



HAL
open science

Particule fines et ultrafines issues de la combustion de carburants pétroliers et biocarburants de seconde génération : Etude comparative de caractéristiques physico-chimiques et toxicologiques in vitro

Ana Teresa Juarez-Facio

► To cite this version:

Ana Teresa Juarez-Facio. Particule fines et ultrafines issues de la combustion de carburants pétroliers et biocarburants de seconde génération : Etude comparative de caractéristiques physico-chimiques et toxicologiques in vitro. Sciences agricoles. Normandie Université, 2021. Français. NNT : 2021NORMR040 . tel-03885092

HAL Id: tel-03885092

<https://theses.hal.science/tel-03885092>

Submitted on 5 Dec 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.



Normandie Université

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Préparée au sein de l'Université de Rouen Normandie

Particules fines et ultrafines issues de la combustion de carburants pétroliers et biocarburants de deuxième génération : étude comparative des caractéristiques physico-chimiques et toxicologiques *in vitro*

**Présentée et soutenue par
Ana Teresa JUAREZ FACIO**

**Thèse soutenue publiquement le 24 juin 2021
devant le jury composé de**

| | | |
|------------------------|---|--------------------|
| Mme Françoise PONS | Professeur des Universités, Université de Strasbourg | Rapporteur |
| M. Dominique COURCOT | Professeur des Universités, Université du Littoral Côte d'Opale | Rapporteur |
| M. Denis BEMER | Ingénieur d'études, INRS | Examinateur |
| Mme Sophie ACHARD | Maître de Conférences, Université de Pharmacie de Paris | Examinatrice |
| M. Jérôme YON | Maître de Conférences, Université de Rouen Normandie | Examinateur |
| Mme Christelle MONTEIL | Professeur des Universités, Université de Rouen Normandie | Examinatrice |
| M. Jean-Marie VAUGEOIS | Professeur des Universités, Université de Rouen Normandie | Directeur de thèse |

Thèse dirigée par Jean-Marie VAUGEOIS, laboratoire EA-4651 ABTE-ToxEMAC



Normande de Biologie Intégrative,
Santé, Environnement



À Benoît,

“Nothing in life is to be feared, it is only to be understood. Now is the time to understand more, so that we may fear less”

Marie Curie

Remerciements

Je tiens à remercier tout d'abord les membres du jury pour avoir accepté d'évaluer mon travail. Merci aux Professeurs **Françoise Pons** et **Dominique Courcot** pour avoir accepté d'analyser mon travail en tant que rapporteurs. Je leur suis reconnaissante du temps accordé pour la lecture critique de ce manuscrit. Je suis également très honorée de compter parmi mon jury de thèse le **Dr. Denis Bremer** et le **Dr. Sophie Achard**.

Je tiens à remercier chaleureusement **Christelle Monteil**, directrice de l'équipe ToxEMAC, pour la confiance qu'elle m'a témoigné en me confiant ce projet au sein de cette sympathique équipe, la liberté qu'elle m'a donné dans la pratique de mon travail de recherche et son management très humain. Merci aussi pour les moments qu'elle a su m'accorder quand cela était nécessaire, et cela malgré un emploi du temps très chargé.

J'adresse également mes remerciements à mon directeur de thèse **Jean-Marie Vaugeois** pour sa bienveillance, ses conseils et ses avis toujours enrichissants qu'il m'a apportés.

Je souhaite remercier **Jérôme Yon** pour m'avoir fait découvrir le merveilleux monde des suies, pour ses conseils, sa disponibilité et sa bonne humeur. Merci aussi de m'avoir aidé à trouver des solutions quand je n'y arrivais pas. Mil gracias.

Un grand merci à **Cécile Corbière** et à **Tiphaine Rogez** pour leur disponibilité, leur aide lors de l'analyse de résultats et pour tous leurs conseils lors de divers problèmes que j'ai pu rencontrer pendant ma thèse.

Je souhaite remercier aussi l'**ADEME** et la **Région Normandie** pour le financement de ma thèse.

Je remercie **Mme Hélène Desqueyroux** et **M. Laurent Gagnepain** pour leur accompagnement tout au long de ma thèse.

Je remercie les collaborateurs du projet PUFBIO pour ce beau travail que nous avons fait ensemble. Au laboratoire **COBRA** pour les analyses chimiques réalisées, au **GPM** et plus particulièrement à **Laurence Chevalier** pour la partie microscopie de ma thèse. Au laboratoire **CORIA** pour l'accueil bienveillant dans ses locaux et pour m'avoir grandement facilité l'utilisation et la mise en place de la salle d'expériences. Merci à tous pour les réunions enrichissantes et les relectures et corrections pour les publications. Sans votre collaboration, ce travail n'aurait pas été possible.

A **Cathy Logie** pour son aide précieuse et indispensable dans les PCRs.

Je souhaite remercier aussi **Bruno** et **Thierry** de l'atelier du CORIA pour leur aide dans l'installation de la salle d'expériences.

Merci pour leur sympathie, leur aide et les nombreuses petites discussions à tous les étudiants, stagiaires, thésards et ATER que j'ai rencontré au cours de ces 4 années au sein du laboratoire ToxEMAC : **Claire, Ahmed, Marion, Alexane, Julien, Kilolo, Erwan, Guewen, Kelly...** Un très grand merci à **Violaine**, amie thésarde, pour ses papotages et ses conseils culinaires, bon courage pour la fin de ta thèse. A **Clémence** pour sa précieuse aide dans les manips de la fin de ma thèse. Merci à tous pour les gâteaux, les apéros et surtout la bonne ambiance de travail au sein de l'équipe.

A mes amies en France et au Mexique pour leur soutien. Merci à mon gang latino-américain, et surtout à **Tere, José, Andreina** et **Wilson**, pour avoir rendu mon passage à Rouen plus agréable.

Je souhaite remercier ma famille au Mexique et ma famille française (mes Cailloux) qui m'ont soutenue tout le long de ce travail, notamment lors des moments difficiles. Merci.

Un immense merci à **Ben** qui m'a soutenue et « supportée » au quotidien. Je n'aurai pas eu la force d'aller jusqu'au bout sans toi. Merci.

Merci à tous ceux qui m'ont aidée de quelque façon que ce soit, de près comme de loin.

Soutien financier

Ce doctorat s'inscrit dans le cadre du projet PUFBIO, financé par l'Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail (ANSES) dans le cadre du Programme Environnement Santé Travail avec le soutien des ministères chargés de l'écologie et du travail (EST/2017/1/190). Le travail de microscopie réalisé durant ce projet a été financé par la Région Normandie et l'Union Européenne dans le cadre du ERD-ESF (Projet CELLSTEM). La thèse a été co-financée par l'Agence de la Transition Ecologique (ADEME) et la Région Normandie.



UNION EUROPÉENNE



Table des matières

| | |
|--|-----------|
| Liste des illustrations..... | 3 |
| Liste des tableaux..... | 5 |
| Liste des abréviations | 6 |
| Avant -propos | 9 |
| Etat de l'art | 11 |
| 1. Pollution atmosphérique..... | 13 |
| 1.1 Définition et historique | 13 |
| 1.2 Polluants atmosphériques..... | 14 |
| 1.3 Effets de la pollution atmosphérique sur la santé..... | 17 |
| 1.3.1 Polluants atmosphériques et effets sur la santé | 17 |
| 1.4 Règlementation des émissions de particules | 21 |
| 2. Pollution particulaire : particules fines et ultrafines | 23 |
| 2.1 Caractéristiques physicochimiques des PF et PUF issues de sources anthropiques | 23 |
| 2.1.1 Sources et formation..... | 23 |
| 2.1.2 Composition de PF et PUF | 25 |
| 2.1.3 Taille de particules et distribution dans l'arbre respiratoire..... | 26 |
| 2.1.4 Surface spécifique | 28 |
| 2.1.5 Potentiel oxydant de particules | 29 |
| 2.2 Effets de particules fines et ultrafines sur la santé..... | 32 |
| 2.2.1 Etudes épidémiologiques | 32 |
| 2.2.2 Etudes contrôlées chez l'Homme(cliniques) | 33 |
| 2.2.3 Etudes expérimentales <i>in vitro et in vivo</i> | 34 |
| 2.2.4 Effets respiratoires au niveau bronchique | 35 |
| 2.2.4.1 Asthme | 36 |
| 2.2.4.2 Broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO)..... | 36 |
| 2.2.4.3 Cancer du poumon | 36 |
| 2.3 Technologies pour le contrôle d'émissions : les biocarburants | 37 |
| 2.3.1 Définition | 37 |
| 2.3.2 Biocarburants de première génération | 38 |
| 2.3.3 Biocarburants de deuxième génération | 39 |
| 2.3.4 Biocarburants de troisième génération | 41 |
| 2.3.5 Emissions gazeuses et particulaires | 41 |

| | |
|--|------------|
| 3. Approches <i>in vitro</i> pour l'étude de la toxicité respiratoire de particules fines et ultrafines | 46 |
| 3.1 L'épithélium pulmonaire | 46 |
| 3.2 Méthodes d'évaluation toxicologique <i>in vitro</i> pour l'étude de PF et PUF..... | 48 |
| 3.2.1 Modèles cellulaires | 48 |
| 3.2.1.1 Les lignées cellulaires | 48 |
| 3.2.1.2 La culture de cellules primaires..... | 49 |
| 3.2.1.3 Culture à l'interface air-liquide..... | 50 |
| 3.2.1.4 « Organ on a chip » – Organe sur une puce | 51 |
| 3.2.2 Méthodes d'exposition | 54 |
| 3.2.2.1 Système d'exposition Vitrocell ® | 56 |
| 3.3 Apport des modèles <i>in vitro</i> dans l'étude des mécanismes impliqués dans la toxicité des PF et PUF | 57 |
| 3.3.1 Stress oxydant et inflammation | 57 |
| 3.3.2 Dysfonction mitochondriale..... | 63 |
| 3.3.3 Métabolisme de xénobiotiques..... | 65 |
| 3.3.4 Etudes <i>in vitro</i> à l'IAL des particules de combustion..... | 68 |
| Objectifs de la thèse..... | 73 |
| Résultats | 77 |
| Article n°1..... | 81 |
| Article n°2..... | 99 |
| Article n°3..... | 123 |
| Discussion générale..... | 141 |
| Conclusion et perspectives | 153 |
| Communications scientifiques | 157 |
| Annexes..... | 159 |
| Références | 171 |

Liste des illustrations

| | |
|--|----|
| Figure 1. Photo du Tower Bridge à Londres à travers le smog © HULTON GETTY..... | 14 |
| Figure 2. Emissions de polluants atmosphériques en France (1990-2018)..... | 16 |
| Figure 3. Distribution de particules en fonction de leur taille (Kwon et al. 2020)..... | 25 |
| Figure 4. Prédiction du dépôt de particules dans le système respiratoire en fonction de la taille de particule (Oberdörster et al.,2005). | 27 |
| Figure 5. Consommation mondiale d'énergie dans les transports routiers en 2017 | 37 |
| Figure 6. Techniques de production de biocarburants de première génération (Source : IFP Energies nouvelles)..... | 39 |
| Figure 7. Techniques de production de biocarburants de deuxième génération | 41 |
| Figure 8. Réduction de l'émission de gaz à effet de serre de biocarburants comparés au carburants fossiles (Chen et al., 2019)..... | 42 |
| Figure 9. Emissions de NOx du diesel pur et 16% et 8% de butanol à trois pressions moyenne effective (BPME) et deux vitesses (1200 et 1500 rpm) (Chen et al., 2019). | 42 |
| Figure 10. Emissions de hydrocarbures de diesel, 5% Ethanol, 10 % Ethanol et 15% Ethanol à trois pressions moyennes effectives (Rakopoulos et al., 2007). | 43 |
| Figure 11. Concentration massique de PM2.5, teneurs en carbone élémentaire (EC) et carbone organique (OC) et ratios EC/OC | 45 |
| Figure 12. Schéma des voies respiratoires | 46 |
| Figure 13. Schéma des principaux types cellulaires retrouvés dans l'épithélium broncho-pulmonaire. | 47 |
| Figure 14. Diagramme de la différenciation de cellules NHBE à l'Interface Air-Liquide (IAL). | 49 |
| Figure 15. Différents modes d'exposition in vitro aux particules (Adapté du Vitrocell®.com)..... | 55 |
| Figure 16. Schéma du module d'exposition VITROCELL® | 56 |
| Figure 17. Mécanismes d'action cellulaires impliqués dans la toxicité de PF et PUF | 57 |
| Figure 18. Balance représentant le stress oxydant..... | 58 |
| Figure 19. Différentes étapes du modèle stress oxydant..... | 58 |
| Figure 20. Mécanismes de formation de EROs par les polluants atmosphériques. | 59 |
| Figure 21. Induction du stress oxydant par les particules et rôle dans la réponse inflammatoire pulmonaire..... | 61 |

| | |
|---|----|
| Figure 22. (A) Sources des substrats pour la respiration mitochondriale et (B) Phosphorylation mitochondriale (OXPHOS)..... | 64 |
| Figure 23. Voie de signalisation du AhR..... | 66 |
| Figure 24. AhR et stress oxydant. | 67 |
| Figure 25. Stratégie expérimentale..... | 76 |

