 µg/cm ² Répétée 0,25 µg/cm ²	miR-210-3p
Aiguë 1,5 µg/cm ²	miR-424-5p
Aiguë 9 µg/cm ²	miR-597-5p, miR-212-3p, miR-1260a, miR-1248, miR-625-5p
Répétée 0,25 µg/cm ²	miR-494-3p, miR-1274b
Répétée 1,5 µg/cm ²	miR-744-3p, miR-766-3p

Figure 60: miRNA significativement sous- (A) et surexprimés (B) dans les cellules BEAS-2B après exposition aux particules ultrafines (PUF) des fumées de soudage (FC < 0,5 ou FC > 2, p < 0,05).

Les Figures 60-A et 60-B montrent les miARN significativement dérégulés (miRSD), respectivement sous- (A) et surexprimés (B), à savoir :

- ▶ 4 miRSD (i.e., 2 sous-exprimés et 2 surexprimés) ont été observés dans les cellules BEAS-2B exposées de manière aiguë à la dose la plus faible des PUF des FS.
- ▶ 7 miRSD (i.e., 1 sous-exprimé et 6 surexprimés) dans les cellules BEAS-2B exposées de manière aiguë à la dose la plus élevée des PUF des FS.
- ▶ 4 miRSD (i.e., 1 sous-exprimé et 3 surexprimés) dans les cellules BEAS-2B exposées à plusieurs reprises à la dose la plus faible des PUF des FS.
- ▶ 5 miRSD (i.e., 3 sous-exprimés et 2 surexprimés) dans les cellules BEAS-2B exposées à plusieurs reprises à la dose la plus élevée des PUF des FS.

Comme le montrent les Figures 60-A et 60-B, seuls 2 miRSD, 1 sous-exprimé et 1 surexprimé, respectivement miR-551b# et miR-331-5p, ont été remarqués comme communs aux cellules BEAS-2B exposées de manière aiguë aux doses les plus faibles ou les plus élevées des PUF. Seul miR-210-3p était surexprimé en même temps dans les cellules BEAS-2B exposées de manière aiguë à la dose la plus élevée de PUF et dans les cellules BEAS-2B exposées de manière répétée à la dose la plus faible de PUF.

6. Interactions miARN et mARN induites par l'exposition aux PUF des FS

Afin de rechercher des relations entre les miRSD et les GSD après exposition aux PUF des FS et ainsi d'identifier des cibles potentielles de miRSD, chaque miARN différentiellement exprimé a été croisé avec la liste des ARNm dérégulés dans les mêmes conditions d'exposition, grâce à des bases de données provenant de 3 algorithmes de prédiction de cibles des miARN : miRDB, TargetScanHuman v7.2 et DIANA TOOLS microT-CDS v5.0. Les résultats obtenus sont présentés sous forme de diagrammes de Venn sur les Figures 61-A à 61-J, et montrent les différents miRSD étudiés : miR-331-5p, miR-210-3p, miR-424-5p, miR-597-5p, miR-212-3p, miR-1260a, miR-1248, miR-625-5p, miR-744-3p et miR-766-3p.

En effet, 19 gènes cibles, uniquement prédits par TargetScanHuman v7.2, ont été retrouvés parmi les GSD rapportés dans des cellules BEAS-2B exposées de manière aiguë ou de manière répétée aux PUF des FS : *Apoptosis Regulator* : *BCL2*, *Janus kinase 2* : *JAK2*, *SMAD Family Member 4* : *SMAD4*, *kinase dépendante de la cycline 4* : *CDK4*, *inhibiteur de la sous-unité régulatrice de la kinase Kappa B du facteur nucléaire Gamma* : *IKBKG*, *activateur de la*

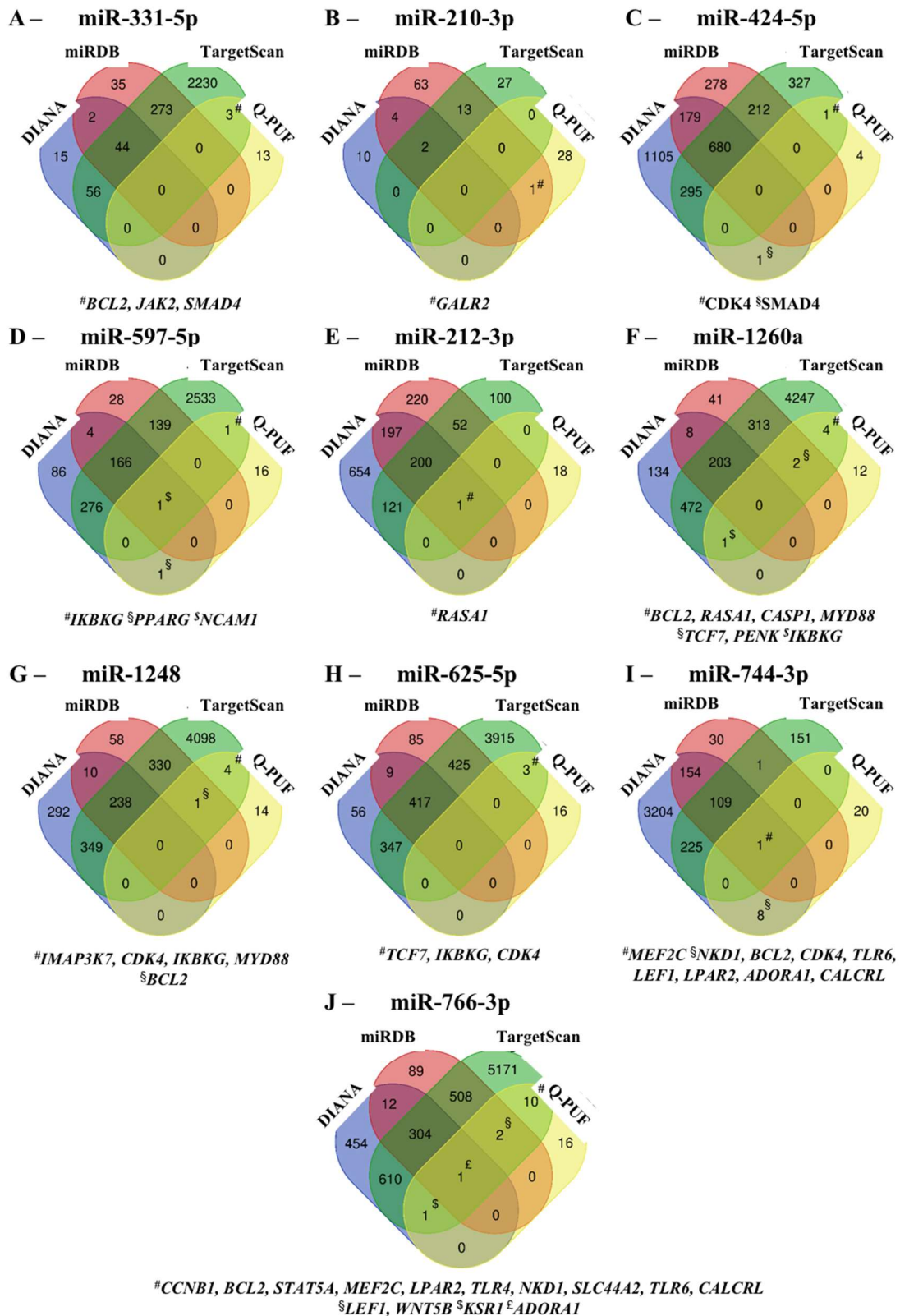


Figure 61 : Gènes cibles prédits par les trois algorithmes de prédiction des cibles (i.e., miRDB, TargetScanHuman v7.2, DIANA TOOLS microT-CDS v5.0) des miARN significativement dérégulés (A à J) dans les cellules BEAS-2B après exposition aux particules ultrafines (PUF) des fumées de soudage.

protéine RAS P21 1 : RASA1, caspase 1 : CASP1, MYD88 Adaptateur de transduction du signal immunitaire inné : MYD88, activé par les mitogènes Protéine Kinase Kinase Kinase 7 : MAP3K7, Facteur de transcription 7 : TCF7, Cycline B1 : CCNB1, Transducteur de signal et activateur de la transcription 5A : STAT5A, Facteur d'amélioration des myocytes 2C : MEF2C, Récepteur d'acide lysophosphatidique 2 : LPAR2, Récepteur Toll Like 4T : LR4, Toll Like Receptor 6T LR6, NKD Inhibiteur de la voie de signalisation WNT 1: NKD1, Solute Carrier Family 44 Member 2: SLC44A2 et Calcitonin Receptor Like Receptor: CALCRL.

Galanin Receptor 2 (GALR2) était le gène cible uniquement prédit par miRDB, également observé parmi les GSD détectés dans les cellules BEAS-2B exposées de manière aiguë et/ou de manière répétée aux PUF des FS.

De plus, 10 gènes cibles, uniquement prédits par DIANA TOOLS Tarbase V8, figuraient parmi les GSD présents dans les cellules BEAS-2B exposées de manière aiguë et/ou de manière répétée à ces PUF : *SMAD Family Member 4 : SMAD4, Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma : PPARG, NKD Inhibiteur de la voie de signalisation WNT 1 : NKD1, Régulateur de l'apoptose : BCL2, kinase dépendante de la cycline 4 : CDK4, Toll Like Receptor 6T LR6, Lymphoid Enhancer Binding Factor 1 : LEF1, Récepteur de l'acide lysophosphatidique 2 : LPAR2, récepteur de l'adénosine A1 : ADORA1 et récepteur semblable au récepteur de la calcitonine : CALCRL.*

Certains gènes cibles également retrouvés parmi les GSD des cellules BEAS-2B exposées de manière aiguë et/ou de manière répétée aux PUF ont été prédits par deux des trois bases de données de prédiction des cibles des miARN :

- ▶ *Facteur de transcription 7 : TCF7, Proenkephalin : PENK, Apoptosis Regulator : BCL2, Lymphoid Enhancer Binding Factor 1 : LEF1, Wnt Family Member 5B : WNT5B* par TargetScanHuman v7.2 et miRDB, d'une part,
- ▶ *Inhibitor Of Nuclear Factor Kappa B Kinase Regulatory Subunit Gamma : IKBKG et Kinase Suppressor Of Ras : KSR1* par TargetScanHuman v7 .2 et DIANA TOOLS Tarbase V8, d'autre part.

Seuls trois gènes cibles, aussi présents parmi les GSD des cellules BEAS-2B exposées de manière aiguë et/ou de manière répétée aux PUF ont été prédits par les trois bases de données de prédiction des cibles des miARN : *Neural Cell Adhesion Molecule 1 : NCAM1, RAS P21 Protein Activator 1 : RASA1, récepteur d'adénosine A1 : ADORA1.*

7. Effets pro-apoptotiques induits par les PUF des FS

Les effets pro-apoptotiques des PUF de FS ont été évalués dans les cellules BEAS-2B non seulement grâce à l'étude, par cytométrie en flux, du marquage par la sonde fluorescente Annexin V-Pacific Blue, mais aussi par la détermination, par luminescence, des activités enzymatiques des caspases 3/7, 8 et 9.

Comme le montre la Figure 62, l'exposition aiguë et répétée des cellules BEAS-2B aux particules de FS, à leurs doses faibles ($p < 0,01$ et $p = 0,05$) et surtout à leurs doses élevées ($p < 0,05$ et $p < 0,001$), a engendré l'entrée d'un nombre significatif de cellules sur la voie de la mort par l'apoptose, par rapport aux cellules non exposées.

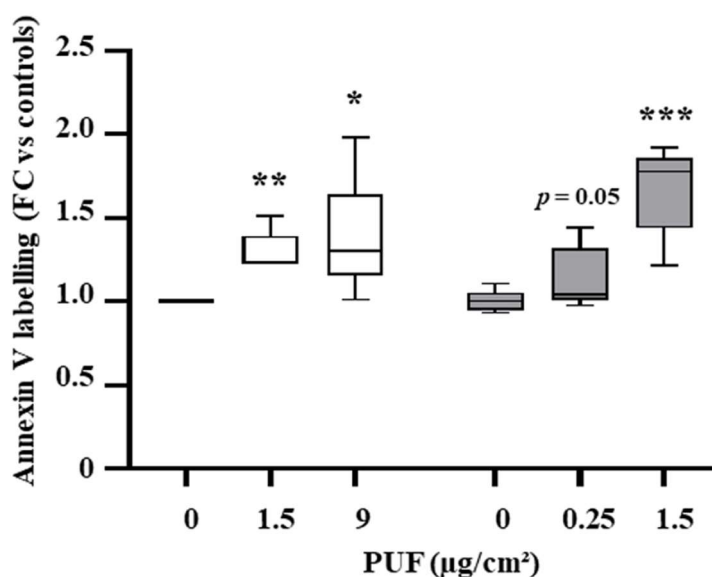


Figure 62 : Effets pro-apoptotiques des particules ultrafines (PUF) des fumées de soudage mesurés par cytométrie en flux dans les cellules BEAS-2B après marquage par l'Annexine V. (Test t de Student, versus contrôles, $n = 5$, $* = p < 0,5$, $** = p < 0,01$, $*** = p < 0,001$)

L'induction de la voie de la mort cellulaire par apoptose par les PUF des FS dans les cellules BEAS-2B a été confirmée par l'activation des caspases 3/7, 8 et 9, comme le montre la Figure 63. L'activation de ces caspases constitue un marqueur précoce de l'instauration des mécanismes des différentes voies de l'apoptose. Les caspases 8 et 9 sont initiatrices de ce phénomène de mort cellulaire régulée, respectivement, par la voie des récepteurs de mort (ou extrinsèque) ou la voie mitochondriale (ou intrinsèque). Elles induisent l'activité des caspases effectrices 3/7 qui jouent un rôle clé dans l'induction des différents processus pro-

apoptotiques. Dans notre travail de recherche, des augmentations significatives des activités des caspases 8, 9, et 3/7 ont été rapportées dans les cellules BEAS-2B exposées aux PUF des FS exposées, de manière aiguë et de manière répétée aux doses les plus élevées, par rapport aux cellules BEAS-2B non exposées ($p < 0,01$ et/ou $p < 0,001$).

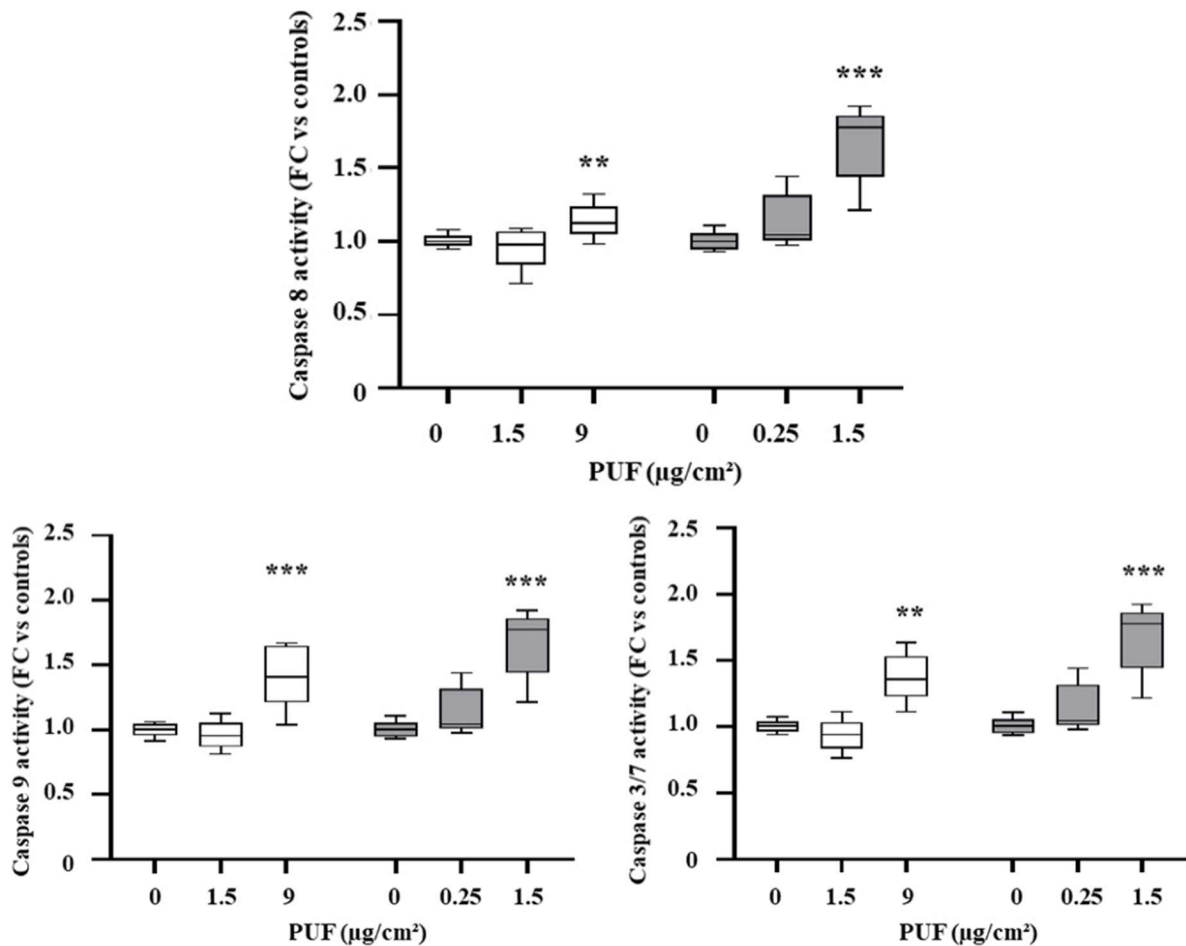


Figure 63 : Activités des caspases initiatrices 8, 9 et effectrices 3/7 dans les cellules BEAS-2B après exposition aux particules ultrafines (PUF) des fumées de soudage. (Test t de Student, versus contrôles, $n = 5$, ** = $p < 0,01$, et *** = $p < 0,001$)