Liste des tableaux

| | |
|---|----|
| Tableau 1. Principaux polluants atmosphériques, état physique et sources d'émission (IARC, 2016) | 15 |
| Tableau 2. Valeurs limites des concentrations moyennes journalières de particules..... | 21 |
| Tableau 3. Normes Européennes d'émission (Normes Euro) : valeurs limites pour les véhicules particuliers à essence. Valeurs exprimées, sauf PN, en g/Km..... | 22 |
| Tableau 4. Normes Européennes d'émission (Normes Euro) : valeurs limites pour les véhicules particuliers à diesel..... | 22 |
| Tableau 5. Composition de particules. | 26 |
| Tableau 6. Comparaison de différents paramètres des particules | 28 |
| Tableau 7. Composition élémentaire de trois biomasses de référence..... | 40 |
| Tableau 8. Test acellulaires pour mesurer le potentiel oxydant des particules. | 30 |
| Tableau 9. Principaux types cellulaires de l'épithélium broncho-pulmonaire | 50 |
| Tableau 10. Modèles d'épithélium pulmonaire utilisés pour étudier la toxicité de particules. | 52 |
| Tableau 11. Bilan des études pour évaluer les propriétés toxicologiques de particules de combustion sur des modèles cellulaires à l'interface air-liquide..... | 70 |

Liste des abréviations

AA : Acide ascorbique

ABTE : Aliments Bioprocédés Toxicologie de l'Environnement

ADNc : ADN complémentaire

ADNm : ADN mitochondrial

ADP : Adénosine Diphosphate

AhR : Aryl Hydrocarbon Receptor

ARNm : ARN messenger

ATP : Adénosine Triphosphate

B(a)P : Benzo (a) pyrene

BC : Black carbon (carbone de suie)

BEAS-2B : Bronchial Epithelium transformed with Ad12-SV40 2B

BPCO : Broncho Pneumopathie Chronique Obstructive

CIRC : Centre International de Recherche sur le Cancer

CITEPA : Centre Interprofessionnel Technique d'Etudes de la Pollution Atmosphérique

CO : Monoxyde de carbone

COV : Composé organique volatil

CYP : Cytochrome P450

DEP : Diesel exhaust particles (Particules d'échappement diesel)

DTT : Dithiotreitol

DTNB : 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzonic acid)

EDTA : Ethylene Diamine Tetraacetic Acid

EC : Elemental carbon (carbone élémentaire)

EROs : Espèces réactives de l'oxygène

GC-MS : Chromatographie en phase gazeuse – spectrométrie de masse

GSH : Glutathion réduit

HAP : Hydrocarbure aromatique polycyclique

HMOX1: Hème oxygénase 1

HO-1 : Hème oxygénase 1

HPLC : High Performance Liquid Chromatography

IAL : Interface Air Liquide

ICP-MS : Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry

IR : Ischémie-reperfusion

LDH : Lactate déshydrogénase

MTT : 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide

MUC5AC : Mucine 5AC

NADPH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide

NF- κ B : Nuclear Factor-Kappa B

NHBE : Normal Human Bronchial Epithelial cells

NO_x : Oxydes d'azote

NP : Nanoparticules
NQO1 : NAD(P)H Quinone Dehydrogenase 1
NRF2 : Nuclear factor erythroid-2-Related Factor 2
NSCLC : Non-small cell lung cancer
O₂•⁻ : Anion Superoxyde
O₃ : Ozone
OC : Organic carbon (carbone organique)
OCR : Oxygen Consumption Rate
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
OXPHOS : Phosphorylation Oxydative
PBECs : Primary bronchial epithelial cells
PBS : Phosphate Buffered Saline
PCR : Polymerase Chain Reaction
PF : Particules Fines
PM : Particulate Matter
PM_{2.5} : Particules ≤ 2.5 µm
PM₁₀ : Particules ≤ 10 µm
PO : Potentiel oxydant
PPS : Pegasor Particle Sensor
PUF : Particules Ultrafines
QCM : Quartz Crystal Microbalance
SOD : Superoxyde Dismutase
SO₂ : Dioxyde de soufre
SOX : Oxydes de soufre
STAT : Signal Transducer and Activator of Transcription
TEOM : Tempered Oscillant Microbalance
TIO₂ : Dioxyde de Titane
ToxEMAC : Toxicologie de l'Environnement : Milieux Aériens et Cancers
ZO-1 : Zona Occludens-1

Avant -propos

La pollution particulaire constitue aujourd'hui un enjeu sanitaire majeur. En effet, elle est associée au développement de maladies respiratoires et cardiovasculaires ainsi qu'à certains cancers. Parmi les différentes fractions, les particules fines ($PM_{2.5}$) et plus encore les particules ultrafines ($PM_{0.1}$), soulèvent une préoccupation croissante. En raison de leur taille, elles peuvent atteindre les voies respiratoires profondes et se retrouver dans d'autres organes via la circulation sanguine. Plusieurs études épidémiologiques ont montré qu'une exposition à des faibles concentrations de ces particules pourrait induire des conséquences sur la santé à court et à long terme. En milieu urbain, le trafic routier est leur principal émetteur. Par ailleurs, les émissions de diesel et d'essence ont été classifiées respectivement comme cancérigènes (groupe 1) et probablement cancérigènes (groupe 2). Aujourd'hui, les transports automobiles utilisent majoritairement des carburants fossiles, carburants qui ne sont pas renouvelables. De ce fait, le développement de nouveaux carburants comme les biocarburants de seconde génération, c'est-à-dire qui ne rentrent pas en compétition avec les usages alimentaires, pourraient contribuer à diminuer l'utilisation des carburants fossiles et leurs émissions toxiques, tout en préservant les ressources alimentaires utilisées pour la fabrication des biocarburants actuels (biocarburants de première génération). Malheureusement, en termes d'effets sanitaires, il existe encore très peu d'études qui s'intéressent aux produits de combustion de ces nouveaux biocarburants.

Dans ce contexte, l'objectif général de ce travail de thèse est d'évaluer la toxicité de particules fines et ultrafines produites lors de la combustion de carburants pétroliers et de biocarburants de seconde génération (B2G), pour des conditions de combustion et d'exposition parfaitement contrôlées, représentatives de l'exposition humaine.

Ma thèse a été réalisée au sein du laboratoire ABTE, dans l'équipe ToxEMAC en étroite collaboration avec les laboratoires CORIA et COBRA qui ont une expertise dans la génération et la caractérisation de particules. Cette thèse s'inscrit dans le projet PUF BIO financé par l'Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'environnement et du Travail (ANSES). Il a également été co-financé par la Région Normandie dans le cadre du projet CellSTEM ayant permis des développements en microscopie électronique réalisés par le GPM.

La première partie de mon travail de thèse a été consacrée au développement d'un protocole d'exposition de cellules pulmonaires adapté à l'étude de particules primaires de combustion, produites de façon reproductible et standardisée, et représentatives de particules issues du trafic routier. Ce protocole a permis la génération et la caractérisation de ces particules ainsi que l'exposition simultanément aux cellules en culture. Une fois validé, ce protocole a permis l'étude du profil de réponse toxique de particules ultrafines riches en carbone organique. La dernière partie de ce travail a été dédiée à l'étude comparative de l'influence du carburant utilisé sur la composition physico-chimique et le profil de réponse toxique observé après exposition aux particules fines et ultrafines.

Ce mémoire est divisé en trois chapitres. Le premier chapitre est consacré à un état de l'art qui comprend des informations sur la composition des PM, sources, effets de PM sur la santé, et principaux mécanismes d'action. Dans le deuxième chapitre, la méthodologie ainsi que les résultats sont présentées sous forme d'articles et finalement, le troisième chapitre présente une discussion générale.

Etat de l'art

1. Pollution atmosphérique

1.1 Définition et historique

La pollution atmosphérique représente un problème environnemental mondial qui affecte la santé publique, notamment celle des personnes sensibles et à risque comme les enfants, les personnes âgées et les personnes ayant des problèmes respiratoires. La pollution atmosphérique, classée cancérigène avéré pour l'Homme (groupe 1) par le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC), a été responsable de 8.8 millions de morts en 2015 (Lelieveld et al., 2019). Une corrélation entre la pollution de l'air et le développement de maladies respiratoires et cardiovasculaires ainsi que de différents types de cancers a été mise en évidence par de nombreuses études scientifiques (Brook et al. 2010 ; Bowatte et al. 2018 ; Graber et al. 2019 ; Raaschou-Nielsen et al. 2013).

La pollution atmosphérique se définit, en droit français, comme « *l'introduction par l'homme, directement ou indirectement, dans l'atmosphère et les espaces clos, de substances ayant des conséquences préjudiciables de nature à mettre en danger la santé humaine, à nuire aux ressources biologiques et aux écosystèmes, à influencer sur les changements climatiques, à détériorer les biens matériels, à provoquer des nuisances olfactives* » (Loi n° 96-1236 du 30 décembre 1996 sur l'air et l'utilisation rationnelle de l'énergie). D'après l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), la pollution de l'air est définie comme la contamination de l'environnement intérieur ou extérieur par un agent chimique, physique ou biologique qui modifie les caractéristiques naturelles de l'atmosphère (OMS | Pollution de l'air).

Plusieurs épisodes catastrophiques dans l'histoire ont montré l'effet de la pollution atmosphérique sur la santé, tels que les brouillards toxiques de la Vallée de la Meuse en 1930 (Nemery et al., 2001) ou le grand *smog* (contraction des mots anglais *smoke*, fumée, et *fog*, brouillard) de Londres qui a eu lieu en décembre 1952 (**Figure 1**). Au cours de ce dernier, la météo particulièrement froide avec très peu de vent et un taux d'humidité important ont favorisé l'accumulation des polluants issus de l'activité industrielle intensive et du chauffage domestique (combustion de bois et charbon), provoquant ainsi un épais brouillard composé d'oxydes de soufre (SO_x), d'oxydes de carbone (CO_x) et de particules en suspension (PM). Cet épisode a entraîné plus de 12 000 décès suite à des bronchopathies ainsi que des pathologies cardiaques (Mullins s. d.; Hunt et al. 2003 ;

Fenger 2009 ; Bell et Davis 2001). Le bilan de ces épisodes a contribué à une prise de conscience sur les effets sur la santé de polluants atmosphériques ainsi qu'à l'adoption de réglementations sur la qualité de l'air dans plusieurs pays : le *Clean Air Act* en 1956 en Angleterre, en 1963 aux Etats Unis, et en France la loi du 2 août 1961 relative à la lutte contre les pollutions atmosphériques et les odeurs.



Figure 1. Photo du Tower Bridge à Londres à travers le smog © HULTON GETTY

Grâce à l'adoption de plusieurs directives européennes, les émissions de polluants atmosphériques sont actuellement réglementées. La première directive au niveau européen sur la qualité de l'air a été adoptée en 1980 (EEC,1980). Celle-ci fixait les valeurs limites à ne pas dépasser pour le SO_2 et les particules en suspension afin d'éviter, de prévenir ou de réduire les effets nocifs sur la santé humaine et l'environnement. Elle a été suivie par la directive concernant le plomb (ECC, 1982) et le dioxyde d'azote (EEC, 1985). Les réglementations européennes actuelles se basent sur la directive 2008/50/CE.

1.2 Polluants atmosphériques

Bien que la pollution atmosphérique ait des origines naturelles, comme les éruptions volcaniques, les feux de forêt ou l'érosion, les activités anthropiques, et notamment l'industrie, le transport, l'agriculture et le chauffage résidentiel, sont responsables de la dégradation de la qualité de l'air. La mesure de certains polluants, dont les effets sanitaires sont connus et mesurables, permet d'évaluer la qualité de l'air. Ces polluants sont appelés indicateurs de la pollution et font actuellement l'objet d'une réglementation (Directive 2008/50/CE). Parmi les indicateurs de pollution se trouvent l'ozone (O_3), les oxydes d'azote (NO_x), le dioxyde de soufre (SO_2) et les particules en suspension (PM) (**Tableau 1**).

Tableau 1. Principaux polluants atmosphériques, état physique et sources d'émission (IARC, 2016)

| Polluant | Exemple | Etat physique | Principales sources d'émission |
|--|---|------------------------------|---|
| Oxydants photochimiques | Ozone (O ₃) | Gaz | Produit du NO _x , COVs et CO ainsi que des processus naturels |
| Dioxyde de soufre (SO₂) | SO ₂ | Gaz | Combustion de carburants fossiles, émissions naturelles |
| Monoxyde de carbone (CO) | CO | Gaz | Processus de combustion principalement moteurs à allumage commandé, oxydation des émissions biogéniques de COV |
| Oxydes d'azote (NO_x) | NO ₂ | Gaz | Processus de combustion |
| Polluants atmosphériques dangereux | Benzène, 1,3-butadiène, Formaldéhyde, acides | Gaz | Combustion incomplète, procédés chimiques, utilisation de solvants |
| Mercure (Hg) | Hg ⁰ , méthyl mercure | Gaz et particules | Combustion de charbon, affinage du minerai |
| Plomb (Pb) | Pb | Particules | Combustion de carburants au plomb, manufacture du plomb |
| Particules dont PM_{2,5}, PM₁₀, PM inhalables, TSP | Ions organiques, oxydes de métaux, matière carbonée dont carbone organique (OC) et carbone élémentaire (EC) | Particules (phase condensée) | Tempête de poussières, combustion de carburants fossiles, émissions biogéniques, utilisation de fertilisants, transformation gaz/particules |
| Carbone organique (OC) | Hopanes, stéranes, hydrocarbures aromatiques polycycliques, levoglucosan | Particules | Combustion de carburants fossiles et biomasse, débris végétaux, oxydation de composés organiques gazeux |

CO : Monoxyde de carbone, CE : Carbone élémentaire, Hg⁰ : Mercure élémentaire, NO₂ : Dioxyde d'azote, NO_x : Oxydes d'azote, CO : Carbone organique, PM : Particules en suspension, SO₂ : Dioxyde du soufre, TSP : particules totales en suspension, COVs : Composés organiques volatiles.

Depuis 1990 la majorité des émissions polluantes a fortement diminué (**Figure 2**), grâce notamment à l'évolution de la législation sur la qualité de l'air. En effet, la mise en place des techniques de réduction dans les secteurs de l'industrie, des déchets et des transports ont permis de réduire considérablement les émissions de certains polluants comme le plomb, pour lequel depuis l'arrêt de la distribution de carburants plombés en 2000, son émission a diminué de 97% en 2018. Dans le secteur des transports, les normes européennes d'émission (normes euro), mises en place à partir de 1993, imposent des seuils d'émission à l'échappement des véhicules neufs. Ces mesures réglementaires ont contribué, entre autres, à une diminution de l'émission des particules et des NO_x par les véhicules (ADEME, 2018).

Emissions en base 100 en 1990 - 1990 à 2018

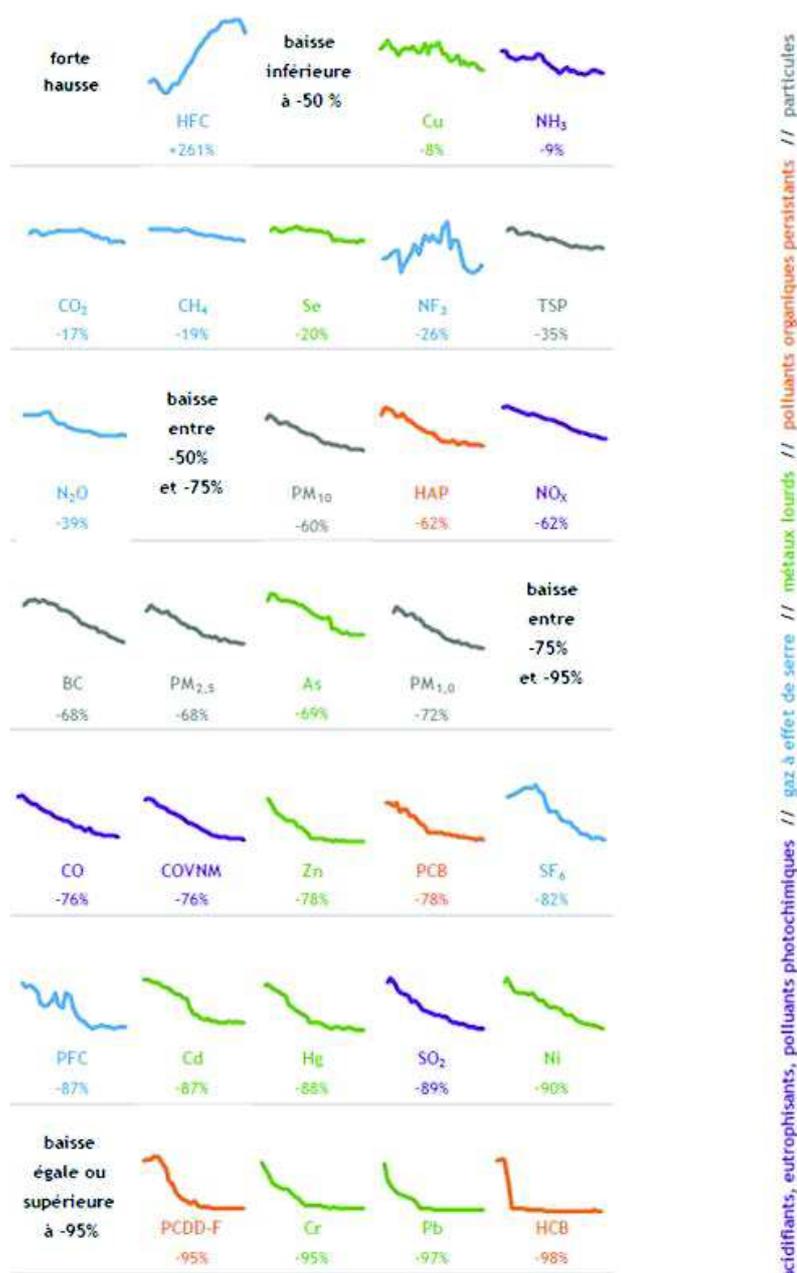


Figure 2. Emissions de polluants atmosphériques en France (1990-2018)

HFC : hydrofluorocarbures, Cu : Cuivre, NH₃ : Ammonium, CO₂ : Dioxyde de carbone, CH₄ : Méthane, Se : Sélénium, NF₃ : Trifluorure d'azote, TSP : Total suspended particles (Particules totales en suspension), N₂O : Protoxyde d'azote, PM₁₀ : Particules grossières (≤ 10 μm), HAP : Hydrocarbures aromatiques polycycliques, NO_x : Oxydes d'azote, BC : Black carbon (carbone suie), PM_{2,5} : Particules fines (≤ 2,5 μm), As : Arsenic, PM₁ : Particules fines (≤ 1 μm), CO : Monoxyde de carbone, COVnm : Composés Organiques Volatiles Non Méthaniques, Zn : Zinc, PCB : Polychlorobiphényl, SF₆ : Hexafluorure de soufre, PFC : Perfluorocarbures, Cd : Cadmium, Hg : Mercure, SO₂ : Dioxyde de Soufre, Ni : Nickel, PCDD-F : Polychlorodibenzodioxine et furane, Cr : Chrome, Pb : Plomb, HCB : Hexachlorobenzène. *Source. Gaz à effet de serre et polluants atmosphériques. Bilan des émissions en France de 1990 à 2018* (CITEPA, 2020).

1.3 Effets de la pollution atmosphérique sur la santé

Les polluants atmosphériques, et notamment les particules représentent un enjeu sanitaire majeur. Les effets néfastes dépendent de la concentration ainsi que du temps d'exposition aux polluants. L'exposition à ces polluants contribue au développement des pathologies cardiovasculaires (infarctus du myocarde, accidents vasculaires cérébraux), respiratoires (asthme, bronchites, cancer du poumon), du système reproducteur (naissances prématurées, baisse de la fertilité masculine), neurologiques ainsi que des cancers. En effet, les impacts sont nombreux et peuvent affecter de nombreux organes (Sivarethinamohan et al., 2020).

En 2016, 8,8 millions de morts prématurées ont été associées à cette pollution (Lelieveld et al., 2019). Cependant, les effets néfastes ne peuvent pas être attribués à des polluants seuls puisque la pollution atmosphérique est un mélange très complexe dont plusieurs facteurs sont impliqués tels que la concentration et le temps d'exposition, le mélange de plusieurs polluants ainsi que des facteurs de risque individuels comme l'âge ou l'état de santé des individus. En effet, l'impact de la pollution atmosphérique est plus important sur certaines populations comme les enfants, les personnes âgées, les femmes enceintes ou bien les patients atteints de maladies respiratoires comme l'asthme ou les BPCO (Broncho-pneumopathies chroniques obstructives).

1.3.1 Polluants atmosphériques et effets sur la santé

Des nombreuses études mettent en évidence le lien entre la pollution de l'air et divers effets sur la santé, à long et à court terme. Dans cette section, une description des sources et d'effets sur la santé des principaux indicateurs de la pollution de l'air extérieur est décrite. Il est à souligner que l'influence d'autres polluants atmosphériques n'est pas bien documentée et pourraient aussi contribuer aux effets globaux.

Ozone (O_3) : A très haute altitude, dans la stratosphère, l'ozone est présent naturellement et absorbe une partie des rayons UV protégeant ainsi les organismes vivants. Dans la troposphère, l'ozone est classé comme polluant secondaire car il est le résultat de la transformation photochimique de l'oxygène au contact d'oxydes d'azote et d'hydrocarbures en présence de rayonnements ultra-violet solaires (CITEPA, 2020; Mohamed et al., 2021). L'ozone est un gaz fortement irritant avec une très faible solubilité

dans l'eau. En raison de ses caractéristiques chimiques, l'exposition à l'ozone survient presque exclusivement par voie respiratoire. Après inhalation, l'ozone est principalement absorbé par les voies respiratoires supérieures et dirigé vers les voies respiratoires inférieures où il se dissout dans la muqueuse épithéliale pouvant former des produits d'oxydation secondaires capables d'induire un stress oxydatif et une réponse inflammatoire et par conséquent, des lésions cellulaires dans le système respiratoire. D'autres conséquences comme une sensibilisation des bronches ou le remodelage des voies respiratoires ont été associées aux modes d'action de l'ozone / à l'exposition à l'ozone (Nuvolone et al., 2018). Une hausse dans les valeurs journalières est associée à une augmentation de la mortalité cardiovasculaire (Pascal et al., 2012; Pattenden et al., 2010)

Oxyde d'azote (NO_x) : La famille des NO_x, comprenant le monoxyde d'azote (NO) et le dioxyde d'azote (NO₂), sont produits principalement par des sources anthropiques mais ils peuvent également se former lors des phénomènes naturels comme les orages, les éruptions volcaniques et les feux de forêts. Concernant les sources anthropiques, la combustion de tout combustible fossile ou de biomasse, dans le secteur du transport routier et du chauffage résidentiel, représente une partie importante de la pollution atmosphérique par les NO_x. Les NO_x participent à la formation d'ozone troposphérique ainsi que des pluies acides. Le NO est le résultat des phénomènes de combustion à hautes températures mais à température ambiante, il s'avère instable et réagit avec l'O₃ troposphérique pour former du NO₂ (INRS 2020; Mohamed et al. 2021 ; Grice et al. 2009). Une exposition à court terme aux NO_x est associée à une morbidité respiratoire comprenant l'altération des systèmes de défense, l'augmentation de l'inflammation pulmonaire et la diminution de la fonction pulmonaire. Des niveaux élevés de NO₂ (> 1500 mg / m³) dans l'air entraînent une réduction de la fonction pulmonaire, des crises d'asthme et des mutations génétiques (Munawer, 2018). Le dépassement des valeurs journalières en NO₂ peut induire une augmentation des hospitalisations pour causes cardio-pulmonaires ainsi qu'une hausse de la mortalité (Dijkema et al., 2016; Khaniabadi et al., 2017). Il est aussi associé au développement des troubles respiratoires, d'infections des voies respiratoires supérieures et de BPCO (Peel et al., 2005). A long terme, des études réalisées au niveau européen montrent une corrélation entre l'exposition au NO₂ et la mortalité respiratoire par emphysème pulmonaire, par asthme ou par pneumonie

(Bentayeb et al., 2015; Kravchenko et al., 2014). Il est également associé à des effets cardiovasculaires (Dai et al., 2015; Karoui et al., 2020).