C. Tableau de synthèse des résultats

Caractérisation physico chimique	
Granulométrie	Distribution en nombre monomodale centrée sur 104,4 ± 52,3 nm
Composition	Fe > Cr > Mn > Si > Ni > Mo > Ca
Potentiel Zeta	-13.8 ± 0.3 mV.
Potentiel Oxydant	CM-H2DCFDA: + Statut en glutathion: +

Etude de la toxicité des PUF de FS				
Paramètre d'étude	Exposition Aigüe		Exposition répétée	
	Dose 1	Dose 2	Dose 1	Dose 2
	Cytotoxicité			
Doses d'exposition	1,5	9	0,25	1,5
	Stress oxydant			
CM-H2DCFDA	++	+++	+	++
NRF2		+	++	+++
HMOX	+	+++	+	+
NQO1	+	++	+	+
8-OHdG		+		+
CO-PROT		+		
4-HNE			++	+
	Inflammation			
NFκB		++		++
IL-6, IL-1β, TNF-α (protéines)				
IL-1β (expression génique)	+	+		+
TNF-α (expression génique)		+		
IL-6, IL-8 (expression génique)				
	Voies de signalisation induites			
Gènes surexprimés		+		+
Gènes sousexprimés	+	++		++
	Modifications épigénétiques			
Acétylation H3K9	--	--		
Acétylation H3K9	--	--	--	--
HDAC		++	+	++
HAT			+	+
HDAC/HAT		++	+	++
Méthylation de l'ADN				
	Altération des miARN			
miARN surexprimés	+	+	+	+
miARN sousexprimés	+	++	+	+

CHAPITRE V : DISCUSSION

Dans le monde, d'après les estimations les plus récentes, près de 11 millions de travailleurs exerceraient une activité de soudeur, et 110 millions de travailleurs supplémentaires seraient exposés aux FS dans le cadre de leur travail. Les émissions émises lors du soudage engendrent généralement une exposition à des niveaux élevés de particules fines et/ou ultrafines, formées lors de la combustion nécessaire à ces procédés d'assemblage par fusion des métaux. Parfois, ces travailleurs subissent aussi des co-expositions aux rayonnements UV et aux champs électromagnétiques, et même, dans certains cas, à l'amiante et aux solvants (Guha et al. 2017). En mars 2017, un groupe de travail s'est réuni au Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC) dans le cadre de la réévaluation de la cancérogénicité des FS. En se référant à l'ensemble des éléments alors disponibles dans la littérature scientifique, les experts de ce groupe de travail ont conclu à l'existence « de preuves suffisantes chez l'homme » que l'exposition professionnelle aux FS provoque le cancer du poumon, et ont, par conséquent, classé ces procédés dans le groupe 1, à savoir cancérogène pour l'homme (CIRC, 2017).

Quelques études ont récemment identifié la fraction particulaire des FS comme très fortement impliquée dans les effets néfastes de l'exposition des FS sur la santé humaine (Gliga et al. 2017, McCarrick et al. 2019, Pega et al. 2020). Alors que la fraction fine (i.e., PM_{2.5}) représente la majeure partie en masse des FS, la fraction ultrafine (i.e., PM_{0,1}) correspond, elle, à la plus grande fraction en nombre des FS. Même si les effets délétères consécutifs à l'exposition aux FS ont initialement été attribués à l'inhalation de leurs fractions grossière (i.e., PM₁₀) et fine, depuis quelques années, c'est bien sur la fraction ultrafine qu'une attention toute particulière a été portée (Gliga et al. 2017, Stone et al. 2017). Des éléments de preuves épidémiologiques et toxicologiques ont en effet incriminé les propriétés uniques des PUF, par rapport à celles des particules de plus grandes tailles, et notamment leur déposition pulmonaire plus efficace, leur concentration plus élevée en nombre de particules, et leur surface très importante par unité de masse. Cependant, à ce jour, la toxicité de la fraction ultrafine des FS n'a pas encore été étudiée de manière approfondie. A l'heure actuelle, cette fraction n'est pas non plus intégrée dans les normes et/ou les directives sur la qualité de l'air

applicables aux atmosphères de travail, bien qu'elle participe très probablement à la plupart des effets néfastes de l'exposition aux FS sur la santé humaine (Falcone et al. 2018). La toxicité de la fraction ultrafine des FS requiert donc d'être étudiée plus en avant afin de contribuer à une meilleure évaluation des risques sanitaires liés à l'exposition à ce facteur, en milieu professionnel, et surtout d'instaurer une meilleure prévention auprès des populations de travailleurs.

Les objectifs généraux et spécifiques de notre travail de thèse se sont par conséquent inscrits dans la problématique de l'exposition aux FS en cherchant à contribuer à une meilleure caractérisation physico-chimique de la fraction ultrafine des FS, de même qu'à une meilleure connaissance, dans un modèle de cellules épithéliales bronchiques humaines normales (BEAS-2B), des mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans l'apparition de pathologies respiratoires suite à l'inhalation de la fraction ultrafine des FS.

Les effets sur la santé de l'exposition aux FS sont complexes car la composition chimique des émissions est directement liée au type d'alliage de soudage utilisé (Chang et al. 2013 ; Erdem et al. 2020 ; Falcone et al. 2018 ; Leonard et al., 2010 ; Zheng et al., 2015). Le soudage à l'arc, y compris le procédé de soudage à l'arc sous gaz (GMAW), dans lequel des gaz de protection sont utilisés pour protéger contre l'oxydation, reste le procédé de soudage industriel le plus courant (Antonini et al. 1999, 2014). Cette méthode d'assemblage des métaux génère généralement des niveaux relativement élevés de FS, dont la composition dépend largement de l'utilisation d'une électrode d'acier doux (MS) ou d'acier inoxydable (SS). Les fumées issues des procédés GMAW-MS contiennent principalement du Fe, du Zn et du Mn, alors que celles issues des procédés GMAW-SS contiennent en grande partie du Fe, du Cr, existant également dans les états d'oxydation CrIII et CrVI, du Ni, du Cu et du Mn (Antonini et al. 2014 ; Falcone et al. 2018, Ghanem et al. 2021, Stanislawski et al. 2011).

Dans le cadre de notre travail de thèse, nous nous sommes dans un premier temps intéressé à la génération puis à la caractérisation physique et chimique de la fraction ultrafine des FS. Les FS ont été produites selon le procédé GMAW-SS avec un banc de soudage automatique et les particules ayant des diamètres aérodynamiques équivalents < 250 nm ont été collectés. La distribution monomodale nanométrique en nombre de ces particules était

centrée sur $104,4 \pm 52,3$ nm, conformément aux caractéristiques granulométriques publiées par Kirichenko et al. (2018). Antonini et al. (2017), lors de l'étude de la distribution granulométrique de l'ensemble des particules générées par les activités de soudage, ont observé une distribution multimodale, principalement en raison de l'agglomération de la majorité des particules, initialement de tailles nanométriques, collectées dans la gamme de taille submicronique, et d'une très faible quantité de PUF non agglomérées (< 5 %). En accord avec les précédents résultats publiés par Antonini et al. (2017), Badding et al. (2014), Falcone et al. (2018a, 2018b), Léonard et al. (2010), et McCarrick et al. (2019), la composition métallique des PUF générées par le procédé GMAW-SS et collectées grâce à notre dispositif expérimental, a révélé des concentrations élevées de certains métaux (i.e., $Fe > Cr > Mn > Si > Ni$) et, par conséquent, de leurs oxydes (i.e., $Fe_2O_3 > Cr_2O_3 > MnO > SiO_2 > NiO$). Selon McCarrick et al. (2019), l'utilisation d'acier inoxydable (SS) a engendré des concentrations élevées en CrVI (i.e., $160 \pm 10 \mu g/m^3$), représentant 3 % de la masse totale de Cr. Les caractéristiques physiques et chimiques de la fraction ultrafine des FS émises par le procédé GMAW-SS étaient donc très proches de celles généralement rencontrées en milieu professionnel. En outre, nos résultats ont aussi conforté le fait que les opérations de soudage sont des procédés au cours desquels les travailleurs sont généralement exposés à des niveaux relativement élevés de PUF. Ces travailleurs encourraient par conséquent des risques sanitaires non négligeables en raison de l'inhalation de cette fraction particulaire ultrafine. Dans la suite de notre travail, nous nous sommes par conséquent plus particulièrement intéressés à la détermination des mécanismes cellulaires et moléculaires par lesquels la fraction particulaire ultrafine de ces FS pourrait provoquer des effets délétères dans le compartiment pulmonaire des personnes exposées dans le cadre de leurs activités professionnelles.

Les expositions aux activités de soudage étant quelque peu complexes à caractériser en raison de la diversité des procédés, une majorité de soudeurs utilisant généralement plusieurs procédés tout au long de leur vie, et certains facteurs de confusion (e.g., tabagisme) ou de co-exposition (e.g., rayonnements UV, champs électromagnétiques, amiante, solvants) étant difficiles à intégrer, les associations entre les expositions aux FS et leurs effets néfastes restent difficiles à établir (Falcone et al. 2017 ; Shoeb et al. 2017 ; Zeidler-Erdely et al. 2010, 2019). En particulier, les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la toxicité

voire la cancérogénicité des FS, et plus particulièrement de leur fraction ultrafine, ne sont pas encore totalement élucidés.

Dans notre travail de thèse, notre attention s'est portée dans un deuxième temps sur la capacité de la fraction particulaire ultrafine des FS à induire une cytotoxicité, des réponses pro-oxydantes et/ou pro-inflammatoires, des altérations génétiques et/ou épigénétiques et, par conséquent, une activation de certaines voies de signalisation cellulaire dans un modèle de cellules épithéliales bronchiques humaines normales (BEAS-2B), exposées de manière aiguë ou répétée.

Afin de d'apporter des éléments de réponses à la problématique de notre travail de thèse, plusieurs approches auraient classiquement pu être utilisées : des études humaines en milieu contrôlé ou encore des études expérimentales *in vivo* ou *in vitro*. Ces approches présentent toutes des avantages et des limites mais restent généralement indispensables, du fait de leur complémentarité, à la meilleure connaissance des effets néfastes d'une exposition à un facteur de risque spécifique, présent en environnement général ou professionnel.

Les études en milieu contrôlé, certes très complémentaires des études épidémiologiques, permettent une meilleure caractérisation de l'exposition spécifique afin d'établir des relations de cause à effet et de minimiser l'effet des possibles facteurs confondants et/ou des co-facteurs d'exposition. L'intérêt de ces études repose sur le choix des sujets. Néanmoins, pour des raisons éthiques, les expositions, déjà généralement restreintes en termes de concentration et de temps d'exposition, auraient dû être très limitées dans le cas d'une exposition aux FS, cette dernière ayant été classée dans le groupe 1, à savoir cancérogène pour l'homme, par les experts du groupe de travail du CIRC (CIRC, 2017).

Certes des études expérimentales *in vivo* ont déjà été réalisées afin d'évaluer la toxicité voire la cancérogénicité pulmonaire des FS, mais aucune d'entre-elles ne s'est encore spécifiquement intéressée à la fraction ultrafine des FS (Antonini et al. 2005, 2017 ; Badding et al. 2014 ; Ederly et al. 2011 ; Falcone et al. 2018a, Krishnaraj et al. 2017a, 2017b, Léonard et al. 2010, McCarrick et al. 2019, Leonard et al. 2010). Les études expérimentales *in vivo*, généralement réalisées chez des rongeurs, peuvent compenser certaines des limites relatives aux études menées en milieu contrôlé, notamment en termes de concentrations et de temps d'exposition. L'un des avantages majeurs de l'utilisation des modèles animaux réside dans

leur homogénéité génétique, limitant donc la variabilité interindividuelle, comparativement à celles des sujets des études humaines en milieu contrôlé. Cependant, les conditions d'exposition aux FS doivent être optimisées afin de se rapprocher autant que faire se peut des conditions d'exposition professionnelle, tant dans les modalités de l'exposition que dans les doses réellement administrées. De plus, des différences anatomiques, physiologiques, et génétiques, indéniables, subsistent entre les modèles animaux, le plus souvent des rongeurs, et l'homme, empêchant toute extrapolation dépourvue d'un certain degré d'incertitude.

La stratégie de recherche développée dans la seconde partie de notre travail de thèse a été adossée à l'utilisation d'un modèle de cellules épithéliales bronchiques humaines normales (BEAS-2B), exposées de manière aiguë ou de manière répétée à la fraction particulaire ultrafine des FS issues du procédé GMAW-SS. L'utilisation d'un modèle cellulaire adapté est très importante pour assurer une stratégie de recherche efficace des mécanismes cellulaires et moléculaires de toxicité voire de cancérogénicité de cette fraction des FS, même si, avant toute extrapolation, les résultats ainsi obtenus seront à confirmer par des études réalisées chez l'animal puis en population. Les modèles cellulaires peuvent être utilisés sans limitation d'ordre éthique et ainsi constituer une alternative aux modèles *in vivo*. A ce jour, très peu d'études sur la toxicité des FS, en général, et surtout des PUF des FS, en particulier, ont déjà été réalisées à l'aide de modèles cellulaires. Pourtant, différents modèles de cellules épithéliales bronchiques humaines, de pneumocytes humains, ou encore de macrophages humains ont déjà été développés à cet effet. Certains sont immortels du fait de leur origine cancéreuse (e.g., lignée de cellules A549), d'autres le sont de par des procédés technologiques (e.g., transfection du gène *T* du virus SV40 de la lignée de cellules BEAS-2B), ce qui leur confère néanmoins un phénotype dit normal. Certes les cultures primaires de cellules épithéliales bronchiques humaines, issues de sujets sains ou de patients atteints de certaines affections pulmonaires (e.g., BPCO, asthme, mucoviscidose) constituent des modèles cellulaires très innovants (Leclercq et al. 2016, 2017 ; Sotty et al. 2019). Néanmoins, leurs conditions de culture et surtout de différenciation à l'interface air-liquide restent très exigeantes et nécessitent une validation des épithélia ainsi obtenus par une caractérisation immunocytochimiques. De même, l'hétérogénéité qui résulte de la variabilité interindividuelle des donneurs, sains ou pathologiques, rend ces modèles difficilement utilisables, en première intention, dans notre travail de thèse. Ces modèles de cultures primaires de cellules épithéliales bronchiques humaines, différenciées à l'interface air-liquide,

seraient toutefois très utiles dans la phase de validation des mécanismes cellulaires et moléculaires les plus pertinents.

Néanmoins, une étude comparative des profils d'expression de 380 gènes codant pour des enzymes du métabolisme des xénobiotiques de même que des protéines impliquées dans l'homéostasie redox et la réponse inflammatoire a révélé que la lignée cellulaire BEAS-2B était celle, parmi la dizaine de lignées cellulaires testées (i.e., A549, H292, H358, H460, H727, Calu-1, 16HBE, 1 HAEO, BEAS-2B, L-132), la plus proche des modèles de culture primaire de cellules épithéliales bronchiques humaines (Courcot et al. 2012). La lignée de cellules BEAS-2B a donc été sélectionnée comme le modèle cellulaire à utiliser dans la seconde partie de notre travail de thèse afin d'évaluer la capacité des PUF des FS à induire une cytotoxicité, des réponses pro-oxydantes et/ou pro-inflammatoires, des altérations génétiques et/ou épigénétiques et, par conséquent, une activation de certaines voies de signalisation cellulaire, en réponse à exposition aiguë ou à des expositions répétées.

Afin de déterminer les doses de PUF collectées dans les FS issues du procédé GMAW-SS à appliquer sur le modèle de cellules BEAS-2B selon le protocole d'exposition aiguë ou celui d'exposition répétée, les concentrations intracellulaires en ATP ont été déterminées. A partir de ces résultats, des doses relativement faibles de PUF ont été choisies (i.e., 1,5 et 9 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ pour les expositions aiguës et 0,25 et 1,5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ pour les expositions répétées) afin d'étudier les différents mécanismes cellulaires et moléculaires dans les cellules BEAS-2B. Les doses que nous avons appliquées sur notre modèle cellulaire dans notre travail de thèse étaient parmi les plus faibles rapportées dans la littérature scientifique comme provoquant des effets délétères tout en limitant autant que faire se peut la mort cellulaire (Boublil et al. 2013 ; Gualtieri et al. 2018 ; Leclercq et al. 2016, 2017, 2018 ; Longhin et al. 2019 ; Platel et al.; 2019; Sotty et al. 2019, 2020). En effet, grâce aux concentrations d'ATP déterminées dans les cellules BEAS-2B exposées de manière aiguë ou de manière répétée aux PUF, des doses faibles (i.e., dose létale à 10%, DL10) et modérées (i.e., DL40) de PUF ont été calculées afin de conserver des doses suffisamment efficaces pour déterminer les mécanismes cellulaires et/ou moléculaires de toxicité voire de cancérogénicité, tout en contribuant à l'effort de rester relativement proche des niveaux d'exposition humaine en milieu professionnel. Toutefois, toute extrapolation hâtive de nos résultats à l'homme serait bien sûr à proscrire.

Bien que certaines études expérimentales contrôlées se soient révélées cruciales afin de mieux cerner quel type de FS et lesquels de leurs composants métalliques étaient les plus toxiques et avaient le plus grand potentiel cancérigène, elles n'ont jamais spécifiquement intégré la fraction particulaire ultrafine des FS. Certaines d'entre-elles ont néanmoins suggéré que le stress oxydant, la réponse inflammatoire, et une altération de la réponse immune, étaient des mécanismes très importants (Falcone et al. 2018; Gliga et al. 2017; Grigg et al. 2017; Marongiu et al. 2016; McCarrick et al. 2019; Pega et al. 2020 ; Stanislawska et al. 2020). En effet, le stress oxydant est l'un des mécanismes généralement impliqués dans les effets néfastes sur la santé de la pollution atmosphérique en général et, plus particulièrement, de ses fraction particulaires (Abbas et al. 2010, 2013, 2016, 2019; Badran et al. 2020; Bocchi et al. 2016; Garçon et al. 2006; Gualtieri et al 2010, 2011, Leclercq et al 2016, 2017a, 2018, Longhin et al 2013, 2016, Sotty et al 2019, 2020).

Dans notre travail, l'oxydation du CM-H2DCFDA et celle du glutathion réduit par les PUF, en milieu acellulaire, ont montré que la fraction particulaire ultrafine des FS possédait un potentiel oxydant (PO) relativement important, en comparaison celui d'autres types de particules. Bien entendu, ce résultat était lié à la composition, très riche en métaux (i.e., $Fe > Cr > Mn > Si > Ni$) et en oxydes (i.e. $Fe_2O_3 > Cr_2O_3 > MnO > SiO_2 > NiO$) de ces PUF. Badding et al. (2014) ont expliqué que Fe est le métal majoritairement présent dans les FS issues du procédé GMAW-SS et que les métaux de transition tels que le Fe et le Cr, en plus du Mn, du Ni et du Cu (i.e., 259,8, 129,4, 127,6, 43,2 et 4 ng/g, respectivement, dans les PUF des FS que nous avons étudié) participaient au cycle de réduction/oxydation de Fenton et étaient connus pour participer à la surproduction des ERO. Ghanem et al. (2021) ont récemment rapporté que les métaux de transition présents dans les fractions particulaires des FS issues des procédés GMAW-SS et -MS, principalement composés de Fe, Mn, Zn, Cu, Cr et Ni, en des proportions très diverses, ont montré des solubilités différentes et donc des contributions différentes à leur PO, Mn (II), Cu (II) et Ni (II) étant les contributeurs les plus actifs. Garçon et al. (2001) ont montré le rôle important des oxydes de fer (i.e, Fe_2O_3 et Fe_3O_4) dans la surproduction des ERO dans plusieurs modèles cellulaires et de rongeurs. Léonard et al. (2010) ont de plus démontré que les différentes fractions granulométriques de la fraction particulaire des FS étaient capables d'induire une surproduction des ERO, les particules de plus petites tailles (i.e., 0,032-0,180 μm) montrant la plus grande réactivité et le plus grand PO.

De plus, du fait de leurs compositions spécifiques en métaux, les fractions particulières des FS issues du procédé GMAW-SS avaient une réactivité plus importante, en termes de production des ERO, que celles issues du procédé GMAW-MS. L'ensemble de ces résultats a confirmé le rôle crucial joué par la composition chimique des PUF issues des FS sur la production des ERO en milieu acellulaire, notamment grâce à la présence de Cr et Ni, et d'autres métaux de transition, tels que Fe, Mn, et Cu. La question de la surproduction des ERO en présence des PUF des FS au sein des cellules et tissus pulmonaires, de même que celle des conséquences en termes de dommages oxydatifs des macromolécules cellulaires, sont donc apparues comme très importantes.

Après avoir montré que les PUF des FS générées par le procédé GMAW-SS avaient la capacité de produire des ERO en milieu acellulaire, nous avons donc cherché à évaluer leurs capacités à induire un stress oxydant, c'est-à-dire une surproduction des ERO non compensée par les défenses antioxydantes enzymatiques et non-enzymatiques, dans les cellules BEAS-2B. Nos résultats ont montré que les PUF des FS, étant donné leur PO très important, provoquaient une surproduction de ERO dans les cellules BEAS-2B exposées de manière aiguë ou de manière répétée. L'activation dose-dépendante de la voie de signalisation NRF2, évaluée par l'activité de la capacité de liaison du facteur de transcription NRF2 à l'ADN et par l'expression de deux des gènes dont l'expression est sous la dépendance de ce facteur, *HMOX* et *NQO-1*, a alors été observée dans les cellules BEAS-2B exposées de manière aiguë et, dans une moindre mesure, dans celles exposées de manière répétée. En raison du rôle clé de ce facteur de transcription dans la régulation de l'homéostasie redox cellulaire, la voie de signalisation NRF2 est généralement très rapidement activée en cas de surproduction des ERO afin de contribuer à maintenir une homéostasie redox et ainsi limiter tout dommage aux macromolécules cellulaires (Wardyn et al. 2015). Leclercq et al. (2018) et Sotty et al. (2020) ont préalablement rapporté l'activation de la voie de signalisation NRF2 au sein des cellules BEAS-2B exposées de manière répétée à des particules fines ou ultrafines et ont ainsi supporté le rôle clé joué par ce facteur de transcription pour limiter la surproduction de ERO. Cependant, dans notre étude, malgré l'activation précoce de la voie de signalisation NRF2, des altérations oxydatives massives des macromolécules cellulaires, telles que l'ADN, les protéines et/ou les lipides, ont été observées dans les cellules BEAS-2B après leurs expositions aiguës ou répétées aux PUF de FS. En raison de l'incapacité de la voie de signalisation NRF2 à

empêcher totalement la surproduction de ERO, les défenses anti-oxydantes sous la dépendance du facteur de transcription NRF2, non spécifiquement protégées contre les effets délétères des ERO, ont été dépassées dans les cellules BEAS-2B exposées de manière aiguë et/ou de manière répétée. Les dommages oxydatifs à l'ADN, aux protéines et/ou aux lipides peuvent perturber l'homéostasie cellulaire, contribuant ainsi à la dérégulation de l'expression de certains gènes cibles, à l'apparition de mutations géniques, à l'altération des protéines avec perte partielle ou totale de leurs activités et/ou fonctions, et à la peroxydation lipidique des acides gras des phospholipides membranaires polyinsaturés avec perte d'intégrité et/ou de fluidité membranaires (Abbas et al. 2019 ; Badran et al. 2020 ; Garçon et al., 2006 ; Gualtieri et al. 2010, 2011 ; Leclercq et al. 2016, 2017a, 2018 ; Longhin et al. 2013, 2016 ; Sotty et al. 2020). En accord avec nos résultats, Grazyk et al. (2016) ont indiqué que, 3 h après l'exposition à court terme à des FS issues du procédé GMAW-SS dans des environnements pourtant contrôlés et bien ventilés, une surproduction d'ERO (i.e., H₂O₂) et de lésions oxydatives (i.e., 8-OHdG) avaient été observées chez des travailleurs en bonne santé, non-fumeurs et non régulièrement exposés aux FS. Étant donné que les dommages oxydatifs à l'ADN, tels que le 8-OHdG, ont été rapportés non seulement dans des modèles expérimentaux, comme dans notre travail, mais aussi chez des travailleurs exerçant des activités de soudage, d'autres altérations génétiques pourraient aussi être provoquées par l'exposition aux FS. Certains auteurs ont en effet déjà supporté la capacité des FS issues du procédé GMAW-MS et, dans une plus large mesure, du procédé GMAW-SS à produire des cassures double brin de l'ADN, et ont incriminé les niveaux élevés de CrVI, Ni et Mn généralement détectés (Badding et al. 2014 ; Leonard et al. 2010, McCarrick et al. 2019). De plus, Antonini et al. (2005) ont montré que le CrVI dans les FS générées par le procédé GMAW-SS induisaient des dommages à l'ADN, similaires à ce qu'ils ont observés lors de l'utilisation d'un sel de Cr soluble, probablement en raison de la formation de radicaux hydroxyles. Les résultats de notre travail de recherche, en accord avec ceux de la littérature, supportent donc la capacité de la fraction ultrafine des FS issues du procédé GMAW-SS à générer des ERO, dans des systèmes acellulaires et cellulaires, ce qui provoque, en dépit de l'activation de la voie de signalisation NRF2, des altérations oxydatives aux macromolécules cellulaires, certaines pouvant être impliquées dans des mécanismes de génotoxicité voire de cancérogénicité. En outre, les ERO sont aussi décrites comme des médiateurs importants dans l'activation de certaines voies de signalisation,

comme celle du NF- κ B, étroitement impliquée dans le développement d'une réponse inflammatoire (Leclercq et al. 2018 ; Sotty et al. 2019).

Afin de maintenir l'homéostasie cellulaire, les voies de signalisation NRF2 et NF- κ B, qui contrôlent respectivement les réponses cellulaires au stress oxydant et à l'inflammation, doivent interagir intimement grâce à des mécanismes moléculaires, différents en fonction des caractéristiques des cellules et des tissus des différents organes (Wardyn et al. 2015). Les pathologies pulmonaires d'origine environnementale ou professionnelle ayant généralement, en plus d'une homéostasie redox perturbée, une très forte composante inflammatoire, nous sommes donc attachés dans la suite de notre travail à l'étude de l'activation de la voie de signalisation NF- κ B et à la sécrétion de médiateurs de l'inflammation par les cellules BEAS-2B exposées à la fraction particulaire ultrafine des FS. Cependant, dans ce travail, malgré l'augmentation significative de l'activation de la voie de signalisation NRF2 et la surproduction d'ERO, seule une activation significative de la voie de signalisation NF- κ B a été détectée dans les cellules BEAS-2B exposées de manière aiguë ou de manière répétée à la plus forte dose des PUF des FS. Bien qu'une très légère induction de l'expression génique de certains médiateurs inflammatoires, le TNF- α et de l'IL-1 β , ait été observée dans les cellules BEAS-2B exposées de manière aiguë ou de manière répétée à la dose la plus élevée de PUF, aucune sécrétion significative de ces deux médiateurs, ou encore des autres médiateurs pro-inflammatoires étudiés dans le cadre de notre étude (i.e., RANTES, GM-CSF, GRO- α , IL-6, IL-8 et MCP-1), n'a été mesurée. Malgré nos efforts, en utilisant plusieurs méthodes analytiques (i.e., Luminex[®] et Meso Scale Discovery[®]) pour quantifier la sécrétion de l'ensemble de ces médiateurs inflammatoires dans les surnageants de culture des cellules BEAS-2B, aucune variation significative des concentrations protéiques de ces marqueurs de l'inflammation n'a été détectée dans les cellules BEAS-2B exposées aux PUF des FS. La très faible réponse inflammatoire observée dans notre étude en réponse à l'exposition des cellules BEAS-2B aux PUF des FS, bien qu'assez surprenante, pourrait être reliée à l'activation du facteur de transcription NRF2, impliqué dans la réponse anti-inflammatoire (Wardyn et al. 2015). Par ailleurs, fait très intéressant, d'autres auteurs, ayant déjà été confrontés à des résultats similaires dans des modèles de cellules ou de rongeurs exposés à des PUF ou des nanomatériaux, ont incriminé certaines interactions entre les particules nanométriques et les

protéines de l'inflammation, créant ainsi des artefacts lors de la mesure de leurs concentrations dans les matrices biologiques (Brown et al. 2010 ; Saleh et al. 2019 ; Veranth et al. 2007). Dans la littérature, Badding et al. (2014), testant l'hypothèse selon laquelle certains médiateurs inflammatoires pourraient être produits par des cellules macrophagiques RAW 264.7 24 h après leur exposition aux FS issues du procédé GMAW-SS, ont remarqué des augmentations mais non significatives des sécrétions de certaines cytokines, le TNF- α et l'IL-6, supportant ainsi la capacité très limitée des FS à induire la sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires dans différents modèles cellulaires, y compris ceux macrophagiques. En revanche, d'autres auteurs évaluant le pouvoir pro-inflammatoire de la fraction particulaire des FS par le biais d'expérimentations animales, ont observé des changements transitoires mais significatifs en faveur du développement d'une inflammation pulmonaire, comme le montrent les nombres accrus de cellules totales et/ou de neutrophiles dans le LBA et la sécrétion significative de certaines cytokines et/ou chimiokines pro-inflammatoires dont le TNF- α (Antonini et al. 2017 ; Ederly et al. 2011 ; Falcone et al. 2018a). De plus, Krishnaraj et al. (2017a, 2017b), étudiant l'effet des FS chez le rat, sans toutefois porter une attention spécifique à la fraction particulaire ultrafine de ces dernières, ont remarqué des niveaux accrus d'ERO dans les tissus pulmonaires, associés à l'accumulation de 8-OHdG et, en même temps, à l'activation des voies de signalisation NRF2 et NF κ B, résultant en une sécrétion importante de certains médiateurs pro-inflammatoires. De plus, Jarvela et al. (2012), dans leur étude cherchant à évaluer chez l'homme les conséquences de l'exposition professionnelle au FS générées par le procédé GMAW-MS, ont remarqué, en fin de poste, une légère inflammation chez les métallurgistes, objectivée par des altérations de leurs formulations-numérations sanguines, avec notamment des nombres élevés de leucocytes et des neutrophiles, de même que de la sécrétion significative d'IL-1 β et d'E-sélectine, sans toutefois observer de quelconques changements de la fonction pulmonaire par des tests spirométriques.

Afin de poursuivre le décryptage des mécanismes cellulaires et moléculaires responsables de la toxicité de la fraction particulaire ultrafine des FS, les GSD décrits comme impliqués dans l'activation de certaines voies de signalisation ont été identifiés dans les cellules BEAS-2B exposées de manière aiguë et de manière répétée. Dans notre modèle cellulaire, 6 GSD (i.e., 6 gènes sous-exprimés) ont été observés après l'exposition aiguë à la

dose la plus faible de PUF, et 24 GSD (i.e., 19 gènes sous-exprimés et 5 gènes surexprimés) après l'exposition aiguë à la dose la plus élevée de PUF. De plus, 39 DRG (i.e., 30 gènes sous-exprimés et 9 gènes surexprimés) ont été détectés dans les cellules BEAS-2B exposées de manière répétée à la dose la plus élevée de PUF, supportant ainsi leurs effets plus marqués. Il est à noter que 2 GSD (i.e., *kinase dépendante de la cycline 4 : CDK4* et *sérine/thréonine-protéine kinase MTOR : MTOR*), généralement décrits comme étant étroitement impliqués dans la régulation du cycle cellulaire, ont été retrouvés dérégulés quelles que soient les expositions (Guo et al. 2021). De plus, les 6 GSD, 5 gènes sous-exprimés (i.e., *Janus Kinase 2 : JAK2*, *Hydroxymethylbilane Synthase : HMBS*, *facteur de liaison de l'amplificateur lymphoïde : 1LEF1*, *BCL2 Apoptosis Regulator : BCL2*, *Proenkephalin : PENK*) et 1 gène surexprimé (*Pyruvate Déshydrogénase Kinase 1 : PDK1*), communs aux cellules BEAS-2B exposées de manière aiguë et de manière répétée à la dose la plus élevée de PUF, ont montré l'altération de certains régulateurs clés du cycle cellulaire, généralement membres des voies de signalisation anti-apoptotiques (Tandawy et al. 2020, Yildirim et al 2021, Tungskruthai et al 2021). Zeilder-Ederly et al. (2010) ont également vu des différences dans plusieurs voies de signalisation impliquant certains de ces GSD par les FS. Toutefois, ces mêmes auteurs ont rapporté une certaine variabilité en fonction des souches de souris utilisées dans leurs protocoles d'exposition : l'expression des gènes était plus dérégulée dans la souche de souris A/J, plus sensible, et l'exposition aux FS émises par le procédé GMAW-SS était associée à une surexpression de plusieurs gènes décrits comme immunomodulateurs. En accord avec certains de nos précédents résultats, Erdely et al. (2011) ont rapporté que certains de ces GSD étaient étroitement impliqués dans l'inflammation (i.e., $TNF-\alpha$, $IL1-\beta$), le stress (i.e., HMOX, NQO1), la coagulation, l'adhésion et les facteurs de remodelage/croissance chez les souris exposées au FS, mais avec toutefois des différences notables entre les GSD induits par les FS issues du procédé GMAW-SS en comparaison de ceux ou GMAW-MS. De plus, Falcone et al. (2018a) ont montré que l'exposition de souris aux FS émises par le procédé GMAW-SS a provoqué les mêmes modifications que celles décrites par Zeilder-Ederly et al. (2010) et Erdely et al. (2011), et ont de plus rapporté les mêmes différences dans la typologie des réponses oxydatives et inflammatoires selon le type de FS. Ah et al. (2011), ayant exposé des rats aux FS émises par le procédé MMA-SS, ont également rapporté des profils de GSD liés aux processus d'inflammation et de réparation, fréquemment dérégulés dans des pathologies respiratoires à composante environnementale ou professionnelle. Une autre étude a décrit

que l'exposition aux FS issues du procédé GMAW-SS a induit 37 GSD codant pour les systèmes de réparation des dommages à l'ADN, l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1/S, et l'apoptose médiée par les caspases dans les poumons de rat (Krishnaraj et al. 2017a, 2017b). En accord avec l'ensemble des données de la littérature, nos résultats supportent donc que l'exposition à la fraction ultrafine des FS issues du procédé GMAW-SS ont dérégulées certaines voies de signalisation en relation non seulement avec les statuts redox et inflammatoires de notre modèle cellulaire mais aussi avec la régulation de son cycle cellulaire. Récemment, des arguments ont été avancés en faveur d'une régulation de certains de ces mécanismes cellulaires et moléculaires par des modifications épigénétiques (Leclercq et al. 2017).