Dioxyde de soufre (SO₂) : Le dioxyde de soufre (SO₂) est un gaz réactif avec une très forte odeur. Il est rejeté dans l'atmosphère principalement par les activités anthropiques comme la combustion de carburants fossiles, par les transports et dans l'industrie, mais aussi par des sources naturelles comme la décomposition de matière organique, les éruptions volcaniques et feux de forêts. Une exposition à ce gaz peut provoquer une irritation de la muqueuse du tractus respiratoire avec lésions cellulaires et œdèmes laryngotrachéal et pulmonaire. (ANSES, 2013 ; INERIS, 2011 ; INRS, 2006). Le SO₂ s'associe à d'autres polluants comme les particules pour pénétrer dans l'arbre respiratoire où il peut agir avec la muqueuse pulmonaire et former des dérivés du SO₃. Ces dérivés sont libérés dans la circulation sanguine et peuvent entraîner le développement d'un grand nombre de maladies pulmonaires (Hussain et al., 2016) et faciliter des pathologies microbiennes comme la bronchite et la fibrose kystique (Hussain et al., 2013). Des méta-analyses chinoises ont montré qu'à court terme, le SO₂ est associé à des pathologies respiratoires. Il favorise des infections telles que la grippe et des pneumonies. Des expositions à court terme induiraient aussi des naissances prématurées. Les effets à long terme quant à eux sont associés à une hausse de la mortalité respiratoire (Lai et al., 2013; Shang et al., 2013)

Monoxyde de carbone (CO) : Le monoxyde de carbone (CO) est un gaz, inodore et incolore, ubiquitaire dans l'air ambiant et notamment dans les pays développés. La principale source d'émission est l'activité humaine : lors de la combustion incomplète de tout combustible fossile ou de biomasse, dans le trafic routier et le chauffage résidentiel, ainsi que dans les procédés industriels comme dans la métallurgie. Les effets toxiques du CO ont lieu par inhalation. Du fait que le CO présente une forte affinité pour l'hémoglobine, il se fixe à la place de l'oxygène et forme la carboxyhémoglobine dans le sang provoquant une hypoxie tissulaire qui peut se manifester par des maux de tête, des vertiges, des nausées et dans les cas plus graves aller jusqu'à la mort (ANSES, 2007; Cho et al., 2008; Mohamed et al., 2021). Des études montrent qu'une exposition régulière à des forts niveaux de CO (1000–10,000 ppm; 4.16×10^{-5} to 4.16×10^{-4} mol L⁻¹) peut conduire à des effets cardiovasculaires et respiratoires importants (Reboul et al., 2017, 2012). Des effets

sur la reproduction sont associées à une exposition à long terme et à des faibles concentrations de CO (WHO, 2016).

Particules : Les particules atmosphériques constituent un mélange de particules, solides ou liquides, en suspension dans l'air. Aussi connues comme PM, pour « Particulate Matter » en anglais, les particules en suspension ont une composition chimique très variable en fonction de leur source d'émission. Des multiples sources sont à l'origine des particules en suspension : naturelles comme l'érosion éolienne, les éruptions volcaniques et les embruns marins et anthropiques comme la combustion (chauffage résidentiel), le trafic routier ainsi que les procédés industriels. En milieu urbain, les particules sont principalement produites lors de combustion d'énergie fossile et de biomasse, phénomènes que l'on retrouve liés aux secteurs du trafic routier et du chauffage résidentiel. Pendant le vieillissement des particules dans l'atmosphère, d'autres composés comme des métaux, des allergènes et des endotoxines s'y associent.

Elles sont différenciées selon leur diamètre en particules totales en suspension (TSP) qui comprennent l'ensemble de particules quelles que soient leurs tailles, les PM₁₀, pour les particules d'un diamètre aérodynamique égal ou inférieur à 10 µm, les PM_{2,5} ou particules fines (PF) pour les particules d'un diamètre aérodynamique égal ou inférieur à 2,5 µm et les PM_{0,1} ou particules ultrafines (PUF) pour les particules dont le diamètre aérodynamique est égal ou inférieur à 0,1 µm. Le terme nanoparticule (NP) est donné le plus souvent aux particules manufacturées d'un diamètre égal ou inférieur à 0,1 µm (100 nm), exemple les NP de TiO₂.

Les effets sanitaires des particules sont variables en fonction de leur taille et de leur composition. Plus les particules sont fines, plus elles sont dangereuses car elles peuvent atteindre les alvéoles pulmonaires et atteindre d'autres organes. Le passage de particules dans le tractus respiratoire induit le relargage de cytokines et la production d'espèces réactives d'oxygène (EROs) pouvant être à l'origine des pathologies respiratoires comme l'asthme, la BPCO, la fibrose pulmonaire et le cancer (Falcon-Rodriguez et al., 2016).

Les particules de l'air représentent un des principaux composés de la pollution de l'air extérieur et intérieur et leurs effets seraient plus importants sur la santé que les autres polluants (Mannucci et al., 2015). A l'heure actuelle, seulement les PM₁₀ et PM_{2,5} font l'objet de réglementations pour limiter ou réduire leur émission, mais l'attention se porte

de plus en plus sur la fraction ultrafine pour laquelle des études ont montré des effets toxiques importants. Les particules issues du trafic routier ont été les plus documentées en termes toxicologiques. En 2013, le CIRC classait les émissions d'échappement des moteurs diesel comme cancérigènes pour l'Homme (groupe 1) et les émissions d'échappement des moteurs à essence comme possiblement cancérigènes pour l'Homme (groupe 2B). Une approche plus approfondie sur les particules fines et ultrafines, objet principal de ce travail de thèse, est traitée dans la section suivante.

1.4 Règlementation des émissions de particules

Le progrès dans les technologies implémentées sur les transports motorisés, ainsi que sur le développement des nouveaux carburants a permis une diminution des émissions à l'échappement et notamment sur les émissions de particules (Schraufnagel, 2020). Néanmoins, les particules ambiantes restent un des principaux composés de la pollution atmosphérique. Actuellement, des valeurs limites de concentrations réglementées sont fixées, seulement pour PM_{10} et $PM_{2.5}$ au niveau européen et aux Etats Unis (USA) ainsi que des valeurs recommandées sont établies par l'OMS (**Tableau 2**) (Li et al. 2016 ; WHO 2005 ; AIRPARIF 2020).

Tableau 2. Valeurs limites des concentrations moyennes journalières de particules.

| Fraction particulaire | Valeurs limites moyennes journalières ($\mu\text{g}/\text{m}^3$) |
|-----------------------|--|
| PM_{10} | USA : 150 EU : 50 OMS : 50 |
| $PM_{2.5}$ | USA : 35 EU : 20 OMS : 25 |
| $PM_{0.1}$ | USA : Non EU : Non OMS : Non |

Une des sources majeures de particules est le trafic routier. Depuis 1993 les normes européennes d'émission, dites normes Euro, fixent les valeurs limites maximales de rejets de polluants pour les véhicules neufs afin de réduire la pollution atmosphérique due au transport routier. Plusieurs normes existent selon le type de voiture (essence, diesel, particuliers). Le **Tableau 3** montre les limites de taux de polluants fixés pour chaque norme euro pour les véhicules à essence (Dieselnet, 2019) .

Tableau 3. Normes Européennes d'émission (Normes Euro) : valeurs limites pour les véhicules particuliers à essence. Valeurs exprimées, sauf PN, en g/Km.

| Norme | Dates – nouveaux types | CO | HC | HC nm | HC+NOx | NOx | PM | PN |
|---------------|------------------------|------|-----|-------|--------|------|-------|--------------------|
| Euro 1 | 07/1992 | 2,72 | - | - | 0,97 | - | - | - |
| Euro 2 | 01/1996 | 2,2 | - | - | 0,5 | - | - | - |
| Euro 3 | 01/2000 | 2,3 | 0,2 | - | - | 0,15 | - | - |
| Euro 4 | 01/2005 | 1 | 0,1 | - | - | 0,08 | - | - |
| Euro 5 | 09/2009 | 1 | 0,1 | 0,068 | - | 0,06 | 0,005 | - |
| Euro 6 | 09/2014 | 1 | 0,1 | 0,068 | - | 0,06 | 0,005 | 6x10 ¹¹ |

CO : monoxyde de carbone, HC : Hydrocarbures, HC nm : Hydrocarbures non métalliques, NOx : Oxydes d'azote, PM : Particules (masse) et PN : Particules (nombre).

Depuis 2014 la réglementation impose une limite, non seulement de la masse mais aussi du nombre de particules émises. Pour le reste des polluants, une diminution a été imposée au fil des années. Concernant les voitures diesel, dont les émissions en particules sont plus importantes comparées aux voitures essence, des limites plus strictes pour les émissions des particules ont été imposées au cours du temps (**Tableau 4**).

Tableau 4. Normes Européennes d'émission (Normes Euro) : valeurs limites pour les véhicules particuliers à diesel. Valeurs exprimées, sauf PN, en g/Km.

| Norme | Dates – nouveaux types | CO | HC+NOx | NOx | PM | PN |
|----------------|------------------------|------|--------|------|-------|--------------------|
| Euro 1 | 07/1992 | 2,72 | 0,97 | - | 0,14 | - |
| Euro 2 | 01/1996 | 1 | 0,7 | - | 0,08 | - |
| Euro 2 | 01/1996 | 1 | 0,9 | - | 0,1 | - |
| Euro 3 | 01/2000 | 0,64 | 0,56 | 0,15 | 0,05 | - |
| Euro 4 | 01/2005 | 0,5 | 0,3 | 0,25 | 0,025 | - |
| Euro 5a | 09/2009 | 0,5 | 0,23 | 0,18 | 0,005 | - |
| Euro 5a | 09/2011 | 0,5 | 0,23 | 0,18 | 0,005 | 6x10 ¹¹ |
| Euro 6 | 09/2014 | 0,5 | 0,17 | 0,08 | 0,005 | 6x10 ¹¹ |

2. Pollution particulaire : particules fines et ultrafines

En vue des objectifs de cette thèse, une attention particulière est portée aux PF et aux PUF. Les effets sanitaires des PF sont déjà bien documentés depuis plusieurs décennies contrairement aux PUF dont leur étude commence à prendre de l'ampleur. L'analyse bibliographique sur l'exposition particulaire à court et long terme met en évidence des effets cardiovasculaires, respiratoires et sur la reproduction mais d'autres organes comme le cerveau peuvent être également ciblés. Plusieurs facteurs contribuent aux effets sanitaires des particules, notamment leur interaction avec d'autres polluants ou leurs caractéristiques physicochimiques, les PF et PUF représentent aujourd'hui un enjeu sanitaire majeur. La section suivante décrit leurs principales caractéristiques physicochimiques ainsi que leurs effets sur la santé et plus précisément sur le système respiratoire.

2.1 Caractéristiques physicochimiques des PF et PUF issues de sources anthropiques

2.1.1 Sources et formation

Les PF et les PUF présentent une variété de propriétés physicochimiques très dépendantes de la source d'émission. Il est difficile de déterminer laquelle contribue majoritairement aux effets toxiques puisqu'elles peuvent toutes potentiellement y contribuer. Les particules fines et ultrafines sont émises dans l'atmosphère principalement par des sources anthropiques. Dans les zones urbaines, les principales sources sont le trafic routier, surtout par les véhicules diesel mais également les procédés industriels, les procédés à haute température (soudage, métallurgie), la production d'énergie et les incinérateurs, la construction et le chauffage résidentiel. En milieu fermé, comme les maisons et les bureaux, les PF et les PUF peuvent être émises par la combustion de biomasse pour le chauffage ou pour la fabrication des aliments, les bougies et les encens, l'impression laser ainsi que par le tabagisme (Kwon et al., 2020; Li et al., 2016; Oberdörster et al., 2005).

Les particules peuvent se classer selon leur mode de formation en trois types (Obaidullah et al., 2018) :

- Nucléation : Particules formées à partir de molécules à l'état gazeux ou issues de la combustion en moteur. Elles ont une taille de moins de 50 nm. Leur taille augmente avec des processus de condensation avec d'autres gaz ou de coagulation avec d'autres particules.
- Accumulation : Ce mode est constitué de particules dont les diamètres sont compris entre 0,1 et 1 µm. Elles peuvent être produites par le grossissement de noyaux par des processus de condensation ou par coagulation de particules du mode nucléation.
- Mode grossier : Il s'agit des particules de plus grande taille (particules grossières) produites par des processus mécaniques.