En effet, certaines études ont récemment indiqué que des altérations critiques de l'épigénome pouvaient se produire après une exposition aux particules fines et/ou ultrafines dérivées de la pollution atmosphérique et, par là même, conduire à un grave dérèglement de l'expression de certains gènes dans des modèles de cellules pulmonaires humaines (Leclercq et al. 2017a; Sotty et al. 2019). Par conséquent, une meilleure connaissance de ces changements épigénétiques pourrait fournir des éléments supplémentaires pour mieux étudier l'association entre l'exposition aux PUF des FS et le développement et/ou l'exacerbation des maladies pulmonaires inflammatoires chroniques, y compris les cancers. Cependant, dans notre travail, aucun changement significatif de la méthylation globale de l'ADN n'a été observé dans les cellules BEAS-2B après toute exposition aux PUF des FS. Shoeb et al. (2017), essayant d'identifier des biomarqueurs potentiels de changements épigénétiques dans des cellules mononucléées isolées du sang périphérique de modèles animaux après leur exposition aux FS, issues de différents procédés, y compris GMAW-MS et MMA-SS, ont rapporté des résultats similaires aux nôtres. En ce qui concerne l'histone H3, la désacétylation significative de l'histone H3 sur les Lys 9 et Lys 27 dans les cellules BEAS-2 B exposées de manière aiguë aux deux doses de PUF, mais uniquement sur la Lys 27 dans celles exposées de manière répétée aux deux doses de PUF, étaient cohérentes avec les variations d'activités des deux enzymes, la DHAC et la HAT. Cependant, à notre connaissance, très peu de données sont actuellement disponibles dans la littérature scientifique sur les modifications post-traductionnelles de l'histone H3 en réponse à une exposition aux FS. Toutefois, l'acétylation et la désacétylation des histones pourrait être étroitement liée au

développement et à l'exacerbation de maladies pulmonaires inflammatoires chroniques, voire de cancers (Li et al. 2015).

Au travers de leurs travaux respectifs sur les altérations épigénétiques en relation avec des stress environnementaux et/ou professionnels, Jardim et al. (2011) et Vrijens et al. (2015) ont très vivement suggéré d'investiguer avec une attention toute particulière les miARN. En effet, les miARN étant décrits comme des régulateurs de très nombreuses voies de signalisation cellulaire et pouvant cibler jusqu'à plusieurs centaines d'ARNm, l'étude de leur expression aberrante de même que la prédiction par différents outils bioinformatiques de leurs interactions avec les GSD préalablement identifiés nous est apparu être une stratégie très pertinente (Acunzo et al. 2015). Dans notre travail, pour toutes les expositions aux PUF de FS, le nombre de miRSD observés dans les BEAS-2B est resté relativement faible, allant de 4 à 7. Parmi eux, seuls 2 miRSD, l'un sous-exprimé et l'autre surexprimé (i.e. miR-551b# et miR-331-5p, respectivement) ont été rapportés comme significativement dérégulés dans les cellules BEAS-2B exposées de manière aiguë aux doses les plus faibles ou les plus élevées de PUF. Un seul (i.e., miR-210-3p) était surexprimé en même temps dans des cellules BEAS-2B exposées de manière aiguë à la dose la plus élevée de PUF et de manière répétée à la dose la plus faible de PUF. Xu et al. (2014) ont découvert que la surexpression du miR-551b# dans les cellules résistantes à l'apoptose inhibait l'expression d'enzymes antioxydantes et potentialisait l'accumulation de ERO et l'expression de certaines mucines. Aucune information n'est actuellement disponible sur le rôle du miR-331-5p dans les cellules pulmonaires. En revanche Ren et al. (2019), étudiant et comparant l'expression du miR-210-3p dans différentes lignées de cellules de cancer du poumon non à petites cellules (NSCLC) et dans la lignée cellulaire BEAS-2B, ont indiqué que ce miR peut réguler la prolifération et l'apoptose en ciblant le membre A de la famille des régulateurs de transcription. Cependant, comme le soulignent Jardim et al. (2011) et Vrijens et al. (2015), bien que les changements de miARN puissent être des indicateurs sensibles des effets à courts ou à plus longs termes d'une exposition à des stress environnementaux ou professionnels, comme l'exposition aux PUF des FS, d'autres études devraient encore être menées pour élucider de manière plus approfondie le rôle des miARN dans les réponses cellulaires et moléculaires observées.

Dans notre travail, afin de contribuer à la recherche de ces nouveaux éléments, une analyse fonctionnelle des miRSD observés dans les BEAS-2B exposées de manière aiguë ou répétée aux PUF des FS a été réalisée *in silico* à l'aide de trois bases de données de prédiction des gènes cibles des miARN (i.e., TargetScanHuman v7.2, miRDB et DIANA TOOLS Tarbase V8). En accord avec les GSD préalablement identifiés dans notre étude, nos résultats ont indiqué la dérégulation de certaines voies de signalisation impliquées dans l'inflammation cellulaire (i.e., *IKBKG*, *NCAM1*, *MYD88*, *TCF7*, *TLR4*, *TLR6*, *LPAR2* et *CALCRL*), et, avec une prédiction encore plus fiable, la dérégulation du cycle cellulaire (i.e., *BCL2*, *JAK2*, *SMAD4*, *RASA1*, *CASP1*, *CCND1*, *ADORA1*, *STAT5*, *KSR1*, *MEF2C*, *NKD1* et *WNT5B*). Certains des miRSD et GSD cibles identifiés dans notre travail étant étroitement impliqués dans la régulation du cycle cellulaire et, en particulier, dans l'entrée des cellules sur la voie de l'apoptose, cette forme de mort cellulaire a été spécifiquement étudiée afin de valider nos observations. Le marquage à l'annexine V ainsi que l'activation des caspases initiatrices 8 et 9 et des caspases effectrices 3 et 7 dans les cellules BEAS-2B, quelle que soit leur exposition aux PUF des FS, ont révélé l'activation de cette forme de mort cellulaire régulée. En accord avec nos résultats, Antonini et al. (2005) à l'aide d'un modèle animal, ont observé une augmentation en fonction du temps du nombre de cellules apoptotiques dans les espaces aériens pulmonaires et le parenchyme en réponse à une instillation intratrachéale des particules des FS issues de procédé MMA-SS. De plus, Krishnaraj et al. (2017a, 2017b) ont montré que, après 12 semaines d'exposition aux FS émises par le procédé GMAW-SS, le système de réparation des dommages à l'ADN initialement activé était dépassé, comme en témoignent la reprise du cycle cellulaire, l'inhibition de la réparation des lésions à l'ADN et l'induction de la machinerie apoptotique. Leurs résultats ont clairement démontré que l'exposition aux FS altèrent la régulation des systèmes de réparation des dommages à l'ADN à deux niveaux, la phosphorylation des protéines clés dans la jonction terminale non homologue (NHEJ) et la recombinaison homologue (HR), sans toutefois discriminer spécifiquement le rôle joué par la fraction ultrafine des FS. De plus, ces auteurs ont aussi suggéré que les ARN non codants modulaient par des mécanismes épigénétiques les systèmes de réparation des dommages à l'ADN, permettant ainsi l'apparition concomitante de graves dommages à l'ADN et une réparation non efficace de l'ADN, certes compensées par une activation de l'apoptose. Toutefois, en cas de conditions très délétères et d'un dépassement de cette mort cellulaire programmée, ces modifications pourraient alors contribuer à la transformation néoplasique. Par conséquent,

en accord avec la littérature scientifique, les altérations épigénétiques observées dans le cadre de notre travail, et plus particulièrement les modifications de certains miARN cibles, supportent, en plus de l'activation de voies de signalisation de la réponse inflammatoire, l'apparition d'une mort par apoptose des cellules BEAS-2B suite à l'exposition à la fraction ultrafine des FS issues du procédé GMAW-SS. Toutefois, dans des conditions très délétères, un évitement de l'apoptose pourrait aboutir à des mécanismes de prolifération cellulaire voire une transformation néoplasique.

CHAPITRE VI : CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Notre travail de thèse, pluridisciplinaire, adossé à la problématique de l'exposition professionnelle aux PUF des FS, cherchait non seulement à accroître l'état des connaissances sur la caractérisation physico-chimique de la fraction particulaire ultrafine des FS, mais aussi à déterminer les mécanismes cellulaires et moléculaires spécifiquement impliqués dans la toxicité de cette fraction des FS grâce à un modèle de cellules épithéliales bronchiques humaines normales (BEAS-2B) exposées de manière aiguë et répétée.

Afin de mener à bien notre travail de recherche, un protocole original de génération de FS à partir du procédé GMAW-SS couplé à une méthode très efficace de prélèvement de la fraction particulaire, et plus particulièrement de la fraction particulaire ultrafine, de ces dernières a été développé. Les caractéristiques physiques et chimiques des PUF de ces FS ont confirmé qu'elles étaient bien représentatives de celles générées en situations professionnelles par ce même procédé de soudage. Nos résultats ont clairement démontré, pour la première fois, dans un modèle de cellules épithéliales bronchiques humaines, la lignée de cellules BEAS-2B, le rôle crucial joué dans la surproduction de ERO par la fraction ultrafine des FS issues du procédé GMAW-SS, très riche en métaux tels que le Fe et le Cr, en plus du Mn, du Ni et du Cu. En outre, en dépit de l'activation de la voie de signalisation NRF2, impliquée dans le maintien des statuts redox et inflammatoire des cellules, des dommages oxydatifs massifs, une inflammation certes très limitée, mais surtout une altération génétique et épigénétique, étroitement reliée à l'activation de certaines voies de signalisation ont été observées. En particulier, les interactions entre certains miRSD et GSD cibles ont non seulement suggéré le développement d'une réponse inflammatoire mais surtout indiqué l'apparition d'un phénomène de mort cellulaire apoptose des cellules les plus endommagées, de même qu'un échappement possible à cette forme de mort cellulaire régulée au profit d'une prolifération des cellules résiduelles.

Afin d'approfondir les résultats très intéressants de notre travail de thèse sur la caractérisation physico-chimique de la fraction particulaire ultrafine des FS issues du procédé GMAW-SS et sur les mécanismes cellulaires et moléculaires spécifiquement impliqués dans la

toxicité de cette fraction dans un modèle de cellules épithéliales bronchiques humaines normales (BEAS-2B, plusieurs approches complémentaires pourraient être développées.

A court terme, la validation à l'échelle protéique des différentes voies de signalisation prédites comme activées par les interactions miARN/mARN pourrait être poursuivie, avec un regard particulier sur les différents mécanismes de mort régulée des cellules (e.g., necroptose, ferroptose) et de l'activation compensatrice de la prolifération cellulaire.

De plus, nos résultats pourraient être validés dans des modèles cellulaires plus prédictifs, tels que des cultures primaires de cellules épithéliales bronchiques humaines issues de sujets sains ou de patients atteints d'affections respiratoires (e.g., asthme, BPCO), différenciées à l'interface air-liquide, et exposées aux PUF de FS pendant une plus longue durée, ces modèles pouvant être maintenus en culture durant plusieurs semaines à plusieurs mois. De même, une validation dans des modèles de co-culture, incluant ces mêmes cultures primaires de cellules épithéliales bronchiques humaines, différenciées à l'interface air-liquide, et des cultures primaires de fibroblastes humains, pourraient être utilisées. L'utilisation de modèle de co-culture permettrait d'inclure une réponse médiée par les fibroblastes, cellules très impliquées dans le remodelage tissulaire dans un contexte de pathologies inflammatoires chroniques. A noter que l'utilisation de modèles cellulaires différenciés à l'interface air-liquide, en plus d'être plus réaliste en termes d'exposition, offriraient la possibilité d'un couplage directe avec les FS, ou leurs différentes fractions gazeuses et/ou particulaires juste après leurs générations.

A moyen terme, une étude sur un modèle animal, lui aussi exposé, par inhalation corps-entier ou nose-only, aux FS ou à leurs différentes fractions gazeuses et/ou particulaires juste après leurs générations permettrait, en plus d'une exposition plus réaliste, d'appliquer nos approches toxicologiques sur différents organes cibles, certes les poumons mais aussi le système cardiovasculaire et le système nerveux central, cibles déjà bien décrites des polluants atmosphériques. Grâce à l'utilisation d'un modèle animal, des altérations de profils des miARN circulants, possibles reflets de celles organo-spécifiques de certains miARN, seraient peut-être identifiées, ce qui ouvrirait des perspectives en termes d'identification de nouveaux marqueurs circulants d'exposition ou d'effets aux FS, possiblement applicables chez l'homme afin de compléter la surveillance professionnelle spécifique des travailleurs exposés aux FS.

Enfin, les stratégies de recherche *in vitro* et *in vivo* ainsi développées pourraient être appliquées à des FS issues d'autres procédés de soudage, ce qui permettrait de mieux

discriminer leurs toxicités intrinsèques et contribuerait ainsi à renforcer l'évaluation des risques sanitaires inhérents à chacun d'entre-deux, et, par conséquent, les mesures de prévention en milieu professionnel.

BIBLIOGRAPHIE

- Abbas I, Garçon G, Saint-Georges F, Billet S, Verdin A, Gosset P, Mulliez P, Shirali P. Occurrence of molecular abnormalities of cell cycle in L132 cells after in vitro short-term exposure to air pollution PM(2.5). *Chem Biol Interact.* 2010 Dec 5;188(3):558-65. doi: 10.1016/j.cbi.2010.09.014. Epub 2010 Sep 17. PMID: 20850422.
- Abbas I, Garçon G, Saint-Georges F, Andre V, Gosset P, Billet S, Goff JL, Verdin A, Mulliez P, Sichel F, Shirali P. Polycyclic aromatic hydrocarbons within airborne particulate matter (PM(2.5)) produced DNA bulky stable adducts in a human lung cell coculture model. *J Appl Toxicol.* 2013 Feb;33(2):109-19. doi: 10.1002/jat.1722. Epub 2011 Sep 13. PMID: 21913209.
- Abbas I, Verdin A, Escande F, Saint-Georges F, Cazier F, Mulliez P, Courcot D, Shirali P, Gosset P, Garçon G. In vitro short-term exposure to air pollution PM2.5-0.3 induced cell cycle alterations and genetic instability in a human lung cell coculture model. *Environ Res.* 2016 May;147:146-58. doi: 10.1016/j.envres.2016.01.041. Epub 2016 Feb 11. PMID: 26874047.
- Abbas I, Badran G, Verdin A, Ledoux F, Roumie M, Lo Guidice JM, Courcot D, Garçon G. In vitro evaluation of organic extractable matter from ambient PM2.5 using human bronchial epithelial BEAS-2B cells: Cytotoxicity, oxidative stress, pro-inflammatory response, genotoxicity, and cell cycle deregulation. *Environ Res.* 2019 Apr;171:510-522. doi: 10.1016/j.envres.2019.01.052. Epub 2019 Jan 31. PMID: 30743243.
- Acunzo M, Romano G, Wernicke D, Croce CM. MicroRNA and cancer--a brief overview. *Adv Biol Regul.* 2015 Jan;57:1-9. doi: 10.1016/j.jbior.2014.09.013. Epub 2014 Sep 28. Erratum in: *Adv Biol Regul.* 2015 May;58:53. PMID: 25294678.
- Aghasafari, P., George, U., Pidaparti, R., 2019. A review of inflammatory mechanism in airway diseases. *Inflamm. Res.* 68, 59–74. <https://doi.org/10.1007/s00011-018-1191-2>
- Akbar-Khanzadeh, F., 1993. Short-term respiratory function changes in relation to workshift welding fume exposures. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 64, 393–397. <https://doi.org/10.1007/BF00517944>
- Alenghat T. Epigenomics and the microbiota. *Toxicol Pathol.* 2015 Jan;43(1):101-6. doi: 10.1177/0192623314553805. Epub 2014 Oct 20. PMID: 25330924; PMCID: PMC4310797.
- Al-Otaibi, S., 2014. Respiratory health of a population of welders. *J. Fam. Community Med.* 21, 162. <https://doi.org/10.4103/2230-8229.142969>
- Am J Respir Crit Care Med.* 1996 Dec;154(6 Pt 1):1868-902. Mucociliary clearance in the airways. Wanner A1, Salathé M, O’Riordan TG..pdf, n.d.
- Ambroise, D., Wild, P., Moulin, J.-J., 2006a. Update of a meta-analysis on lung cancer and welding. *Scand. J. Work. Environ. Health* 32, 22–31. <https://doi.org/10.5271/sjweh.973>
- Ambroise, D., Wild, P., Moulin, J.-J., 2006b. Update of a meta-analysis on lung cancer and welding. *Scand. J. Work. Environ. Health* 32, 22–31. <https://doi.org/10.5271/sjweh.973>
- Anatomie du système respiratoire chez l’Homme [WWW Document], 2018. . *Anat. Système Respir. Chez Homme.* URL <https://www.e-cancer.fr/Patients-et-proches/Les-cancers/Cancer-du-poumon/Les-poumons> (accessed 6.27.21).

- Andrew B. Lumb, Deborah Horner, Chapter 25 - Pulmonary Physiology, Editor(s): Hugh C. Hemmings, Talmage D. Egan, Pharmacology and Physiology for Anesthesia, W.B. Saunders, 2013, Pages 445-457, ISBN 9781437716795
- ANSES, Valeurs limites d'exposition en milieu professionnel, Document repère relatif à une approche probabiliste lors de la construction des VLEP à seuil Rapport d'expertise collective, Janvier 2014, page 8.
- ANSES, Valeurs limites d'exposition en milieu professionnel Les poussières dites sans effet spécifique (effets sanitaires) Avis de l'Anses Rapport d'expertise collective, Novembre 2019.
- Antonini, J.M., 2013. Comparative Microscopic Study of Human and Rat Lungs After Overexposure to Welding Fume. *Ann. Occup. Hyg.* <https://doi.org/10.1093/annhyg/met032>
- Antonini, J.M., 2003. Health Effects of Welding. *Crit. Rev. Toxicol.* 33, 61–103. <https://doi.org/10.1080/713611032>
- Antonini JM, Afshari A, Meighan TG, McKinney W, Jackson M, Schwegler-Berry D, Burns DA, LeBouf RF, Chen BT, Shoeb M, Zeidler-Erdely PC. Aerosol characterization and pulmonary responses in rats after short-term inhalation of fumes generated during resistance spot welding of galvanized steel. *Toxicol Rep.* 2017 Feb 22;4:123-133. doi: 10.1016/j.toxrep.2017.02.004. PMID: 28959633; PMCID: PMC5615112.
- Antonini, J.M., Badding, M.A., Meighan, T.G., Keane, M., Leonard, S.S., Roberts, J.R., 2014. Evaluation of the Pulmonary Toxicity of a Fume Generated from a Nickel-, Copper-Based Electrode to be Used as a Substitute in Stainless Steel Welding. *Environ. Health Insights* 8s1, EHI.S15260. <https://doi.org/10.4137/EHI.S15260>
- Antonini, J.M., Clarke, R.W., Krishna Murthy, G.G., Srekanthan, P., Jenkins, N., Eagar, T.W., Brain, J.D., 1998. Freshly generated stainless steel welding fume induces greater lung inflammation in rats as compared to aged fume. *Toxicol. Lett.* 98, 77–86. [https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(98\)00103-9](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(98)00103-9)
- Antonini, J.M., Leonard, S.S., Roberts, J.R., Solano-Lopez, C., Young, S.-H., Shi, X., Taylor, M.D., 2005. Effect of stainless steel manual metal arc welding fume on free radical production, DNA damage, and apoptosis induction. *Mol. Cell. Biochem.* 279, 17–23. <https://doi.org/10.1007/s11010-005-8211-6>
- Antonini, J.M., Murthy, G.G.K., Rogers, R.A., Albert, R., Ulrich, G.D., Brain, J.D., 1996. Pneumotoxicity and Pulmonary Clearance of Different Welding Fumes after Intratracheal Instillation in the Rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 140, 188–199. <https://doi.org/10.1006/taap.1996.0212>
- Antonini, J.M., Roberts, J.R., Stone, S., Chen, B.T., Schwegler-Berry, D., Chapman, R., Zeidler-Erdely, P.C., Andrews, R.N., Frazer, D.G., 2011. Persistence of deposited metals in the lungs after stainless steel and mild steel welding fume inhalation in rats. *Arch. Toxicol.* 85, 487–498. <https://doi.org/10.1007/s00204-010-0601-1>
- Antonini, J.M., Stone, S., Roberts, J.R., Chen, B., Schwegler-Berry, D., Afshari, A.A., Frazer, D.G., 2007a. Effect of short-term stainless steel welding fume inhalation exposure on lung inflammation, injury, and defense responses in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 223, 234–245. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2007.06.020>
- Antonini, J.M., Stone, S., Roberts, J.R., Chen, B., Schwegler-Berry, D., Afshari, A.A., Frazer, D.G., 2007b. Effect of short-term stainless steel welding fume inhalation exposure on lung inflammation, injury, and defense responses in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 223, 234–245. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2007.06.020>

- Antonini, J.M., Taylor, M.D., Zimmer, A.T., Roberts, J.R., 2004. Pulmonary Responses to Welding Fumes: Role of Metal Constituents. *J. Toxicol. Environ. Health A* 67, 233–249. <https://doi.org/10.1080/15287390490266909>
- Appareil respiratoire [WWW Document], 2018. URL <https://www.e-cancer.fr/Patients-et-proches/Les-cancers/Cancer-du-poumon/Les-poumons> (accessed 9.28.21).
- Arora, S., Dev, K., Agarwal, B., Das, P., Syed, M.A., 2018. Macrophages: Their role, activation and polarization in pulmonary diseases. *Immunobiology* 223, 383–396. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2017.11.001>
- Asthme professionnel [WWW Document], 2021. URL <https://www.ameli.fr/arts/assure/sante/themes/asthme-vivre-maladie/asthme-travail> (accessed 6.27.21).
- Atkin, M.A., Gasper, A., Ullegaddi, R., Powers, H.J., 2005. Oxidative Susceptibility of Unfractionated Serum or Plasma: Response to Antioxidants in Vitro and to Antioxidant Supplementation. *Clin. Chem.* 51, 2138–2144. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2005.051078>
- Attfield, M.D., Ross, D.S., 1978. Radiological abnormalities in electric-arc welders. *Occup. Environ. Med.* 35, 117–122. <https://doi.org/10.1136/oem.35.2.117>
- Baccarelli, A., Bollati, V., 2009. Epigenetics and environmental chemicals: *Curr. Opin. Pediatr.* 21, 243–251. <https://doi.org/10.1097/MOP.0b013e32832925cc>
- Badding MA, Fix NR, Antonini JM, Leonard SS. A comparison of cytotoxicity and oxidative stress from welding fumes generated with a new nickel-, copper-based consumable versus mild and stainless steel-based welding in RAW 264.7 mouse macrophages. *PLoS One.* 2014 Jun 30;9(6):e101310. doi: 10.1371/journal.pone.0101310. PMID: 24977413; PMCID: PMC4076336.
- Badran G, Ledoux F, Verdin A, Abbas I, Roumie M, Genevray P, Landkocz Y, Lo Guidice JM, Garçon G, Courcot D. Toxicity of fine and quasi-ultrafine particles: Focus on the effects of organic extractable and non-extractable matter fractions. *Chemosphere.* 2020 Mar;243:125440. doi: 10.1016/j.chemosphere.2019.125440. Epub 2019 Nov 22. PMID: 31995888.
- Baeza A, Marano F. Pollution atmosphérique et maladies respiratoires: un rôle central pour le stress oxydant [Air pollution and respiratory diseases: a central role for oxidative stress]. *Med Sci (Paris).* 2007 May;23(5):497-501. French. doi: 10.1051/medsci/2007235497. PMID: 17502065.
- Balkhyour, M.A., Goknil, M.K., 2010. Total Fume and Metal Concentrations during Welding in Selected Factories in Jeddah, Saudi Arabia. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 7, 2978–2987. <https://doi.org/10.3390/ijerph7072978>
- Berger A. Th1 and Th2 responses: what are they? *BMJ.* 2000 Aug 12;321(7258):424. doi: 10.1136/bmj.321.7258.424. PMID: 10938051; PMCID: PMC27457.
- Bhandari R, Kaur J, Kaur S, Kuhad A. The Nrf2 pathway in psychiatric disorders: pathophysiological role and potential targeting. *Expert Opin Ther Targets.* 2021 Feb;25(2):115-139. doi: 10.1080/14728222.2021.1887141. Epub 2021 Mar 14. PMID: 33557652.
- Bocchi C, Bazzini C, Fontana F, Pinto G, Martino A, Cassoni F. Characterization of urban aerosol: seasonal variation of mutagenicity and genotoxicity of PM2.5, PM1 and semi-volatile organic compounds. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen.* 2016 Oct;809:16-23. doi: 10.1016/j.mrgentox.2016.07.007. Epub 2016 Jul 30. PMID: 27692295.

- Bollati, V., Marinelli, B., Apostoli, P., Bonzini, M., Nordio, F., Hoxha, M., Pegoraro, V., Motta, V., Tarantini, L., Cantone, L., Schwartz, J., Bertazzi, P.A., Baccarelli, A., 2010. Exposure to Metal-Rich Particulate Matter Modifies the Expression of Candidate MicroRNAs in Peripheral Blood Leukocytes. *Environ. Health Perspect.* 118, 763–768. <https://doi.org/10.1289/ehp.0901300>
- Boublil L, Assémat E, Borot MC, Boland S, Martinon L, Sciare J, Baeza-Squiban A. Development of a repeated exposure protocol of human bronchial epithelium in vitro to study the long-term effects of atmospheric particles. *Toxicol In Vitro.* 2013 Mar;27(2):533-42. doi: 10.1016/j.tiv.2012.11.008. Epub 2012 Nov 16. PMID: 23159501.
- Boutten A, Goven D, Artaud-Macari E, Bonay M. La voie Nrf2 en pathologie respiratoire [Protective role of Nrf2 in the lungs against oxidative airway diseases]. *Med Sci (Paris).* 2011 Nov;27(11):966-72. French. doi: 10.1051/medsci/20112711012. Epub 2011 Nov 30. PMID: 22130023.
- Bradshaw, L.M., Fishwick, D., Slater, T., Pearce, N., 1998. Chronic bronchitis, work related respiratory symptoms, and pulmonary function in welders in New Zealand. *Occup. Environ. Med.* 55, 150–154. <https://doi.org/10.1136/oem.55.3.150>
- Brand, P., Havlicek, P., Steiners, M., Holzinger, K., Reisgen, U., Kraus, T., Gube, M., 2013. Exposure of healthy subjects with emissions from a gas metal arc welding process: part 1—exposure technique and external exposure. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 86, 25–30. <https://doi.org/10.1007/s00420-012-0739-7>
- Brines R, Catalán L, Alcaraz MJ, Ferrándiz ML. Myeloid Heme Oxygenase-1 Regulates the Acute Inflammatory Response to Zymosan in the Mouse Air Pouch. *Oxid Med Cell Longev.* 2016 Feb 11;2018:5053091. doi: 10.1155/2018/5053091. PMID: 29599896; PMCID: PMC5828097.
- Briot, R., Maignan, M., Gennai, S., Carpentier, F., Debaty, G., 2012. Actualités thérapeutiques dans le traitement du syndrome de détresse respiratoire aiguë. *Mise Au Point* 18, 9.
- Brown DM, Dickson C, Duncan P, Al-Attili F, Stone V. Interaction between nanoparticles and cytokine proteins: impact on protein and particle functionality. *Nanotechnology.* 2010 21(21):215104.
- Bustamante-Marin, X.M., Ostrowski, L.E., 2017. Cilia and Mucociliary Clearance. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 9, a028241. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028241>
- Cancers professionnels [WWW Document], 2021. URL www.e-cancer.fr/Professionnels-de-sante/Les-chiffres-du-cancer-en-France/Epidemiologie-des-cancers/Les-cancers-les-plus-frequets/Cancer-du-poumon (accessed 7.8.21).
- Carrière A, Galinier A, Fernandez Y, Carmona MC, Pénicaud L, Casteilla L. Les espèces actives de l'oxygène : le yin et le yang de la mitochondrie [Physiological and physiopathological consequences of mitochondrial reactive oxygen species]. *Med Sci (Paris).* 2006 Jan;22(1):47-53. French. doi: 10.1051/medsci/200622147. PMID: 16386220.
- Carvalho, T.C., Peters, J.I., Williams III, R.O., 2011. Influence of particle size on regional lung deposition – What evidence is there? *Int. J. Pharm.* 406, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.12.040>
- Cena, L.G., Chisholm, W.P., Keane, M.J., Chen, B.T., 2015. A Field Study on the Respiratory Deposition of the Nano-Sized Fraction of Mild and Stainless Steel Welding Fume Metals. *J. Occup. Environ. Hyg.* 12, 721–728. <https://doi.org/10.1080/15459624.2015.1043055>

- Chang C, Demokritou P, Shafer M, Christiani D. Physicochemical and toxicological characteristics of welding fume derived particles generated from real time welding processes. *Environ Sci Process Impacts*. 2013 Jan;15(1):214-24. doi: 10.1039/c2em30505d. PMID: 24592438.
- Chen, Y., Hong, T., Wang, S., Mo, J., Tian, T., Zhou, X., 2017. Epigenetic modification of nucleic acids: from basic studies to medical applications. *Chem. Soc. Rev.* 46, 2844–2872. <https://doi.org/10.1039/C6CS00599C>
- Chinn, D.J., Stevenson, I.C., Cotes, J.E., 1990. Longitudinal respiratory survey of shipyard workers: effects of trade and atopic status. *Occup. Environ. Med.* 47, 83–90. <https://doi.org/10.1136/oem.47.2.83>
- Collawn, J.F., Lazrak, A., Bebok, Z., Matalon, S., 2012. The CFTR and ENaC debate: how important is ENaC in CF lung disease? *Am. J. Physiol.-Lung Cell. Mol. Physiol.* 302, L1141–L1146. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00036.2012>
- Courcot E, Leclerc J, Lafitte JJ, Mensier E, Jaillard S, Gosset P, Shirali P, Pottier N, Broly F, Lo-Guidice JM. Xenobiotic metabolism and disposition in human lung cell models: comparison with in vivo expression profiles. *Drug Metab Dispos.* 2012 Oct;40(10):1953-65. doi: 10.1124/dmd.112.046896. Epub 2012 Jul 13. PMID: 22798553.
- Criswell, S.R., Perlmutter, J.S., Videen, T.O., Moerlein, S.M., 2011. Reduced uptake of [18F]FDOPA PET in asymptomatic welders with occupational manganese exposure 7.
- Crystal, R.G., Randell, S.H., Engelhardt, J.F., Voynow, J., Sunday, M.E., 2008. Airway Epithelial Cells: Current Concepts and Challenges. *Proc. Am. Thorac. Soc.* 5, 772–777. <https://doi.org/10.1513/pats.200805-041HR>
- Dahl, J.-U., Gray, M.J., Jakob, U., 2015. Protein Quality Control under Oxidative Stress Conditions. *J. Mol. Biol.* 427, 1549–1563. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.02.014>
- Dalphin, J.C., Pairon, J.C., 2006. Les maladies professionnelles respiratoires : des pathologies fréquentes mais souvent méconnues ou sous-déclarées. *Rev. Mal. Respir.* 23, 11–12. [https://doi.org/10.1016/S0761-8425\(06\)71793-4](https://doi.org/10.1016/S0761-8425(06)71793-4)
- de Planell-Saguer, M., Lovinsky-Desir, S., Miller, R.L., 2014. Epigenetic regulation: The interface between prenatal and early-life exposure and asthma susceptibility: Asthma Epigenetics. *Environ. Mol. Mutagen.* 55, 231–243. <https://doi.org/10.1002/em.21836>
- Delcuve, G.P., Rastegar, M., Davie, J.R., 2009a. Epigenetic control. *J. Cell. Physiol.* 219, 243–250. <https://doi.org/10.1002/jcp.21678>
- Delcuve, G.P., Rastegar, M., Davie, J.R., 2009b. Epigenetic control. *J. Cell. Physiol.* 219, 243–250. <https://doi.org/10.1002/jcp.21678>
- Description des procédés de soudage [WWW Document], 2021. . Linc. Electr. URL <https://www.lincolnelectric.com/fr-fr/support/process-and-theory/Pages/process-and-theory.aspx> (accessed 6.27.21).
- Dierschke, K., Isaxon, C., Andersson, U.B.K., Assarsson, E., Axmon, A., Stockfelt, L., Gudmundsson, A., Jönsson, B.A.G., Kåredal, M., Löndahl, J., Pagels, J., Wierzbicka, A., Bohgard, M., Nielsen, J., 2017a. Acute respiratory effects and biomarkers of inflammation due to welding-derived nanoparticle aggregates. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 90, 451–463. <https://doi.org/10.1007/s00420-017-1209-z>
- Dierschke, K., Isaxon, C., Andersson, U.B.K., Assarsson, E., Axmon, A., Stockfelt, L., Gudmundsson, A., Jönsson, B.A.G., Kåredal, M., Löndahl, J., Pagels, J., Wierzbicka, A., Bohgard, M., Nielsen, J., 2017b. Acute respiratory effects and biomarkers of