La **Figure 3** illustre les différents types de particules en fonction de leur taille et de leur mode de formation. Elle montre également l'évolution des propriétés (nombre de particules, surface spécifique et masse) d'après leur classification. La source d'émission est un facteur majeur qui détermine les caractéristiques des particules. En effet, les particules sont très dynamiques dans l'atmosphère et peuvent subir des transformations à la suite des interactions avec d'autres particules ou d'autres composés. Les PUF, par exemple, se déplacent suivant des mouvements Browniens et augmentent en taille par coagulation et condensation des composés organiques semi volatils (COsV) sur leur surface. Elles ont donc une durée de vie très courte dans l'atmosphère due à ces phénomènes d'agglomération. Leur concentration dans l'air ambiant peut varier aussi selon la distance à la source d'émission. Dans des zones non polluées ou très peu polluées, la concentration de particules peut varier entre 10^2 - 10^4 particules/cm³, tandis que dans des zones urbaines, ces concentrations peuvent aller de 300000-400000 particules/cm³ et ce taux peut augmenter selon la période de l'année (Kwon et al., 2020; Oberdörster et al., 2000).

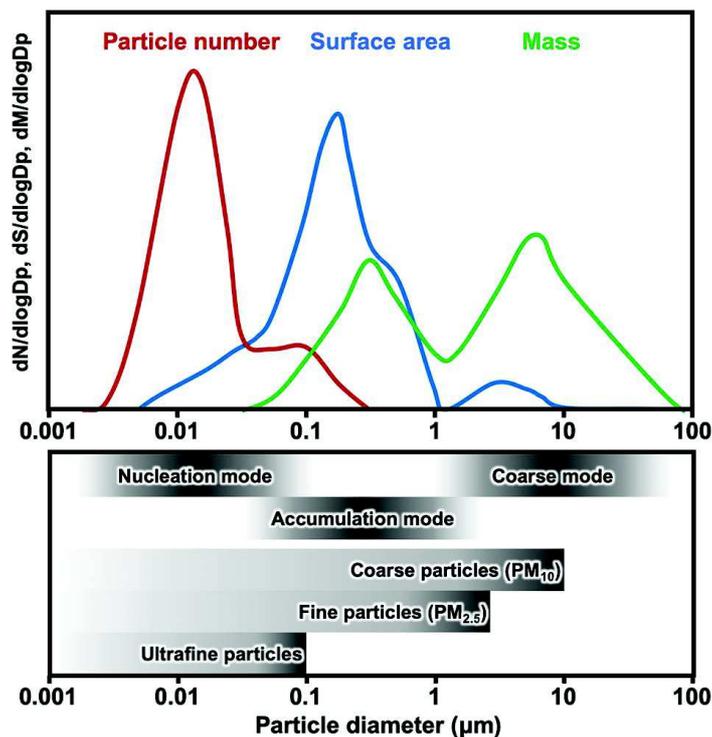


Figure 3. Distribution de particules en fonction de leur taille (Kwon et al. 2020).

Les particules issues de la combustion peuvent également se distinguer en particules primaires et secondaires. Les particules primaires se forment dans la zone de combustion à des températures élevées alors que les particules secondaires se forment à partir de particules primaires et leur interaction avec les composés de l'atmosphère. La combustion incomplète d'un carburant peut donner lieu à deux types de particules primaires : carbone suie et particules organiques. Les particules de suie sont composées de carbone élémentaire et de carbone organique présent en différentes proportions selon le type de carburant et de flamme. Les particules organiques peuvent être présentes à l'état liquide ou gazeux et sont caractéristiques de combustions pauvres en oxygène, donc incomplètes. D'après leur point d'ébullition elles sont typiquement classées en composés organiques volatils (COV), composés organiques semi volatils (COsV) et composés organiques en phase particulaire (Obaidullah et al., 2018).

2.1.2 Composition de PF et PUF

La composition chimique et la distribution spatiotemporelle des particules est très variable en fonction de la source d'émission, la distance à la source et la micro-météorologie. Par exemple, les particules émises par une centrale à charbon sont riches

en minéraux (Na, K, Mg, Ca, Mn, Fe etc.) alors que les particules issues des feux de forêts auront des teneurs en composés organiques et carbone élémentaire plus importantes. Les particules sont constituées, en différentes proportions, par divers composés organiques et inorganiques, biologiques et minéraux ainsi que du carbone de suie (**cf. Tableau 5**) (CITEPA, 2020; Falcon-Rodriguez et al., 2016; Mohamed et al., 2021).

Tableau 5. Composition des particules atmosphériques. Adapté de (Falcon-Rodriguez et al., 2016)

| Composé | Exemple |
|--|--|
| Métaux | K, Ca, Ga, Pb, Sr, Zr, Ba, Na, Li, Be, Ti, Sn, Mg, Al, Cs, Bi, In |
| Métaux de transition | Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Cd, Au, V, Hg, Nb, Tl, Co Mo Zr Rb, Ag |
| Non-métaux | B, As, Se, S, Sb |
| Lanthanides et actinides | Sm, U, Tb, Ce, La |
| Biologique | Glucanes, endotoxines, pollens et virus. |
| Carbone | Carbone organique et carbone élémentaire |
| Hydrocarbures aromatiques polycycliques | (AcPy) acénaphthylène, (Ant) anthracène, (BaA) benzo[a]anthracène, (BaFL) benzo[b]fluoranthène, (BkFL) benzo[k]fluoranthène, (BaP) benzo[a]pyrène, (Bg,h,iP) benzo[ghi]perylène, (Chr) chrysène, (Flu) fluorène, (FI) fluoranthène, (Nap) naphthalène, (InP) indeno[cd]pyrène, (BkF) dibenzo[a,h]anthracène, (Phe) phenanthrène, Pyrène. |
| Autres | Ammonium, sulfates, nitrates, paraformaldéhyde. |

2.1.3 Taille de particules et distribution dans l'arbre respiratoire

La taille joue un rôle important dans les effets toxicologiques des particules car ce paramètre détermine le mode et l'endroit du dépôt des particules dans le système respiratoire (**Figure 4**). Les particules se déposent, dans l'arbre respiratoire, selon cinq types de dépôt : la *sédimentation* liée à la gravité, *l'impaction inertielle* propre aux particules massives, *l'interception* se produit quand une particule entre en contact avec une surface, la diffusion liée au mouvement aléatoire des particules et *l'attraction électrostatique* qui a lieu quand la particule est chargée. Les particules fines se déposent dans les bronches et bronchioles par sédimentation alors que les PUF atteignent les alvéoles par diffusion.

La **Figure 4** montre la fraction déposée après inhalation des particules d'un diamètre donné dans les voies respiratoires : la région extra-thoracique (bouche, fosses nasales, le larynx et le pharynx), l'arbre trachéo-bronchique (de la trachée aux bronches) et la région alvéolaire (bronchioles terminales et alvéoles).

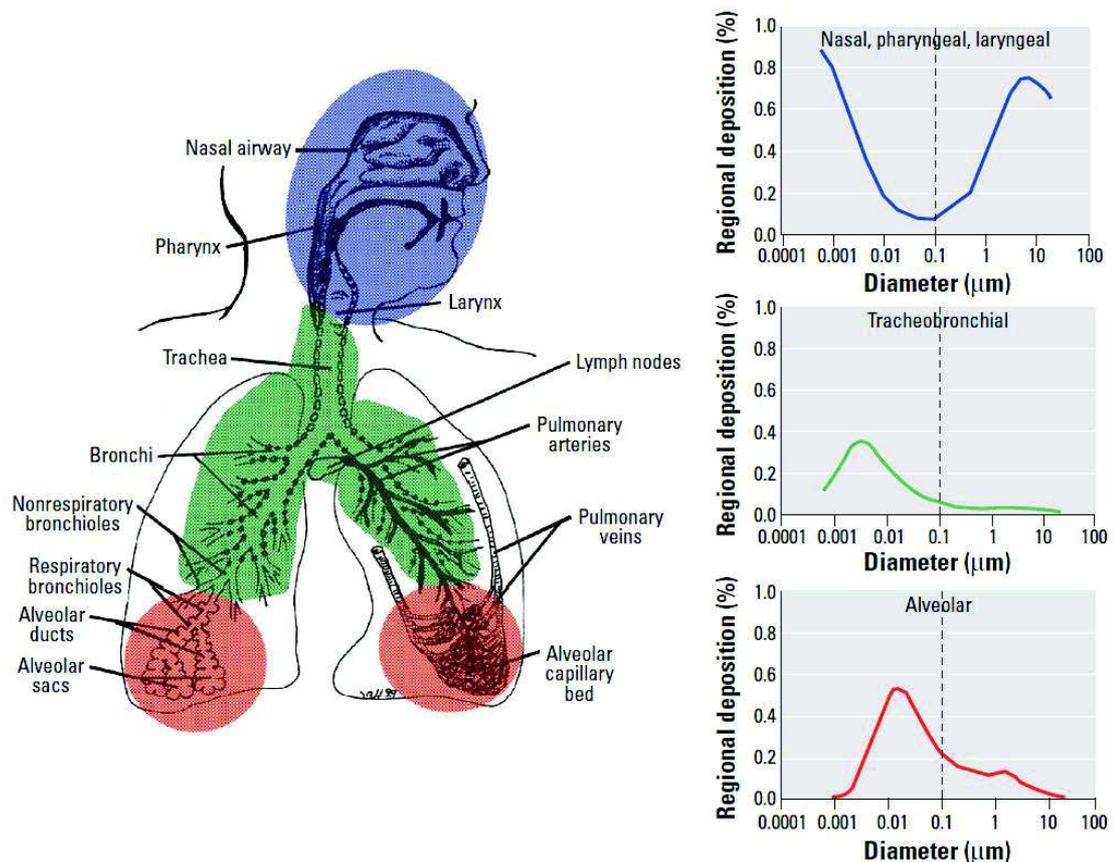


Figure 4. Prédiction du dépôt de particules dans le système respiratoire en fonction de la taille de particule (Oberdörster et al.,2005).

Ainsi donc, pour les particules autour de 300 nm le dépôt est le plus faible puisque les particules sont trop grosses pour que le mécanisme de diffusion ait lieu mais elles sont très petites pour sédimenter. Quant aux PUF, les particules supérieures à 10 nm se déposent principalement dans la région alvéolaire mais celles inférieures à 10 nm se déposent dans la région extra-thoracique et dans la région trachéo-bronchique (Oberdörster et al., 2005; Witschger and Fabriès, 2005).

Une fois dans l'organisme, elles peuvent être évacuées par la clairance mucociliaire, mécanisme de défense assuré par les cellules ciliées et les cellules caliciformes, s'accumuler dans la cellule (Boublil et al., 2013) ou, pour les particules

ultrafines, traverser la barrière épithéliale, et via le système circulatoire, se distribuer dans différents organes tels que le cerveau, le cœur, le foie et la rate (Hameed et al., 2020; Kreyling et al., 2009; Lipka et al., 2010; Liu et al., 2021).

2.1.4 Surface spécifique

Un des paramètres physiques nécessaire à prendre en compte dans les effets pulmonaires et qui est très dépendant de la taille de particules est la surface spécifique qui est définie comme la surface totale d'exposition par unité de masse. Plus les particules sont petites, plus elles ont une surface spécifique élevée. Les particules ultrafines ayant une surface spécifique plus importante adsorbent davantage de composés toxiques comme les métaux et les composés organiques. Prenant en compte uniquement la taille de particules, une étude réalisée par l'équipe d'Oberdörster a montré qu'après instillation intratrachéale de NP de TiO₂ chez des rats et souris, les NP de 20 nm induisent une réponse inflammatoire plus importante que les particules de 250 nm. Ces résultats, obtenus à masse équivalente, sont directement liés à une surface spécifique majeure de particules de 20 nm (Oberdörster et al., 2000).

Le **Tableau 6** résume les principaux paramètres physicochimiques des particules discutés dans cette section. Compte tenu de l'hétérogénéité au sein des différentes fractions, il est indispensable de prendre en compte l'ensemble de caractéristiques des particules pour mieux comprendre leurs effets toxicologiques.

Tableau 6. Comparaison de différents paramètres des particules atmosphériques (Li et al., 2016)

| Paramètre | PM ₁₀ | PM _{2.5} | PM _{0.1} |
|-------------------------------|------------------|-------------------|--|
| Diamètre aérodynamique (µm) | 2,5-10 | 2,5-0.1 | <0.1 |
| Dépôt dans la zone alvéolaire | Non | Non | Oui |
| Ratio surface/masse | + | ++ | +++ |
| Teneur en carbone organique | + | ++ | +++ |
| Teneur en carbone élémentaire | +++ | ++ | + |
| Teneur en métaux | +++ | ++ | + |
| Métrique d'exposition | Masse | Masse | Nombre de particules ou surface spécifique |

2.1.5 Potentiel oxydant de particules

La réglementation actuelle des PM est basée sur la concentration massique et ne tient pas compte de leurs caractéristiques physicochimiques qui sont variables en fonction de la source d'émission. La mesure du potentiel oxydant (PO) des particules peut être utilisée comme un indicateur complémentaire pour prendre en compte leur composition complexe et ainsi prédire leurs effets sanitaires (Borm et al., 2007).