- inflammation due to welding-derived nanoparticle aggregates. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 90, 451–463. <https://doi.org/10.1007/s00420-017-1209-z>
- Dixon, A.J., Dixon, B.F., 2004. Ultraviolet radiation from welding and possible risk of skin and ocular malignancy. *Med. J. Aust.* 181, 155–157. <https://doi.org/10.5694/j.1326-5377.2004.tb06207.x>
- Durham, A.L., Adcock, I.M., 2015. The relationship between COPD and lung cancer. *Lung Cancer* 90, 121–127. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2015.08.017>
- Erdely A, Salmen-Muniz R, Liston A, Hulderman T, Zeidler-Erdely PC, Antonini JM, Simeonova PP. Relationship between pulmonary and systemic markers of exposure to multiple types of welding particulate matter. *Toxicology*. 2011 Sep 5;287(1-3):153-9. doi: 10.1016/j.tox.2011.06.008. Epub 2011 Jun 17. PMID: 21708214.
- El-Zein, M., Malo, J.-L., Infante-Rivard, C., Gautrin, D., 2003. Incidence of probable occupational asthma and changes in airway calibre and responsiveness in apprentice welders. *Eur. Respir. J.* 22, 513–518. <https://doi.org/10.1183/09031936.03.00000903>
- Erkinjuntti-Pekkanen, R., Slater, T., Cheng, S., Fishwick, D., Bradshaw, L., Kimbell- Dunn, M., Dronfield, L., Pearce, N., 1999. Two year follow up of pulmonary function values among welders in New Zealand. *Occup. Environ. Med.* 56, 328–333. <https://doi.org/10.1136/oem.56.5.328>
- Fahy, J.V., Dickey, B.F., 2010. Airway Mucus Function and Dysfunction. *N. Engl. J. Med.* 363, 2233–2247. <https://doi.org/10.1056/NEJMra0910061>
- Falcone, L.M., Erdely, A., Kodali, V., Salmen, R., Battelli, L.A., Dodd, T., McKinney, W., Stone, S., Donlin, M., Leonard, H.D., Cumpston, J.L., Cumpston, J.B., Andrews, R.N., Kashon, M.L., Antonini, J.M., Zeidler-Erdely, P.C., 2018. Inhalation of iron-abundant gas metal arc welding-mild steel fume promotes lung tumors in mice. *Toxicology* 409, 24–32. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2018.07.007>
- Falcone, L.M., Erdely, A., Meighan, T.G., Battelli, L.A., Salmen, R., McKinney, W., Stone, S., Cumpston, A., Cumpston, J., Andrews, R.N., Kashon, M., Antonini, J.M., Zeidler-Erdely, P.C., 2017. Inhalation of gas metal arc–stainless steel welding fume promotes lung tumorigenesis in A/J mice. *Arch. Toxicol.* 91, 2953–2962. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1909-2>
- Falcone, L.M., Zeidler-Erdely, P.C., 2019. Skin cancer and welding. *Clin. Exp. Dermatol.* 44, 130–134. <https://doi.org/10.1111/ced.13783>
- Fiche repere environnement et cancer, INCA, 2008.pdf, n.d.
- FicheMetropol-METROPOL_43.pdf, n.d.
- Galanopoulo, L., 2020. Epithélium pulmonaire [WWW Document]. *Voyage Au Cœur Poumon*. URL <https://lejournal.cnrs.fr/articles/voyage-au-coeur-du-poumon> (accessed 6.27.21).
- Garçon G, Dagher Z, Zerimech F, Ledoux F, Courcot D, Aboukais A, Puskaric E, Shirali P. Dunkerque City air pollution particulate matter-induced cytotoxicity, oxidative stress and inflammation in human epithelial lung cells (L132) in culture. *Toxicol In Vitro*. 2006 Jun;20(4):519-28. doi: 10.1016/j.tiv.2005.09.012. Epub 2005 Nov 17. PMID: 16298102.
- Geiser, M., Kreyling, W.G., 2010. Deposition and biokinetics of inhaled nanoparticles. Part. *Fibre Toxicol.* 7, 2. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-7-2>
- Ghanem M, Perdrix E, Alleman L.Y., Rousset D., Coddeville P. Phosphate Buffer Solubility and Oxidative Potential of Single Metals or Multielement Particles of Welding Fumes. *Atmosphere*. 2021 12: 30.p.
- Gliga AR, Taj T, Hedmer M, Assarsson E, Rylander L, Albin M, Broberg K. Mild steel welding is associated with alterations in circulating levels of cancer-related proteins. *Arch Toxicol.*

- 2019 Dec;93(12):3535-3547. doi: 10.1007/s00204-019-02594-4. Epub 2019 Oct 22. PMID: 31641807.
- Gohy, S., Carlier, F.M., Fregimilicka, C., Detry, B., Lecocq, M., Ladjemi, M.Z., Verleden, S., Hoton, D., Weynand, B., Bouzin, C., Pilette, C., 2019. Altered generation of ciliated cells in chronic obstructive pulmonary disease. *Sci. Rep.* 9, 17963. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54292-x>
- Gomes, J.F., Miranda, R.M., Carvalho, P.A., Quintino, M.L., 2014. The effect of metal transfer modes and shielding gas composition on the emission of ultrafine particles in MAG steel welding. *Soldag. Insp.* 19, 168–176. <https://doi.org/10.1590/0104-9224/SI1902.09>
- Gordon, S., Martinez, F.O., 2010. Alternative Activation of Macrophages: Mechanism and Functions. *Immunity* 32, 593–604. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.05.007>
- Graczyk, H., Lewinski, N., Zhao, J., Sauvain, J.-J., Suarez, G., Wild, P., Danuser, B., Riediker, M., 2015. Increase in oxidative stress levels following welding fume inhalation: a controlled human exposure study. *Part. Fibre Toxicol.* 13, 31. <https://doi.org/10.1186/s12989-016-0143-7>
- Gravina, S., Vijg, J., 2010. Epigenetic factors in aging and longevity. *Pflug. Arch. - Eur. J. Physiol.* 459, 247–258. <https://doi.org/10.1007/s00424-009-0730-7>
- Graczyk H, Lewinski N, Zhao J, Sauvain JJ, Suarez G, Wild P, Danuser B, Riediker M. Increase in oxidative stress levels following welding fume inhalation: a controlled human exposure study. *Part Fibre Toxicol.* 2016 Jun 10;13(1):31. doi: 10.1186/s12989-016-0143-7. PMID: 27286820; PMCID: PMC4901438.
- Grigg J, Miyashita L, Suri R. Pneumococcal infection of respiratory cells exposed to welding fumes; Role of oxidative stress and HIF-1 alpha. *PLoS One.* 2017 Mar 9;12(3):e0173569. doi: 10.1371/journal.pone.0173569. PMID: 28278175; PMCID: PMC5344455.
- Gualtieri M, Grollino MG, Consales C, Costabile F, Manigrasso M, Avino P, Aufderheide M, Cordelli E, Di Liberto L, Petralia E, Raschellà G, Stracquadanio M, Wiedensohler A, Pacchierotti F, Zanini G. Is it the time to study air pollution effects under environmental conditions? A case study to support the shift of in vitro toxicology from the bench to the field. *Chemosphere.* 2018 Sep;207:552-564. doi: 10.1016/j.chemosphere.2018.05.130. Epub 2018 May 23. PMID: 29843032.
- Guerreiro, C., Gomes, J.F., Carvalho, P., Santos, T.J.G., Miranda, R.M., Albuquerque, P., 2014. Characterization of airborne particles generated from metal active gas welding process. *Inhal. Toxicol.* 26, 345–352. <https://doi.org/10.3109/08958378.2014.897400>
- Guha, N., Loomis, D., Guyton, K.Z., Grosse, Y., El Ghissassi, F., Bouvard, V., Benbrahim-Tallaa, L., Vilahur, N., Muller, K., Straif, K., 2017. Carcinogenicity of welding, molybdenum trioxide, and indium tin oxide. *Lancet Oncol.* 18, 581–582. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(17\)30255-3](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(17)30255-3)
- Haluza, D., Moshhammer, H., Hochgatterer, K., 2014. Dust is in the Air. Part II: Effects of Occupational Exposure to Welding Fumes on Lung Function in a 9-Year Study. *Lung* 192, 111–117. <https://doi.org/10.1007/s00408-013-9529-6>
- Hannu, T., Piipari, R., Tuppurainen, M., Nordman, H., Tuomi, T., 2006. Occupational asthma caused by stainless steel welding fumes: a clinical study. *Eur. Respir. J.* 29, 85–90. <https://doi.org/10.1183/09031936.00058106>
- Hedmer, M., Karlsson, J.-E., Andersson, U., Jacobsson, H., Nielsen, J., Tinnerberg, H., 2014. Exposure to respirable dust and manganese and prevalence of airways symptoms,

- among Swedish mild steel welders in the manufacturing industry. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 87, 623–634. <https://doi.org/10.1007/s00420-013-0896-3>
- Heltoft, K.N., Slagor, R.M., Agner, T., Bonde, J.P., 2017. Metal arc welding and the risk of skin cancer. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 90, 873–881. <https://doi.org/10.1007/s00420-017-1248-5>
- Holm, M., Kim, J.-L., Lillienberg, L., Storaas, T., Jögi, R., Svanes, C., Schlünssen, V., Forsberg, B., Gíslason, T., Janson, C., Torén, K., n.d. Incidence and prevalence of chronic bronchitis: impact of smoking and welding. *The RHINE study* 6.
- Honaryar, M.K., Lunn, R.M., Luce, D., Ahrens, W., 't Mannetje, A., Hansen, J., Bouaoun, L., Loomis, D., Byrnes, G., Vilahur, N., Stayner, L., Guha, N., 2019a. Welding fumes and lung cancer: a meta-analysis of case-control and cohort studies. *Occup. Environ. Med.* 76, 422–431. <https://doi.org/10.1136/oemed-2018-105447>
- Honaryar, M.K., Lunn, R.M., Luce, D., Ahrens, W., 't Mannetje, A., Hansen, J., Bouaoun, L., Loomis, D., Byrnes, G., Vilahur, N., Stayner, L., Guha, N., 2019b. Welding fumes and lung cancer: a meta-analysis of case-control and cohort studies. *Occup. Environ. Med.* 76, 422–431. <https://doi.org/10.1136/oemed-2018-105447>
- Hou, L., Wang, D., Baccarelli, A., 2011. Environmental chemicals and microRNAs. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* 714, 105–112. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2011.05.004>
- IARC Working Group, 2018. Welding, molybdenum trioxide, and indium tin oxide.
- IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, International Agency for Research on Cancer, 2018a. Welding, molybdenum trioxide, and indium tin oxide.
- IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, International Agency for Research on Cancer, 2018b. Welding, molybdenum trioxide, and indium tin oxide.
- Inflammatory mechanisms in the lung.pdf, n.d.
- International Agency for Research on Cancer, International Agency for Research on Cancer (Eds.), 1990. Chromium, nickel and welding: views and experts opinions of an IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, which met in Lyon 5 - 13 June 1989, IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Lyon.
- Ithnin, A., Zubir, A., Awang, N., Mohamad Su, N.N., 2019. Respiratory Health Status of Workers that Exposed to Welding Fumes at Lumut Shipyard. *Pak. J. Biol. Sci.* 22, 143–147. <https://doi.org/10.3923/pjbs.2019.143.147>
- Jardim MJ. microRNAs: implications for air pollution research. *Mutat Res.* 2011 Dec 1;717(1-2):38-45. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2011.03.014. Epub 2011 Apr 14. PMID: 21515291.
- Järvelä M, Kauppi P, Tuomi T, Luukkonen R, Lindholm H, Nieminen R, Moilanen E, Hannu T. Inflammatory response to acute exposure to welding fumes during the working day. *Int J Occup Med Environ Health.* 2013 Apr;26(2):220-9. doi: 10.2478/s13382-013-0097-z. Epub 2013 May 20. PMID: 23690265.
- J Jarvisalo, 1992. Urinary and blood manganese in occupationally nonexposed populations and in manual metal arc welders of mild steel [WWW Document]. URL <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1577529/> (accessed 7.8.21).
- Jubrail, J., Kurian, N., Niedergang, F., 2017. Macrophage phagocytosis cracking the defect code in COPD. *Biomed. J.* 40, 305–312. <https://doi.org/10.1016/j.bj.2017.09.004>
- Kakoe, H., n.d. RELATIONSHIP BETWEEN CONCENTRATION OF WELDING FUMES AND CHANGES IN WELDERS' LUNG FUNCTIONS 4.
- Karjalainen, A., Kurppa, K., Martikainen, R., Karjalainen, J., Klaukka, T., 2002. Exploration of asthma risk by occupation - extended analysis of an incidence study of the Finnish

- population. *Scand. J. Work. Environ. Health* 28, 49–57. <https://doi.org/10.5271/sjweh.646>
- Kauppi, P., Järvelä, M., Tuomi, T., Luukkonen, R., Lindholm, T., Nieminen, R., Moilanen, E., Hannu, T., 2015a. Systemic inflammatory responses following welding inhalation challenge test. *Toxicol. Rep.* 2, 357–364. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2014.12.015>
- Kauppi, P., Järvelä, M., Tuomi, T., Luukkonen, R., Lindholm, T., Nieminen, R., Moilanen, E., Hannu, T., 2015b. Systemic inflammatory responses following welding inhalation challenge test. *Toxicol. Rep.* 2, 357–364. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2014.12.015>
- Kendzia, B., Behrens, T., Jöckel, K.-H., Siemiatycki, J., Kromhout, H., Vermeulen, R., Peters, S., Van Gelder, R., Olsson, A., Brüske, I., Wichmann, H.-E., Stücker, I., Guida, F., Tardón, A., Merletti, F., Mirabelli, D., Richiardi, L., Pohlabeln, H., Ahrens, W., Landi, M.T., Caporaso, N., Consonni, D., Zaridze, D., Szeszenia-Dabrowska, N., Lissowska, J., Gustavsson, P., Marcus, M., Fabianova, E., 't Mannetje, A., Pearce, N., Tse, L.A., Yu, I.T., Rudnai, P., Bencko, V., Janout, V., Mates, D., Foretova, L., Forastiere, F., McLaughlin, J., Demers, P., Bueno-de-Mesquita, B., Boffetta, P., Schüz, J., Straif, K., Pesch, B., Brüning, T., 2013. Welding and Lung Cancer in a Pooled Analysis of Case-Control Studies. *Am. J. Epidemiol.* 178, 1513–1525. <https://doi.org/10.1093/aje/kwt201>
- Kile, M.L., Fang, S., Baccarelli, A.A., Tarantini, L., Cavallari, J., Christiani, D.C., 2013. A panel study of occupational exposure to fine particulate matter and changes in DNA methylation over a single workday and years worked in boilermaker welders. *Environ. Health* 12, 47. <https://doi.org/10.1186/1476-069X-12-47>
- Kim, J.Y., 2005. Exposure to welding fumes is associated with acute systemic inflammatory responses. *Occup. Environ. Med.* 62, 157–163. <https://doi.org/10.1136/oem.2004.014795>
- Kim, V.N., Nam, J.-W., 2006. Genomics of microRNA. *Trends Genet.* 22, 165–173. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2006.01.003>
- Kirichenko KY, Agoshkov AI, Drozd VA, Gridasov AV, Kholodov AS, Kobyljakov SP, Kosyanov DY, Zakharenko AM, Karabtsov AA, Shimanskii SR, Stratidakis AK, Mezhuev YO, Tsatsakis AM, Golokhvast KS. Characterization of fume particles generated during arc welding with various covered electrodes. *Sci Rep.* 2018 Nov 21;8(1):17169. doi: 10.1038/s41598-018-35494-1. PMID: 30464198; PMCID: PMC6249245.
- Knight, D.A., Holgate, S.T., 2003. The airway epithelium: Structural and functional properties in health and disease. *Respirology* 8, 432–446. <https://doi.org/10.1046/j.1440-1843.2003.00493.x>
- Knudsen, L.E., Boisen, T., Christensen, J.M., Jelnes, J.E., Jensen, G.E., Jensen, J.C., Lundgren, K., Lundsteen, C., Pedersen, B., Wassermann, K., Wilhardt, P., Wulf, H.C., Zebitz, U., 1992. Biomonitoring of genotoxic exposure among stainless steel welders. *Mutat. Res. Toxicol.* 279, 129–143. [https://doi.org/10.1016/0165-1218\(92\)90255-X](https://doi.org/10.1016/0165-1218(92)90255-X)
- Koh, D.-H., Kim, J.-I., Kim, K.-H., Yoo, S.-W., 2015a. Welding fume exposure and chronic obstructive pulmonary disease in welders. *Occup. Med.* 65, 72–77. <https://doi.org/10.1093/occmed/kqu136>
- Koh, D.-H., Kim, J.-I., Kim, K.-H., Yoo, S.-W., 2015b. Welding fume exposure and chronic obstructive pulmonary disease in welders. *Occup. Med.* 65, 72–77. <https://doi.org/10.1093/occmed/kqu136>