Le PO de particules est un indicateur qui permet de quantifier la capacité intrinsèque de particules à générer des réactions redox qui, avec d'autres mécanismes moléculaires et cellulaires, peuvent donner lieu à un stress oxydant dans la cellule. Le stress oxydant est un mécanisme d'action potentiel qui expliquerait la toxicité des particules. Il se produit quand il y a un excès de EROs par rapport aux systèmes de défense antioxydantes pouvant conduire à l'altération de certaines fonctions cellulaires. Ces espèces peuvent être introduites dans l'organisme via l'inhalation de particules. Cette capacité de générer des EROs est liée à la composition (présence de métaux de transition solubles ainsi que la teneur en composés organiques) et à la surface réactive des particules qui est plus importante pour les particules fines et ultrafines (Crobeddu et al., 2017).

Des études épidémiologiques et expérimentales ont mis en évidence la part du potentiel oxydant des particules sur les effets sanitaires. Ainsi, la mesure de ce paramètre serait plus pertinente que la masse de particules pour évaluer leur toxicité (Bates et al., 2015). Concernant les particules ultrafines, l'équipe de Costabile et al. 2020, s'est intéressée à la réponse inflammatoire et oxydante et leur corrélation avec le PO de cette fraction particulaire. Des réponses plus importantes ont été observées quand les PUF proviennent de la combustion des carburants fossiles où la distribution granulométrique était représentée par les particules d'un diamètre inférieur à 20 nm riches en carbone élémentaire. Ils ont également trouvé que sur les particules d'un diamètre inférieur à 70 nm, plus de 50% de la surface spécifique favorise l'adsorption des molécules organiques. Ces fractions peuvent être distribuées dans différents organes et induire des effets néfastes liés aux dégâts à l'ADN (Costabile et al., 2020).

La mesure du PO a plusieurs avantages car elle intègre différentes variables comme l'activité redox de métaux, l'interaction de métaux, le cycle redox par les composés

organiques complexes et le stress oxydant. La mesure du PO est donc une bonne approche pour prédire la réactivité biologique de particules. Le PO de particules peut être mesuré par plusieurs tests acellulaires décrits comme étant prédictifs de différentes familles chimiques impliquées dans la génération potentielle d'un stress oxydant. Le **Tableau 7** résume les tests utilisés dans la littérature.

Tableau 7. Test acellulaires pour mesurer le potentiel oxydant des particules.

| Test | Description (espèces chimiques détectées) |
|--|--|
| Déplétion de l'AA | Utilisé pour mesurer le potentiel oxydant lié aux métaux de transition ($\cdot\text{OH}$ du H_2O_2) |
| Déplétion du GSH | Estimation de la présence de la plupart de EROs ainsi que les peroxydes, les alcènes, protéines disulfures et acides sulféniques. |
| Congo Red | Radicaux hydroxyles, peroxydes et hydroperoxydes. |
| DCF- DCFH-DA | $\cdot\text{NO}_2$, $\cdot\text{OH}$, ONOO^- , peroxydes, aloxydes et radicaux centrés sur le carbone (alkylradicaux). |
| 2-deoxyribose | $\cdot\text{OH}$ et espèces similaires (utilisés comme substitués pour RPE) |
| DHE | Il peut être spécifique pour $\cdot\text{O}_2$ (nécessite la séparation des produits par HPLC). |
| DTT | Grande variété de radicaux libres et d'espèces réactives. Ils sont réduits par les métaux de transition et les quinones présentes dans les PM. |
| Résonance paramagnétique électronique (RPE) | RPE avec DMPO utilisé comme spin-trap, permet de mesurer la production de $\cdot\text{OH}$. La RPE sans le spin-trap peut aussi être utilisé pour mesurer directement les radicaux de surface sur les particules (mesure les électrons non appariés). |
| Luminol | HOCl , H_2O_2 and ONOO^- |
| Cassures d'ADN plasmique | L'ADN plasmique est ce test, utilisé comme source d'ADN pour évaluer la capacité de toxiques comme les particules à y induire des cassures résultant de lésions oxydatives produites par le radical hydroxyle. |

AA - Acide ascorbique ; DCF – Dichlorofurecine ; DCFH-DA - Dichlorodihydrofurecine diacetate ; DHE – Dihydroethidium ; DMPO - 5,5-dimethyl-pyrroline N-oxyde ; DTT – Dithiothreitol ; ERO - Espèces réactives de l'oxygène ; GSH - glutathion réduit ; H_2O_2 – Peroxyde d'hydrogène ; HOCl - Acide hypochloreux ; HPLC - Chromatographie en phase liquide à haute performance ; MDA – Malondialdéhyde ; $\cdot\text{NO}_2$ – Dioxyde d'azote ; $\cdot\text{O}_2^-$ – ion superoxyde ; $\cdot\text{OH}$ - radical hydroxyl ; ONOO^- - Peroxinitrite ; PM – Particules en suspension ; RPE - Résonance paramagnétique électronique. Adapté de (Crobeddu et al., 2017; Øvrevik, 2019).

Les tests acellulaires permettent d'utiliser une grande gamme de concentrations de particules, ils sont généralement plus rapides et moins coûteux à réaliser. Cependant, les résultats peuvent varier selon le test utilisé (Bates et al., 2019). En effet, la sensibilité des méthodes dépend des caractéristiques des particules : composition, vieillissement photochimique, volatilité et pH mais aussi des différences entre les protocoles pour un test donné. Ils sont tout de même une métrique importante à intégrer dans l'étude des effets sanitaires des particules.

Le PO, étant fortement lié aux caractéristiques physicochimiques et celles-ci à la source d'émission, serait susceptible aux changements de saisons. C'est cela qui a été montré par Borlaza *et al.* 2018 après mesure du PO de particules fines prélevées sur différents sites et à différentes périodes de l'année. Dans cette étude, les particules prélevées dans une zone industrielle ont présenté le potentiel oxydant le plus haut. Les données saisonnières montrent qu'au printemps comme en été, le PO des particules augmente par rapport aux mesures réalisées sur les particules prélevées sur les mêmes sites, en périodes automnale et hivernale. Les auteurs attribuent à cette différence la présence de métaux lourds provenant des poussières et aux aérosols organiques secondaires formés par une forte activité photochimique (Borlaza et al., 2018).

En outre, la surface réactive de particules qui augmente quand la taille de particules diminue, serait responsable d'une plus grande accumulation de composés critiques pour la mesure du PO (Xue et al., 2019). De plus, la composition chimique de particules et notamment la présence de métaux ou des espèces carbonées dans les particules sont des facteurs qui contribuent au potentiel oxydant et à la toxicité de particules. En effet, la solubilité des métaux de transition est un paramètre important dans la mesure du PO car cette fraction est plus facilement bioaccessible. Cette solubilité peut être enrichie quand ils forment des complexes avec des espèces organiques. Les espèces carbonées composées de carbone élémentaire (EC) et carbone organique (OC) sont également impliquées dans la mesure du PO. Le EC est produit par la combustion incomplète de carburants carbonés générant des particules sphériques de 20-50 nm de diamètre qui servent comme support aux composés organiques et composés organiques semi volatils. Le OC est produit par des sources anthropiques et naturelles qui sont sensibles au vieillissement photochimique. Une fois dans l'atmosphère, les OC augmentent la teneur

de composés organiques oxydés. La fraction soluble des composés carbonés est liée au PO (Gao et al., 2020; Ghio et al., 2012).

L'équipe de Crobeddu 2017, a mesuré le PO par quatre méthodes différentes (déplétion du DTT, test plasmide, déplétion de l'AA et du GSH et oxydation de la sonde fluorescente H2DCF) sur différents types de particules. En parallèle, ils ont étudié les réponses antioxydante et inflammatoire obtenues à la suite d'expositions de cellules épithéliales respiratoires humaines NCI-H292 à des concentrations de 1 à 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de particules, comparées aux résultats des mesures de PO. Les différentes méthodes utilisées produisent des résultats plus ou moins importants mais le test de déplétion de l'AA et du GSH semblent mieux prédire la réponse biologique entraînée par les particules (Crobeddu et al., 2017). Ainsi, la mesure du PO serait dépendante de la méthode utilisée. L'étude réalisée par Moufarrej et al. 2020 sur des $\text{PM}_{2.5}$ récoltées à Dunkerque, une ville industrielle du nord de la France, montre que la concentration en particules, certains de ses composés ou bien la source de $\text{PM}_{2.5}$ sont spécifiquement corrélées au test utilisé (AA ou DTT) pour la mesure du PO (Moufarrej et al., 2020).

2.2 Effets de particules fines et ultrafines sur la santé

De nos jours, il existe une vaste littérature scientifique et de nombreux rapports institutionnels sur les effets sur la santé des particules atmosphériques, majoritairement les PM_{10} et les $\text{PM}_{2.5}$ (ANSES, 2019). Les travaux cités dans la suite de ce paragraphe ne représentent pas l'exhaustivité de cette littérature mais permettent d'illustrer les principaux effets connus des PF et PUF ainsi que les données les plus récentes. Il existe différentes approches pour leur étude : les études épidémiologiques, les études contrôlées chez l'Homme, dites cliniques, et les études expérimentales *in vivo* et *in vitro* (Zavala et al., 2020).

2.2.1 Etudes épidémiologiques

Elles utilisent des méthodes statistiques afin de mesurer les effets (morbidité, mortalité, changements physiologiques etc.) en relation avec des expositions environnementales et se basent en grande partie sur des données d'observation. Le projet UFIREG (*Ultrafine particles — an evidence based contribution to the development of regional and European environmental and health policy*) s'est intéressé aux effets à court

terme des particules fines et ultrafines sur la mortalité cardiovasculaire et respiratoire de cinq villes européennes. Les résultats obtenus montrent une augmentation de la mortalité respiratoire et cardiovasculaire quand la concentration en masse et le nombre de particules augmentent (“Associations between ultrafine and fine particles and mortality in five central European cities — Results from the UFIREG study,” 2016). Une autre étude menée en Allemagne, en Finlande et au Royaume-Uni a montré des résultats similaires sur des personnes atteintes de maladies respiratoires chroniques exposées à des concentrations élevées de particules ultrafines. Les particules fines ont montré des effets sur la morbidité plus rapides contrairement aux PUF dont les effets seraient vus à plus long terme (Ibald-Mulli et al., 2002). Liu et al. (2018) ont étudié l'exposition à **court terme** aux PUF et leur impact sur la santé cardio-pulmonaire. Ils ont observé une association entre les PUF et une augmentation de la tension artérielle, concluant un effet de l'exposition aux particules PUF et la dégradation de la santé cardiovasculaire en zones urbaines (Liu et al., 2018). Croft et al. (2017) ont observé des modifications sur des marqueurs de l'inflammation, de la coagulation chez des patients atteints d'une pathologie cardiaque associées à une hausse des concentrations de PF et PUF dans les 96 h précédentes (Croft et al., 2017). Concernant les effets à **long terme**, Bai et al. (2019) ont montré sur une vaste cohorte, (population âgée de 30 à 100 ans dans la période de 1996-2012), qu'une exposition aux PUF est associée à une incidence accrue à la fois d'insuffisance cardiaque et d'infarctus aigus du myocarde (Bai et al., 2019).

D'autres études s'intéressent à la relation entre l'exposition aux particules fines et ultrafines et le développement de cancer du poumon. Par exemple, d'après une étude réalisée par Pope et al. 2012, une augmentation de $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$ de $\text{PM}_{2.5}$ est associée à une augmentation de 8 % de risque de décès par cancer du poumon (Pope et al., 2002). Une autre étude similaire en 2006, menée dans 23 villes européennes a montré qu'une réduction du niveau de $\text{PM}_{2.5}$ de $15 \mu\text{g}/\text{m}^3$ dans chacune des villes éviterait au total 1900 décès par cancer du poumon (Boldo et al., 2006).

2.2.2 Etudes contrôlées chez l'Homme(cliniques)

Ces études consistent à mettre en évidence les effets de certains polluants à partir d'expositions contrôlées chez des volontaires. Ensuite, différents paramètres physiologiques peuvent être étudiés comme la fonction respiratoire, les indices

électrocardiographiques, etc. Ces paramètres peuvent être complétés par des évaluations biologiques réalisées sur différents types de prélèvements. L'équipe de Langrish et al. (2009, 2012) ont étudié les effets de l'utilisation des masques de protection respiratoires chez des patients sains ou atteints d'une coronaropathie. Ils ont observé que réduire l'exposition aux particules atmosphériques a permis sur le premier groupe une stabilisation de la tension artérielle et de la fréquence cardiaque et sur le deuxième groupe une réduction des symptômes et une amélioration des mesures de type cardiovasculaire. Ainsi, ces études cliniques suggèrent que les PF auraient des effets sur la santé à court terme (<2h) (Langrish et al., 2012, 2009). Dans la même approche, une autre étude menée par Bräuner et al. (2008) a montré que l'utilisation de filtres à particules permettait de prévenir l'augmentation de la rigidité artérielle et de la coagulation (Bräuner et al., 2008).