- Kornberg, T., Stueckle, T., Antonini, J., Rojanasakul, Y., Castranova, V., Yang, Y., Wang, L., 2017. Potential Toxicity and Underlying Mechanisms Associated with Pulmonary Exposure to Iron Oxide Nanoparticles: Conflicting Literature and Unclear Risk. *Nanomaterials* 7, 307. <https://doi.org/10.3390/nano7100307>
- Krishnaraj, J., Kowshik, J., Sebastian, R., Raghavan, S.C., Nagini, S., 2017. Exposure to welding fumes activates DNA damage response and redox-sensitive transcription factor signalling in Sprague-Dawley rats. *Toxicol. Lett.* 274, 8–19. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2017.04.001>
- Krishnaraj J, Baba AB, Viswanathan P, Veeravarmal V, Balasubramanian V, Nagini S. Impact of stainless-steel welding fumes on proteins and non-coding RNAs regulating DNA damage response in the respiratory tract of Sprague-Dawley rats. *J Toxicol Environ Health A.* 2018 81(24):1231-1245.
- Lane, S.J., Sousa, A.R., Lee, T.H., 1994. The role of the macrophage in asthma. *Allergy* 49, 201–209. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.1994.tb02650.x>
- Leclercq B, Happillon M, Antherieu S, Hardy EM, Alleman LY, Grova N, Perdrix E, Appenzeller BM, Lo Guidice JM, Coddeville P, Garçon G. Differential responses of healthy and chronic obstructive pulmonary diseased human bronchial epithelial cells repeatedly exposed to air pollution-derived PM4. *Environ Pollut.* 2016 Nov;218:1074-1088. doi: 10.1016/j.envpol.2016.08.059. Epub 2016 Sep 1. PMID: 27593349.
- Leclercq B, Platel A, Antherieu S, Alleman LY, Hardy EM, Perdrix E, Grova N, Riffault V, Appenzeller BM, Happillon M, Nesslany F, Coddeville P, Lo-Guidice JM, Garçon G. Genetic and epigenetic alterations in normal and sensitive COPD-diseased human bronchial epithelial cells repeatedly exposed to air pollution-derived PM2.5. *Environ Pollut.* 2017 Nov;230:163-177. doi: 10.1016/j.envpol.2017.06.028. Epub 2017 Jun 23. PMID: 28651088.
- Lee, E.-Y., Flynn, M.R., Lewis, M.M., Mailman, R.B., Huang, X., 2018. Welding-related brain and functional changes in welders with chronic and low-level exposure. *NeuroToxicology* 64, 50–59. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2017.06.011>
- Lehnert, M., Pesch, B., Lotz, A., 2012. Exposure to Inhalable, Respirable, and Ultrafine Particles in Welding Fume. *Ann. Occup. Hyg.* <https://doi.org/10.1093/annhyg/mes025>
- Leonard, S.S., Chen, B.T., Stone, S.G., Schwegler-Berry, D., Kenyon, A.J., Frazer, D., Antonini, J.M., 2010. Comparison of stainless and mild steel welding fumes in generation of reactive oxygen species. *Part. Fibre Toxicol.* 7, 32. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-7-32>
- Lepeule, J., Baccarelli, A., Tarantini, L., Motta, V., Cantone, L., Litonjua, A.A., Sparrow, D., Vokonas, P.S., Schwartz, J., 2012. Gene promoter methylation is associated with lung function in the elderly: The normative aging study. *Epigenetics* 7, 261–269. <https://doi.org/10.4161/epi.7.3.19216>
- Li J, Li WX, Bai C, Song Y. Particulate matter-induced epigenetic changes and lung cancer. *Clin Respir J.* 2017 Sep;11(5):539-546. doi: 10.1111/crj.12389. Epub 2015 Oct 20. PMID: 26403658; PMCID: PMC7310573.
- Lippmann, M., Yeates, D.B., Albert, R.E., 1980. Deposition, retention, and clearance of inhaled particles. *Occup. Environ. Med.* 37, 337–362. <https://doi.org/10.1136/oem.37.4.337>
- Liu, H.-H., Shih, T.-S., Huang, H.-R., Huang, S.-C., Lee, L.-H., Huang, Y.-C., 2013. Plasma Homocysteine Is Associated with Increased Oxidative Stress and Antioxidant Enzyme Activity in Welders. *Sci. World J.* 2013, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2013/370487>

- Liu, K., Husler, J., Ye, J., Leonard, S.S., Cutler, D., Chen, F., Wang, S., Zhang, Z., Ding, M., Wang, L., Shi, X., 2001. On the mechanism of Cr (VI)-induced carcinogenesis: Dose dependence of uptake and cellular responses, in: Shi, X., Castranova, V., Vallyathan, V., Perry, W.G. (Eds.), *Molecular Mechanisms of Metal Toxicity and Carcinogenesis*. Springer US, Boston, MA, pp. 221–229. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-0793-2_26
- Liu, S., HAMMOND, K., RAPPAPORT, S., 2011. Statistical Modeling to Determine Sources of Variability in Exposures to Welding Fumes. *Ann. Occup. Hyg.* <https://doi.org/10.1093/annhyg/meq088>
- Longhin EM, Mantecca P, Gualtieri M. Fifteen Years of Airborne Particulates in Vitro Toxicology in Milano: Lessons and Perspectives Learned. *Int J Mol Sci.* 2018 Apr 3;21(7):2489. doi: 10.3390/ijms21072489. PMID: 32260164; PMCID: PMC7177378.
- Lovinsky-Desir, S., Miller, R.L., 2012. Epigenetics, Asthma, and Allergic Diseases: A Review of the Latest Advancements. *Curr. Allergy Asthma Rep.* 12, 211–220. <https://doi.org/10.1007/s11882-012-0257-4>
- Lumb PD. Changing Priorities in Critical Care? *J Crit Care.* 2017 Oct;41:viii. doi: 10.1016/S0883-9441(17)31342-4. PMID: 28991569.
- MacLeod, J.S., Harris, M.A., Tjepkema, M., Peters, P.A., Demers, P.A., 2017. Cancer Risks among Welders and Occasional Welders in a National Population-Based Cohort Study: Canadian Census Health and Environmental Cohort. *Saf. Health Work* 8, 258–266. <https://doi.org/10.1016/j.shaw.2016.12.001>
- Malaguarnera, Michele, Drago, F., Malaguarnera, G., Volti, G.L., Salomone, S., Caraci, F., Galvano, F., Vacante, M., Bucolo, C., Malaguarnera, Mariano, 2013. Metal fume fever. *The Lancet* 381, 2298. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)60689-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60689-3)
- Marongiu, A., Hasan, O., Ali, A., Bakhsh, S., George, B., Irfan, N., Minelli, C., Canova, C., Schofield, S., De Matteis, S., Cullinan, P., 2016. Are welders more at risk of respiratory infections? Findings from a cross-sectional survey and analysis of medical records in shipyard workers: the WELSHIP project. *Thorax* 71, 601–606. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2015-207912>
- Matczak, W., 2002. Evaluation of occupational exposure to toxic metals released in the process of aluminum welding [WWW Document]. URL <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11942673/> (accessed 7.8.21).
- Matczak, W., Chmielnicka, J., 1993. Relation between various chromium compounds and some other elements in fumes from manual metal arc stainless steel welding. *Occup. Environ. Med.* 50, 244–251. <https://doi.org/10.1136/oem.50.3.244>
- Matrat, M., Guida, F., Mattei, F., Cénée, S., Cyr, D., Févotte, J., Sanchez, M., Menvielle, G., Radoï, L., Schmaus, A., Woronoff, A.-S., Luce, D., Stücker, I., Icare Study Group, 2016. Welding, a risk factor of lung cancer: the ICARE study. *Occup. Environ. Med.* 73, 254–261. <https://doi.org/10.1136/oemed-2015-102964>
- McCarrick S, Wei Z, Moelijker N, Derr R, Persson KA, Hendriks G, Odnevall Wallinder I, Hedberg Y, Karlsson HL. High variability in toxicity of welding fume nanoparticles from stainless steel in lung cells and reporter cell lines: the role of particle reactivity and solubility. *Nanotoxicology.* 2019 Dec;13(10):1293-1309. doi: 10.1080/17435390.2019.1650972. Epub 2019 Aug 16. PMID: 31418618.
- McNeilly, J.D., Heal, M.R., Beverland, I.J., Howe, A., Gibson, M.D., Hibbs, L.R., MacNee, W., Donaldson, K., 2004a. Soluble transition metals cause the pro-inflammatory effects of

- welding fumes in vitro. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 196, 95–107. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2003.11.021>
- McNeilly, J.D., Heal, M.R., Beverland, I.J., Howe, A., Gibson, M.D., Hibbs, L.R., MacNee, W., Donaldson, K., 2004b. Soluble transition metals cause the pro-inflammatory effects of welding fumes in vitro. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 196, 95–107. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2003.11.021>
- Mehrfar, Y., Zamanian, Z., Pirami, H., 2019. Respiratory Exposure to Toxic Gases and Metal Fumes Produced by Welding Processes and Pulmonary Function Tests. *Int. J. Occup. Environ. Med.* 10, 40–49. <https://doi.org/10.15171/ijoem.2019.1540>
- Michalek, I.M., Martinsen, J.I., Weiderpass, E., Hansen, J., Sparen, P., Tryggvadottir, L., Pukkala, E., 2019. Heavy metals, welding fumes, and other occupational exposures, and the risk of kidney cancer: A population-based nested case-control study in three Nordic countries. *Environ. Res.* 173, 117–123. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.03.023>
- Michel, F., Bonnefont-Rousselot, D., Mas, E., Draï, J., Thérond, P., 2008. Biomarqueurs de la peroxydation lipidique : aspects analytiques. *Ann Biol Clin* 66, 16.
- Minov, J., Karadzinska-Bislimovska, J., Tutkun, E., Risteska-Kuc, S., Stoleski, S., Mijakoski, D., n.d. CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE IN NEVER-SMOKING WELDING WORKERS 6.
- Moldoveanu B, Otmishi P, Jani P, Walker J, Sarmiento X, Guardiola J, Saad M, Yu J. Inflammatory mechanisms in the lung. *J Inflamm Res.* 2009;2:1-11. Epub 2008 Dec 16. PMID: 22096348; PMCID: PMC3218724
- Morphometric, model, *Annals of the ICRP*, 1994.pdf, n.d.
- Motta, V., Angelici, L., Nordio, F., Bollati, V., Fossati, S., Frascati, F., Tinaglia, V., Bertazzi, P.A., Battaglia, C., Baccarelli, A.A., 2013. Integrative Analysis of miRNA and Inflammatory Gene Expression After Acute Particulate Matter Exposure. *Toxicol. Sci.* 132, 307–316. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kft013>
- Mukherjee K, Twyman RM, Vilcinskas A. Insects as models to study the epigenetic basis of disease. *Prog Biophys Mol Biol.* 2015 Jul;118(1-2):69-78. doi: 10.1016/j.pbiomolbio.2015.02.009. Epub 2015 Mar 14. PMID: 25778758.
- Nathan, C., Cunningham-Bussel, A., 2013. Beyond oxidative stress: an immunologist's guide to reactive oxygen species. *Nat. Rev. Immunol.* 13, 349–361. <https://doi.org/10.1038/nri3423>
- NIOSH, 2011. Welding Fumes [WWW Document]. URL <https://www.cdc.gov/niosh/pel88/welding.html> (accessed 9.26.21).
- OMS [WWW Document], 2021. URL <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/cancer> (accessed 7.8.21).
- Ozdemir, O., Numanoglu, N., Gonullu, U., Savas, I., Alper, D., Gurses, H., 1995. Chronic effects of welding exposure on pulmonary function tests and respiratory symptoms. *Occup. Environ. Med.* 52, 800–803. <https://doi.org/10.1136/oem.52.12.800>
- Paris, C., Clement-Duchene, C., Vignaud, J.M., Gislard, A., Stoufflet, A., Bertrand, O., Thiberville, L., Grosdidier, G., Martinet, Y., Benichou, J., Hainaut, P., 2010. Relationships between lung adenocarcinoma and gender, age, smoking and occupational risk factors: A case–case study. *Lung Cancer* 68, 146–153. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2009.06.007>
- Pega F, Chartres N, Guha N, Modenese A, Morgan RL, Martínez-Silveira MS, Loomis D. The effect of occupational exposure to welding fumes on trachea, bronchus and lung cancer: A protocol for a systematic review and meta-analysis from the WHO/ILO Joint

- Estimates of the Work-related Burden of Disease and Injury. *Environ Int.* 2020 Dec;145:106089. doi: 10.1016/j.envint.2020.106089. Epub 2020 Sep 17. PMID: 32950789; PMCID: PMC7569600.
- Pilcer, G., Amighi, K., 2010. Formulation strategy and use of excipients in pulmonary drug delivery. *Int. J. Pharm.* 392, 1–19. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.03.017>
- Platel A, Privat K, Talahari S, Delobel A, Dourdin G, Gateau E, Simar S, Saleh Y, Sotty J, Antherieu S, Canivet L, Alleman LY, Perdrix E, Garçon G, Denayer FO, Lo Guidice JM, Nessler F. Study of in vitro and in vivo genotoxic effects of air pollution fine (PM2.5-0.18) and quasi-ultrafine (PM0.18) particles on lung models. *Sci Total Environ.* 2020 Apr 1;711:134666. doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.134666. Epub 2019 Nov 2. PMID: 31812380.
- Popović, O., Prokić-Cvetković, R., Burzić, M., Lukić, U., Beljić, B., 2014. Fume and gas emission during arc welding: Hazards and recommendation. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 37, 509–516. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.05.076>
- Procédés de soudage, DUNOD 2012.pdf, n.d.
- R Woskie, S.R., 2002. Exposures to quartz, diesel, dust, and welding fumes during heavy and highway construction [WWW Document]. URL <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12486778/> (accessed 7.8.21).
- Rana, H.K., Akhtar, Mst.R., Ahmed, M.B., Liò, P., Quinn, J.M.W., Huq, F., Moni, M.A., 2019. Genetic effects of welding fumes on the progression of neurodegenerative diseases. *NeuroToxicology* 71, 93–101. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2018.12.002>
- Rastogi, S.K., Gupta, B.N., Husain, T., Mathur, N., Srivastava, S., n.d. Spirometric Abnormalities among Welders 10.
- Reichmann, D., Voth, W., Jakob, U., 2018. Maintaining a Healthy Proteome during Oxidative Stress. *Mol. Cell* 69, 203–213. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.12.021>
- Ren J, Li X, Dong H, Suo L, Zhang J, Zhang L, Zhang J. miR-210-3p regulates the proliferation and apoptosis of non-small cell lung cancer cells by targeting SIN3A. *Exp Ther Med.* 2019 Oct;18(4):2565-2573. doi: 10.3892/etm.2019.7867. Epub 2019 Aug 8. PMID: 31555365; PMCID: PMC6755421.
- Ricaud, M., 2018. Les fumées de soudage et des techniques connexes ED6132, 32.
- Ricaud, M., n.d. Les fumées de soudage et des techniques connexes 32.
- RNV3P-Ra-Novembre2018.pdf, n.d.
- Rothschild, S.I., 2013. Epigenetic Therapy in Lung Cancer – Role of microRNAs. *Front. Oncol.* 3. <https://doi.org/10.3389/fonc.2013.00158>
- Saleh Y, Antherieu S, Dusautoir R, Y Alleman L, Sotty J, De Sousa C, Platel A, Perdrix E, Riffault V, Fronval I, Nessler F, Canivet L, Garçon G, Lo-Guidice JM. Exposure to Atmospheric Ultrafine Particles Induces Severe Lung Inflammatory Response and Tissue Remodeling in Mice. *Int J Environ Res Public Health.* 2019 Apr 4;16(7):1210. doi: 10.3390/ijerph16071210. PMID: 30987320; PMCID: PMC6479904.
- Samulin Erdem J, Arnoldussen YJ, Tajik S, Ellingsen DG, Zienolddiny S. Effects of mild steel welding fume particles on pulmonary epithelial inflammation and endothelial activation. *Toxicol Ind Health.* 2020 Dec;36(12):995-1001. doi: 10.1177/0748233720962685. Epub 2020 Oct 7. PMID: 33025859; PMCID: PMC7756071.
- Sato, F., Tsuchiya, S., Meltzer, S.J., Shimizu, K., 2011. MicroRNAs and epigenetics: MicroRNAs and epigenetics. *FEBS J.* 278, 1598–1609. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08089.x>