2.2.3 Etudes expérimentales *in vitro* et *in vivo*

Les effets toxicologiques des polluants aériens peuvent être évalués dans des conditions contrôlées en utilisant des tests sur des cultures cellulaires ou sur des animaux. Les études *in vitro* sur les PF et PUF seront discutées plus en détail dans la **section 3.2.3** Concernant les études *in vivo*, les modèles les plus utilisés sont le rat et la souris mais d'autres espèces peuvent être utilisées comme les chiens, les singes et les lapins. Les expositions peuvent être aiguës ou chroniques en utilisant différentes voies d'exposition. Bien que les études *in vivo* présentent des nombreux avantages comme la possibilité d'utiliser différents modèles (génétiquement modifiés ou avec une maladie) et d'étudier les effets systémiques, il existe des grandes différences physiologiques et génétiques entre les espèces et l'extrapolation à l'Homme reste difficile. De plus, cette approche peut devenir longue et coûteuse sans compter les aspects éthiques. Par exemple, l'équipe d'Upadhyay et al. 2014 a exposé des rats hypertendus âgés de 12-13 mois à des PUF de carbone (31 nm) avec des faibles teneurs en composés organiques. Cette exposition a entraîné une inflammation pulmonaire caractérisée par une neutrophilie dans le lavage bronchoalvéolaire et une augmentation du taux d'IL-6. L'étude des transcrits au niveau pulmonaire sur les animaux âgés a montré également une induction significative de marqueurs de stress oxydant (Hème oxygénase 1 : HO-1), de vasoconstriction (endothéline -1 : ET1 ; récepteurs A et B de l'endothéline : ETA et ETB) et de coagulation (inhibiteur de l'activateur du plasminogène-1 : PAI-1) après 24h d'exposition tandis que des travaux précédents menés chez les rats adultes (6-7 mois) montraient que ces

marqueurs n'étaient significativement induits qu'après 3 jours d'exposition. Dans cette même étude, une augmentation de la pression artérielle et du rythme cardiaque 24 h après exposition est observée (Upadhyay et al., 2014, 2008). L'équipe de Farine et al (2019) a comparé les effets aigus et subaigus des particules d'échappement diesel (DEP) et des particules dérivées de la combustion de biomasse chez des souris mâles BALB/c. Leur étude a montré l'activation de la réponse inflammatoire (COX-2 et MPO) après exposition aux PUF, à la fois dans les systèmes respiratoire et cardiovasculaire et soulignent l'importance de la composition chimique des particules, indiquant les particules de DEP comme étant plus nocives (Farina et al., 2019).

La littérature scientifique souligne que les effets des PF et PUF ne sont pas ciblés uniquement sur le système respiratoire, des effets cardiovasculaires sont également observés et ceci s'expliquerait par la translocation de PUF de l'épithélium respiratoire vers la circulation sanguine et en conséquence vers d'autres organes (Terzano et al., 2010). En conclusion, les résultats de la synthèse bibliographique sur les PF et PUF met en évidence le lien entre le niveau de la pollution atmosphérique et la recrudescence des maladies, notamment les maladies respiratoires et cardiovasculaires. Les études s'intéressant plus spécifiquement aux PUF sont encore limitées par rapport aux nombreuses études sur les particules fines et grossières.

2.2.4 Effets respiratoires au niveau bronchique

L'épithélium bronchique représente la première cible des particules inhalées. Une fois déposées, elles peuvent pénétrer plus profondément dans l'arbre respiratoire ou être absorbées par la muqueuse bronchique générant ainsi des dommages locaux (Schwartz, 1989). Les PF et PUF peuvent endommager l'ensemble de l'appareil respiratoire via l'augmentation de la perméabilité cellulaire et la réduction de l'activité mucociliaire par la production de EROs et la libération de cytokines. Les conséquences liées à des expositions à long terme aux PF et PUF sont importantes au niveau bronchique provoquant des maladies pulmonaires telles que la BPCO, l'asthme et aussi des cancers (Gauderman et al., 2004). Elles sont parmi les causes premières de la morbidité et mortalité au niveau mondial.

2.2.4.1 Asthme

L'asthme est une inflammation chronique des bronches qui concerne environ quatre millions de personnes en France. L'asthme se caractérise par des crises d'essoufflement (dyspnée) ou des sifflements suite à l'inflammation de l'épithélium bronchique. Cette affection provoque une hypersécrétion du mucus dans les bronches provoquant une bronchoconstriction, qui entraîne une réduction du diamètre des bronches et réduit le flux d'air dans les poumons (INSERM, 2015; WHO, 2020). De même, elle entraîne une desquamation de l'épithélium provoquant une augmentation des débris cellulaires dans le mucus qui réduit la surface de cellules ciliées et par conséquent, le transport du mucus (Dunican et al., 2018).

2.2.4.2 Broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO)

La BPCO est une maladie pulmonaire, responsable de plus de 3,17 millions de personnes au niveau mondial en 2015 (WHO, 2017), qui se développe lentement après des agressions récurrentes et de longue durée, par exemple, à la pollution particulaire. Elle se caractérise par une baisse persistante de l'écoulement des gaz inspirés produite par l'accumulation du mucus dans les bronches à la suite d'une prolifération de cellules caliciformes. La BPCO se manifeste par des essoufflements, une toux chronique et des expectorations (Boucher, 2019).

2.2.4.3 Cancer du poumon

Le cancer est la seconde cause de décès dans le monde. Le cancer du poumon est parmi les plus courants avec 2.09 millions des cas reportés et 1.76 millions de décès en 2018 (WHO, 2018). Bien que le tabagisme représente un des principaux facteurs de risque pour le développement de ce type de cancer, d'autres facteurs comme la pollution atmosphérique, sont également impliqués (American Cancer Society, 2019). Par ailleurs, la pollution atmosphérique ainsi que les particules en suspension sont classées comme cancérigènes (Groupe 1) par le CIRC depuis 2013. Le potentiel cancérigène de particules fines et ultrafines est attribué notamment aux propriétés physicochimiques tels que la taille et la composition chimique ainsi qu'à la réactivité de surface. En effet, les composés responsables des effets mutagènes tels que les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) et les nitro-HAP sont présents dans la fraction fine de particules (Jinhui and Lee, 2000; Schnelle et al., 1995). Ainsi, plus les particules sont fines, plus le potentiel mutagène

est important car les particules fines peuvent agir comme porteurs de composés chimiques originaires des effets sur la santé.

2.3 Technologies pour le contrôle d'émissions : les biocarburants

En milieu urbain, la principale source de particules fines et ultrafines provient de la combustion d'énergie fossile, phénomènes que l'on retrouve liés au secteur du trafic routier. L'utilisation des énergies fossiles a été largement répandue depuis la révolution industrielle jusqu'à nos jours. En effet, 92,3% des transports dépendaient du pétrole au niveau mondial en 2017 (**Figure 5**). Néanmoins, la quantité limitée de ressources fossiles, l'impact environnemental et des régulations plus strictes sur les émissions de particules conduisent à envisager d'autres sources d'énergies renouvelables, tels que les biocarburants.

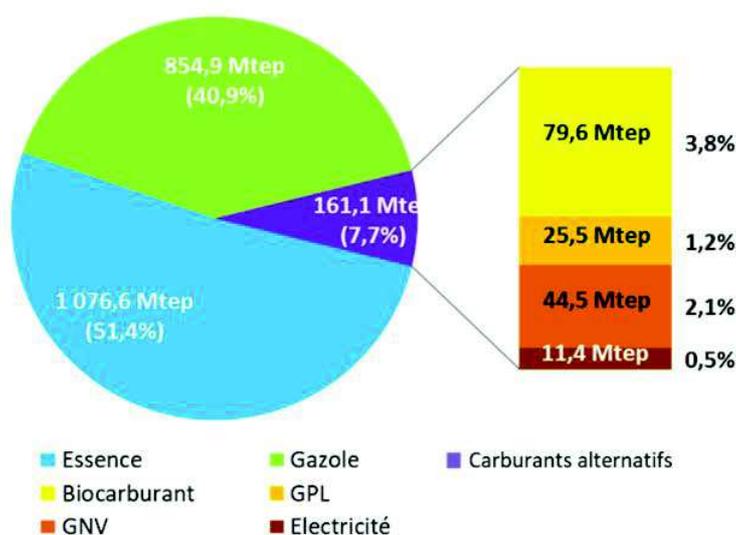


Figure 5. Consommation mondiale d'énergie dans les transports routiers en 2017

Mtep : mégatonne équivalent pétrole.

Source : <https://www.ifpenergiesnouvelles.fr/article/tableau-bord-biocarburants-2019>

2.3.1 Définition

Un biocarburant est un « carburant, liquide ou gazeux, produit à partir de la transformation de matériaux organiques non fossiles issus de la biomasse » (Directive 2009/28/CE). D'après Gagnepain, 2016, les biocarburants peuvent être considérés comme énergie renouvelable dans la mesure où le mode de production est effectué « dans des

conditions énergétiques performantes et sobres en énergies fossiles ». Dans ces conditions, l'utilisation de biocarburants permet de réduire les émissions de gaz à effet de serre par rapport à un carburant d'origine fossile (Gagnepain, 2016). De plus, l'ajout de composés oxygénés dans le biocarburant, dits additifs, permettent de réduire les émissions de particules polluantes (Wu et al., 2017). Actuellement les biocarburants incorporés dans l'essence sont principalement constitués par l'éthanol provenant de la fermentation des sucres (betteraves ou céréales) (**Figure 6A**) et sont présentés à la pompe sous la forme de sans-plomb 95-E5 ou 98-E5 dont la teneur en éthanol est de 5%. Quant au SP95-E10, il peut contenir jusqu'à 10% d'éthanol et le E85 peut contenir jusqu'à 85%. Concernant les biocarburants ajoutés dans le gazole (biodiesel), ils sont constitués d'esters d'huiles végétales produits par transestérification ou l'hydroisomérisation de matières oléagineuses (colza, tournesol, soja, palme, huiles alimentaires usagées, graisses animales) (**Figure 6B**). Ils sont présents à la pompe comme B7 ou B10 avec 7-10% de biocarburants. On distingue trois types de biocarburants : de première, de deuxième et de troisième génération.

2.3.2 Biocarburants de première génération

Les biocarburants de première génération, appelés aussi biocarburants conventionnels, bien qu'ils soient produits déjà à l'échelle industrielle, sont issus des produits agricoles habituellement cultivés à des fins alimentaires comme la canne à sucre, la betterave, céréales, colza etc. ce qui les mets en compétition avec les usages alimentaires (**Figure 6**). De plus, seulement une faible fraction de la plante est utilisée lors de la fabrication du biocarburant, d'où le faible rendement.

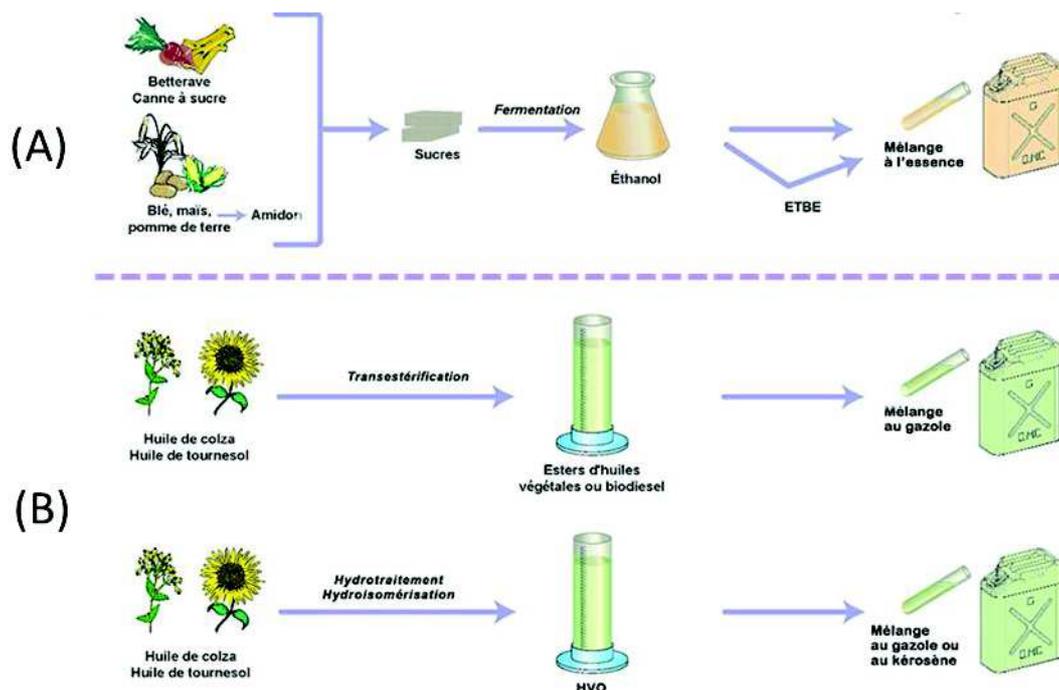


Figure 6. Techniques de production de biocarburants de première génération (Source : IFP Energies nouvelles)

2.3.3 Biocarburants de deuxième génération

Afin de répondre aux limites des biocarburants de première génération, des nouvelles matières premières ont été recherchées aboutissant aux biocarburants de deuxième génération (B2G), ou biocarburants avancés. Ceux-ci sont produits à partir de biomasse lignocellulosique sous différentes formes :

- Résidus agricoles : pailles de céréales, tiges, bagasses de canne à sucre ;
- Résidus d'exploitation forestière (branches, rameaux, troncs abîmés laissés en forêt) ;
- Déchets de l'industrie du bois (sciures, rebuts) et du papier (papiers usagés, liqueurs noires) ;
- Cultures dédiées à fort rendement : plantes annuelles (triticale, luzerne, etc.),
- Cultures pérennes à rotation rapide (miscanthus, canne de Provence, peuplier, saule, etc.) ;
- Déchets ménagers (fraction organique) et industriels (palettes, etc.).