- Schoonover, T., Conroy, L., Lacey, S., Plavka, J., 2011. Personal Exposure to Metal Fume, NO₂, and O₃ among Production Welders and Non-welders. *Ind. Health* 49, 63–72. <https://doi.org/10.2486/indhealth.MS1150>
- Sharifian, S.A., Loukzadeh, Z., Shojaoddiny-Ardekani, A., Aminian, O., n.d. Pulmonary Adverse Effects of Welding Fume in Automobile Assembly Welders 5.
- Shoeb, M., Kodali, V., Farris, B., Bishop, L.M., Meighan, T., Salmen, R., Eye, T., Roberts, J.R., Zeidler-Erdely, P., Erdely, A., Antonini, J.M., 2017a. Evaluation of the molecular mechanisms associated with cytotoxicity and inflammation after pulmonary exposure to different metal-rich welding particles. *Nanotoxicology* 1–12. <https://doi.org/10.1080/17435390.2017.1349200>
- Shoeb, M., Kodali, V., Farris, B., Bishop, L.M., Meighan, T., Salmen, R., Eye, T., Roberts, J.R., Zeidler-Erdely, P., Erdely, A., Antonini, J.M., 2017b. Evaluation of the molecular mechanisms associated with cytotoxicity and inflammation after pulmonary exposure to different metal-rich welding particles. *Nanotoxicology* 1–12. <https://doi.org/10.1080/17435390.2017.1349200>
- Siew, S.S., Kauppinen, T., Kyrrönen, P., Heikkilä, P., Pukkala, E., 2008a. Exposure to iron and welding fumes and the risk of lung cancer. *Scand. J. Work. Environ. Health* 34, 444–450. <https://doi.org/10.5271/sjweh.1296>
- Siew, S.S., Kauppinen, T., Kyrrönen, P., Heikkilä, P., Pukkala, E., 2008b. Exposure to iron and welding fumes and the risk of lung cancer. *Scand. J. Work. Environ. Health* 34, 444–450. <https://doi.org/10.5271/sjweh.1296>
- Sobaszek, A., Boulenguez, C., Frimat, P., Robin, H., Haguenoer, J.M., Edme, J.-L., 2000. Acute Respiratory Effects of Exposure to Stainless Steel and Mild Steel Welding Fumes: J. *Occup. Environ. Med.* 42, 923–931. <https://doi.org/10.1097/00043764-200009000-00016>
- Sotty J, Garçon G, Denayer FO, Alleman LY, Saleh Y, Perdrix E, Riffault V, Dubot P, Lo-Guidice JM, Canivet L. Toxicological effects of ambient fine (PM_{2.5-0.18}) and ultrafine (PM_{0.18}) particles in healthy and diseased 3D organo-typic mucociliary-phenotype models. *Environ Res.* 2019 Sep;176:108538. doi: 10.1016/j.envres.2019.108538. Epub 2019 Jun 15. PMID: 31344532.
- Sørensen, A.R., Thulstrup, A.M., Hansen, J., Ramlau-Hansen, C.H., Meersohn, A., Skytthe, A., Bonde, J.P., 2007a. Risk of lung cancer according to mild steel and stainless steel welding. *Scand. J. Work. Environ. Health* 33, 379–386. <https://doi.org/10.5271/sjweh.1157>
- Sørensen, A.R., Thulstrup, A.M., Hansen, J., Ramlau-Hansen, C.H., Meersohn, A., Skytthe, A., Bonde, J.P., 2007b. Risk of lung cancer according to mild steel and stainless steel welding. *Scand. J. Work. Environ. Health* 33, 379–386. <https://doi.org/10.5271/sjweh.1157>
- Soudage MIG MAG [WWW Document], 2021. URL <https://www.saf-fro.com/fr/procedesoudage-mig-mag> (accessed 9.28.21).
- Soudage MMA [WWW Document], 2021. URL <https://www.weldteam.com/nos-conseils/soudage-lelectrode-enrobee> (accessed 9.28.21).
- Soudage TIG [WWW Document], 2021. URL <https://www.saf-fro.com/fr/procedesoudage-tig> (accessed 9.28.21).
- Stone V, Miller MR, Clift MJD, Elder A, Mills NL, Møller P, Schins RPF, Vogel U, Kreyling WG, Alstrup Jensen K, Kuhlbusch TAJ, Schwarze PE, Hoet P, Pietroiusti A, De Vizcaya-Ruiz A, Baeza-Squiban A, Teixeira JP, Tran CL, Cassee FR. Nanomaterials Versus Ambient

- Ultrafine Particles: An Opportunity to Exchange Toxicology Knowledge. *Environ Health Perspect.* 2017 Oct 10;125(10):106002. doi: 10.1289/EHP424. PMID: 29017987; PMCID: PMC5933410.
- Stanislawska M, Janasik B, Kuras R, Malachowska B, Halatek T, Wasowicz W. Assessment of occupational exposure to stainless steel welding fumes - A human biomonitoring study. *Toxicol Lett.* 2020 Sep 1;329:47-55. doi: 10.1016/j.toxlet.2020.04.019. Epub 2020 May 5. PMID: 32380127.
- Storaas, T., Zock, J.-P., Morano, A.E., Holm, M., Bjørnsson, E., Forsberg, B., Gislason, T., Janson, C., Norback, D., Omenaas, E., Schlünssen, V., Torén, K., Svanes, C., 2015. Incidence of rhinitis and asthma related to welding in Northern Europe. *Eur. Respir. J.* 46, 1290–1297. <https://doi.org/10.1183/13993003.02345-2014>
- SYMOP, 2018. Guide de mise en oeuvre des technologies de soudage-coupage [WWW Document]. URL <https://www.symop.com/guide-de-mise-en-oeuvre-des-technologies-du-soudage-coupage/> (accessed 7.8.21).
- Szram, J., Schofield, S.J., Cosgrove, M.P., Cullinan, P., 2013a. Welding, longitudinal lung function decline and chronic respiratory symptoms: a systematic review of cohort studies. *Eur. Respir. J.* 42, 1186–1193. <https://doi.org/10.1183/09031936.00206011>
- Szram, J., Schofield, S.J., Cosgrove, M.P., Cullinan, P., 2013b. Welding, longitudinal lung function decline and chronic respiratory symptoms: a systematic review of cohort studies. *Eur. Respir. J.* 42, 1186–1193. <https://doi.org/10.1183/09031936.00206011>
- Szyf, M., 2007. The Dynamic Epigenome and its Implications in Toxicology. *Toxicol. Sci.* 100, 7–23. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfm177>
- Tantawy MA, Shaheen S, Kattan SW, Alelwani W, Barnawi IO, Elmgeed GA, Nafie MS. Cytotoxicity, in silico predictions and molecular studies for androstane heterocycle compounds revealed potential antitumor agent against lung cancer cells. *J Biomol Struct Dyn.* 2020 Dec 10:1-14. doi: 10.1080/07391102.2020.1856188. Epub ahead of print. PMID: 33300466.
- 't Mannetje, A., Brennan, P., Zaridze, D., Szeszenia-Dabrowska, N., Rudnai, P., Lissowska, J., Fabianova, E., Cassidy, A., Mates, D., Bencko, V., Foretova, L., Janout, V., Fevotte, J., Fletcher, T., Boffetta, P., 2012. Welding and Lung Cancer in Central and Eastern Europe and the United Kingdom. *Am. J. Epidemiol.* 175, 706–714. <https://doi.org/10.1093/aje/kwr358>
- Taylor, M.D., 2003a. Effects of Welding Fumes of Differing Composition and Solubility on Free Radical Production and Acute Lung Injury and Inflammation in Rats. *Toxicol. Sci.* 75, 181–191. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfg173>
- Taylor, M.D., 2003b. Effects of Welding Fumes of Differing Composition and Solubility on Free Radical Production and Acute Lung Injury and Inflammation in Rats. *Toxicol. Sci.* 75, 181–191. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfg173>
- Taylor, M.D., 2003c. Effects of Welding Fumes of Differing Composition and Solubility on Free Radical Production and Acute Lung Injury and Inflammation in Rats. *Toxicol. Sci.* 75, 181–191. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfg173>
- To T, Zhu J, Larsen K, Simatovic J, Feldman L, Ryckman K, Gershon A, Loughheed MD, Liciskai C, Chen H, Villeneuve PJ, Crighton E, Su Y, Sadatsafavi M, Williams D, Carlsten C; Canadian Respiratory Research Network. Progression from Asthma to Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Is Air Pollution a Risk Factor? *Am J Respir Crit Care Med.* 2016 Aug 15;194(4):429-38. doi: 10.1164/rccm.201510-1932OC. PMID: 26950751.

- Thannickal, V.J., Fanburg, B.L., 2000. Reactive oxygen species in cell signaling. *Am. J. Physiol.-Lung Cell. Mol. Physiol.* 279, L1005–L1028. <https://doi.org/10.1152/ajplung.2000.279.6.L1005>
- The WELDOX Study Group, Lehnert, M., Weiss, T., Pesch, B., Lotz, A., Zilch-Schöneweis, S., Heinze, E., Van Gelder, R., Hahn, J.-U., Brüning, T., 2013. Reduction in welding fume and metal exposure of stainless steel welders: an example from the WELDOX study. *Int. Arch. Occup. Environ. Health.* <https://doi.org/10.1007/s00420-013-0884-7>
- Tungsukruthai S, Reamtong O, Roytrakul S, Sukrong S, Vinayanwattikun C, Chanvorachote P. Targeting AKT/mTOR and Bcl-2 for Autophagic and Apoptosis Cell Death in Lung Cancer: Novel Activity of a Polyphenol Compound. *Antioxidants (Basel)*. 2021 Mar 29;10(4):534. doi: 10.3390/antiox10040534. PMID: 33805467; PMCID: PMC8066183.
- Vadász, I., Sznajder, J.I., 2017. Gas Exchange Disturbances Regulate Alveolar Fluid Clearance during Acute Lung Injury. *Front. Immunol.* 8, 757. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00757>
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T.D., Mazur, M., Telser, J., 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39, 44–84. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.07.001>
- Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M., 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact.* 160, 1–40. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2005.12.009>
- Vallières, E., Pintos, J., Lavoué, J., Parent, M., Rachet, B., Siemiatycki, J., 2012a. Exposure to welding fumes increases lung cancer risk among light smokers but not among heavy smokers: evidence from two case–control studies in Montreal. *Cancer Med.* 1, 47–58. <https://doi.org/10.1002/cam4.6>
- Vallières, E., Pintos, J., Lavoué, J., Parent, M.-É., Rachet, B., Siemiatycki, J., 2012b. Exposure to welding fumes increases lung cancer risk among light smokers but not among heavy smokers: evidence from two case-control studies in Montreal. *Cancer Med.* 1, 47–58. <https://doi.org/10.1002/cam4.6>
- Vandenplas, O., Dargent, F., Auverdin, J.J., Boulanger, J., Bossiroy, J.M., Roosels, D., Vande Weyer, R., 1995. Occupational asthma due to gas metal arc welding on mild steel. *Thorax* 50, 587–589. <https://doi.org/10.1136/thx.50.5.587>
- Van Rooij E, Kauppinen S. Development of microRNA therapeutics is coming of age. *EMBO Mol Med.* 2014 Jul;6(7):851-64. doi: 10.15252/emmm.201100899. PMID: 24935956; PMCID: PMC4119351.
- Veranth JM, Kaser EG, Veranth MM, Koch M, Yost GS. Cytokine responses of human lung cells (BEAS-2B) treated with micron-sized and nanoparticles of metal oxides compared to soil dusts. *Part Fibre Toxicol.* 2007 Feb 27;4:2. doi: 10.1186/1743-8977-4-2. PMID: 17326846; PMCID: PMC1821039.
- Verdone, L., 2006. Histone acetylation in gene regulation. *Brief. Funct. Genomic. Proteomic.* 5, 209–221. <https://doi.org/10.1093/bfgp/ell028>
- Vrijens K, Bollati V, Nawrot TS. MicroRNAs as potential signatures of environmental exposure or effect: a systematic review. *Environ Health Perspect.* 2015 123: 399-411.
- Wallace, M., 2001. Comparing exposure levels by type of welding operation and evaluating the effectiveness of fume extraction guns [WWW Document]. URL <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11504352/> (accessed 7.8.21).

- Wanner A, Salathé M, O'Riordan TG. Mucociliary clearance in the airways. *Am J Respir Crit Care Med.* 1996 Dec;154(6 Pt 1):1868-902. doi: 10.1164/ajrccm.154.6.8970383. PMID: 8970383.
- Wardyn JD, Ponsford AH, Sanderson CM. Dissecting molecular cross-talk between Nrf2 and NF- κ B response pathways. *Biochem Soc Trans.* 2015 Aug;43(4):621-6. doi: 10.1042/BST20150014. Epub 2015 Aug 3. PMID: 26551702; PMCID: PMC4613495.
- Wardyn JD, Ponsford AH, Sanderson CM. Dissecting molecular cross-talk between Nrf2 and NF- κ B response pathways. *Biochem Soc Trans.* 2015 Aug;43(4):621-6. doi: 10.1042/BST20150014. Epub 2015 Aug 3. PMID: 26551702; PMCID: PMC4613495.
- Weinhold B. Epigenetics: the science of change. *Environ Health Perspect.* 2006 Mar;114(3):A160-7. doi: 10.1289/ehp.114-a160. PMID: 16507447; PMCID: PMC1392256.
- Whitsett, J.A., 2018. Airway Epithelial Differentiation and Mucociliary Clearance. *Ann. Am. Thorac. Soc.* 15, S143–S148. <https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.201802-128AW>
- Widdicombe, J.G., 1997. Airway Surface Liquid: Concepts and Measurements, in: Rogers, D.F., Lethem, M.I. (Eds.), *Airway Mucus: Basic Mechanisms and Clinical Perspectives*. Birkhäuser Basel, Basel, pp. 1–17. https://doi.org/10.1007/978-3-0348-8874-5_1
- Wittczak, T., Dudek, W., Walusiak-Skorupa, J., Świerczyńska-Machura, D., Cader, W., Kowalczyk, M., Pałczyński, C., 2012. Metal-induced asthma and chest X-ray changes in welders. *Int. J. Occup. Med. Environ. Health* 25. <https://doi.org/10.2478/s13382-012-0031-9>
- Wolf, C., Pirich, C., Waldhoer, T., Vallic, E., 1997. Pulmonary function and symptoms of welders. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 69, 350–353. <https://doi.org/10.1007/s004200050159>
- Wolffe, A.P., Matzke, M.A., 1999. Epigenetics: Regulation Through Repression. *Science* 286, 481–486. <https://doi.org/10.1126/science.286.5439.481>
- Wright, J.R., 2005. Immunoregulatory functions of surfactant proteins. *Nat. Rev. Immunol.* 5, 58–68. <https://doi.org/10.1038/nri1528>
- Xu X, Wells A, Padilla MT, Kato K, Kim KC, Lin Y. A signaling pathway consisting of miR-551b, catalase and MUC1 contributes to acquired apoptosis resistance and chemoresistance. *Carcinogenesis.* 2014 Nov;35(11):2457-66. doi: 10.1093/carcin/bgu159. Epub 2014 Aug 1. PMID: 25085901; PMCID: PMC4216053.
- Yildirim M, Ersatir M, Arslan B, Gıray ES. Cytotoxic and apoptotic potential of some coumarin and 2-amino-3-carbonitrile selenophene derivatives in prostate cancer. *Turk J Chem.* 2021 Feb 17;45(1):192-198. doi: 10.3906/kim-2008-56. PMID: 33737857; PMCID: PMC7955924.
- Zeidler-Erdely PC, Kashon ML, Li S, Antonini JM. Response of the mouse lung transcriptome to welding fume: effects of stainless and mild steel fumes on lung gene expression in A/J and C57BL/6J mice. *Respir Res.* 2010 Jun 3;11(1):70. doi: 10.1186/1465-9921-11-70. PMID: 20525249; PMCID: PMC2892448.
- Zeidler-Erdely, P.C., Falcone, L.M., Antonini, J.M., 2019. Influence of welding fume metal composition on lung toxicity and tumor formation in experimental animal models. *J. Occup. Environ. Hyg.* 16, 372–377. <https://doi.org/10.1080/15459624.2019.1587172>
- Zuo, L., Zhou, T., Pannell, B.K., Ziegler, A.C., Best, T.M., 2015. Biological and physiological role of reactive oxygen species - the good, the bad and the ugly. *Acta Physiol.* 214, 329–348. <https://doi.org/10.1111/apha.12515>

RESUME

La fraction particulaire des fumées de soudage (FS) a très récemment été suspectée d'être l'un des acteurs majeurs de leurs effets néfastes sur la santé humaine. Cependant, à ce jour, la toxicité de cette fraction n'a pas encore été étudiée de manière approfondie. Notre travail de thèse a consisté à caractériser la fraction ultrafine des FS émises par le soudage à l'arc de l'acier inoxydable et à étudier, dans un modèle de cellules épithéliales bronchiques humaines (BEAS-2B), les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans sa toxicité pulmonaire. Les particules ultrafines (PUF), générées par le soudage à l'arc de l'acier inoxydable, avaient des caractéristiques physico-chimiques proches de celles généralement rencontrées en milieu professionnel. Nos résultats ont clairement démontré le rôle crucial joué par les PUF des FS, très riche en métaux, dans la production d'un stress oxydant, causant des dommages oxydatifs, des altérations génétiques et épigénétiques, et activant certaines voies de signalisation cellulaire critiques. Ils ont aussi souligné l'urgence d'inclure les PUF des FS dans les futures normes de qualité de l'air.

Mots Clés : fumées de soudage, exposition professionnelle, toxicité, stress oxydant, altérations épigénétiques, voies de signalisations

ABSTRACT

The particulate fraction of welding fumes (WF) has very recently been suspected to be one of the major contributors to their harmful effects on human health. However, to date, the toxicity of this fraction has not yet been fully deciphered. This work attempted to better characterize the ultrafine fraction of WF emitted by arc welding of stainless steel and to better study, in human bronchial epithelial cells (BEAS-2B), the cellular and molecular mechanisms involved in its lung toxicity. Ultrafine particles (UFP), generated by arc welding of stainless steel, had physicochemical characteristics close to those generally encountered in the workplace. Our relevant results clearly demonstrated the crucial role played by the metal-rich UFP of WF in the production of oxidative stress, causing oxidative damage to all the macromolecules, and genetic and epigenetic alterations, and activating certain critical cell signaling pathways. They also underlined the urgent need to include UFP in future air quality standards.

Keywords : welding fumes, occupational exposure, toxicity, oxidative stress, epigenetic alterations, signaling pathways