La lignocellulose est constituée de trois polymères : la cellulose, l'hémicellulose et la lignine présentes à différentes proportions en plus d'autres composés (Iqbal et al., 2013). Le **Tableau 8** montre les différents composés qui constituent trois types de biomasse.

Tableau 8. Composition élémentaire de trois biomasses de référence.

| Biomasses | Paille (blé) | Bois (épicéa) | Miscanthus |
|------------------------------------|--------------|-----------------|-----------------|
| Carbone (%) | 46 | 51,9 | 47,9 |
| Hydrogène (%) | 5,5 | 6,16 | 5,5 |
| Oxygène (%) | 41,4 | 41,7 | 41 |
| Azote (%) | 1,65 | 0,12 | 0,54 |
| Soufre (%) | 0,1 | 0,03 | 0,11 |
| Chlore (%) | 0,15 | 0,02 | 0,18 |
| Cellulose (%) | 33 | 41 | 45 |
| Hémicellulose (%) | 23 | 31 | 30 |
| Lignine (%) | 17 | 27 | 21 |
| Matières minérales (%) | 5 (5 à 12,8) | 0,1 (0,1 à 0,4) | 4,8 (1,5 à 4,8) |
| Pouvoir calorifique (MJ/kJ) | 18400 | 20200 | 19100 |
| Carbone (%) | 46 | 51,9 | 47,9 |

Les techniques de production de B2G (**Figure 7**) sont diverses et variées. Le choix dépend des caractéristiques de la biomasse d'entrée, sa disponibilité et le type de carburant souhaité en sortie. Elles sont encore en phase de développement donc elles ne sont pas encore disponibles sur le marché : la voie biochimique (hydrolyse et fermentation) permettant la production d'éthanol et la voie thermochimique (thermolyse et synthèse) qui permet la production de méthanol, de biodiesel ainsi qu'une large gamme de produits de synthèse. En plus de ne pas rentrer en concurrence avec les usages alimentaires, la production de B2G permet l'utilisation de l'intégralité de la plante ce qui conduit à un meilleur rendement d'énergie produit par unité de surface cultivée (Broust et al., 2013).

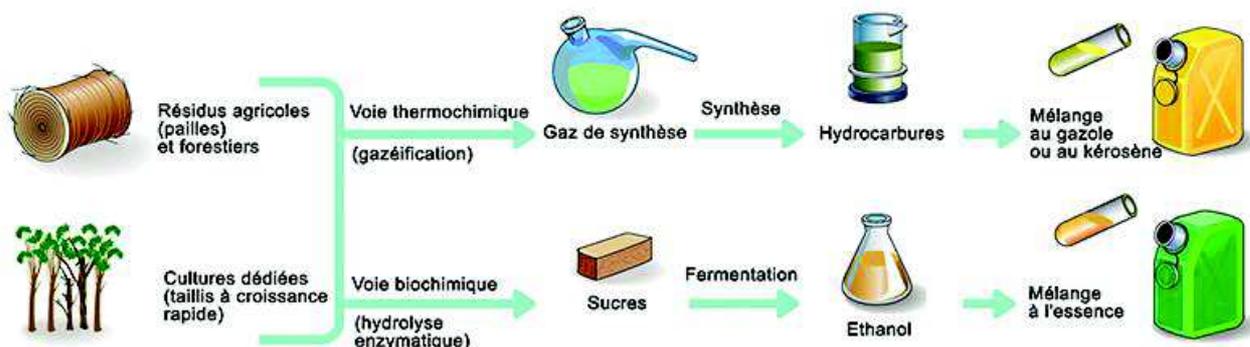


Figure 7. Techniques de production de biocarburants de deuxième génération

2.3.4 Biocarburants de troisième génération

Le troisième type de biocarburant, dit de troisième génération s'appuie sur des procédés utilisant des microorganismes tels que les microalgues. Leur production est encore en phase expérimentale.

2.3.5 Emissions gazeuses et particulaires

L'utilisation de biocarburants entraîne de nombreux défis, tant technologiques, économiques, environnementaux que sanitaires. En effet, en termes d'effets sanitaires, le principal intérêt d'utiliser des biocarburants est de réduire les émissions à l'échappement. Les produits de combustion de ces nouveaux carburants très peu étudiés actuellement suscitent des nombreuses interrogations :

- *Dioxyde de carbone (CO₂)*. La combustion de carburants fossiles représente une de principales sources d'émissions de de CO₂, un puissant gaz à effet de serre ayant des conséquences négatives sur l'environnement tels que le réchauffement climatique et l'affaiblissement de la couche d'ozone. L'utilisation de biocarburants aurait un moindre impact sur le changement climatique d'après plusieurs études menées sur l'analyse de cycle de vie de plusieurs biocarburants (Chen et al., 2019). En effet, comparés aux carburants fossiles, l'utilisation du biocarburant pur diminuerait de 50-70% les émissions de CO₂. Cette diminution est proportionnelle au taux de biocarburant utilisé, soit une diminution de 2.5%-3.75% par 5% du biocarburant ajouté (Schröder et al., 1999). La **Figure 8** montre la diminution de ce gaz à effet de serre par différents biocarburants.

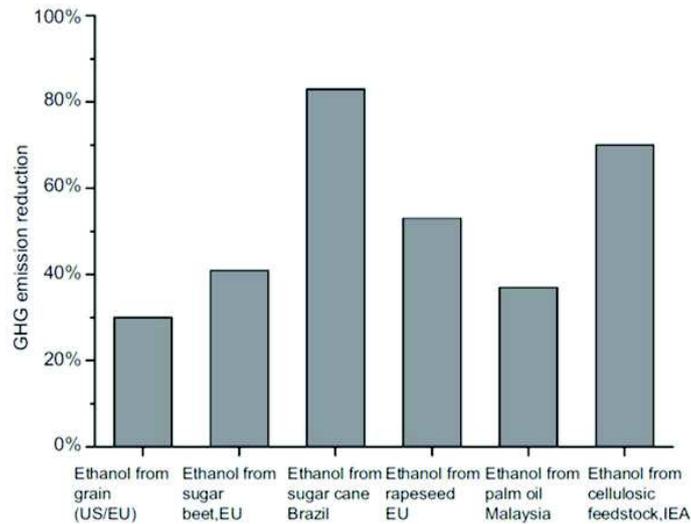


Figure 8. Réduction de l'émission de gaz à effet de serre de biocarburants comparés au carburants fossiles (Chen et al., 2019)

- *Oxydes d'azote (NOx)* : L'émission des NOx par les moteurs thermiques est attribuée notamment à une combustion incomplète. Concernant l'utilisation de biocarburants, on distingue deux types d'émissions, celles issues du biodiesel et celles du bioéthanol. Plusieurs études ont montré une augmentation de 3-5 fois plus d'émissions de NOx (Chen et al., 2019) lors de la combustion de biodiesel. Cette émission, dont les mécanismes sont encore mal compris, serait due à plusieurs facteurs comme la teneur en oxygène, l'indice du cétane, les esters d'acides gras et la teneur du biodiesel dans le mélange. Contrairement au biodiesel, le bioéthanol aurait un effet opposé comme présenté dans la **Figure 9** qui montre une légère diminution dans l'émission de NOx lors de l'utilisation du diesel et du butanol à différentes teneurs (16% et 8%).

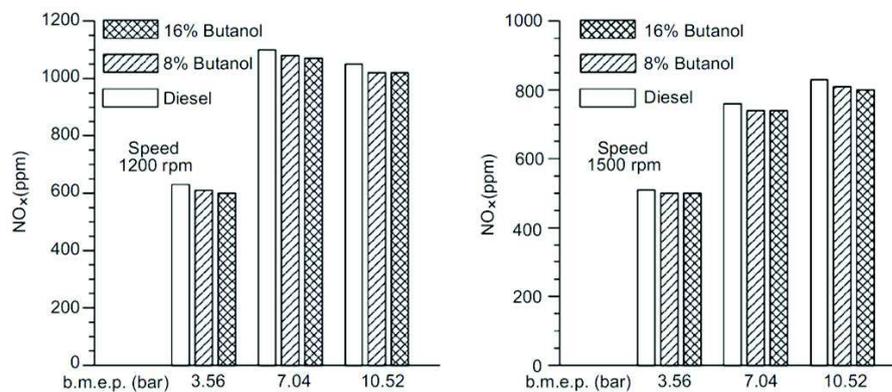


Figure 9. Emissions de NOx du diesel pur et 16% et 8% de butanol à trois pressions moyenne effective (BPME) et deux vitesses (1200 et 1500 rpm) (Chen et al., 2019).

- *Monoxyde de carbone (CO)* : Ce gaz est produit lors de l'oxydation incomplète de composés carbonés des carburants fossiles à des basses températures de gaz d'échappement. Les émissions de CO sont très variables en fonction du type de biocarburant et des conditions d'utilisation. Des études montrent que le biodiesel pourrait diminuer l'émission de CO de 4% à 94% (Xue et al., 2011). De même, l'addition d'éthanol à l'essence montre une diminution de ce gaz (Choi and Jiang, 2015) mais des émissions plus importantes sont associées à l'utilisation des alcools comme le butanol (Doğan, 2011).
- *Hydrocarbures (HC)* : Produits de la combustion incomplète de carburants, les émissions d'HC présentent un comportement similaire aux émissions de CO, ils varient en fonctions du type de biocarburant et des conditions de combustion. Par exemple, le biodiesel peut réduire les émissions d'HC de 20% à 70% (Xue et al., 2011) mais l'utilisation de bioalcools comme le bioéthanol ou le biobutanol auraient l'effet opposé comme il est montré sur la **Figure 10** (Rakopoulos et al., 2007).

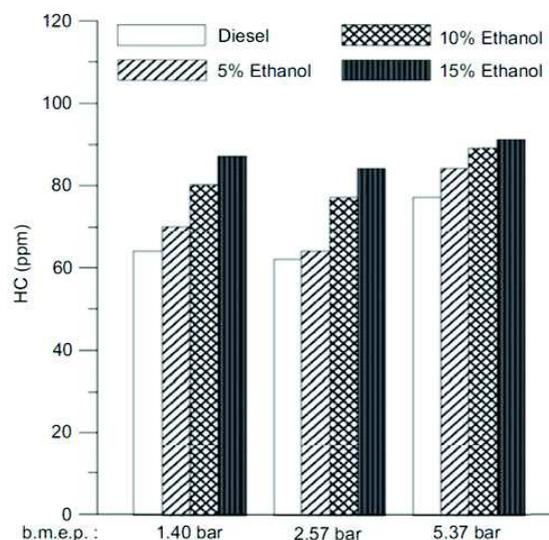


Figure 10. Emissions de hydrocarbures de diesel, 5% Ethanol, 10 % Ethanol et 15% Ethanol à trois pressions moyennes effectives (Rakopoulos et al., 2007).

- *Particules en suspension (PM)* : Pour l'ensemble des biocarburants, globalement une diminution dans l'émission de particules est observée. Par exemple, la combustion de biodiesel pur permettrait une diminution jusqu'à 90% de ces

émissions (Lapuerta et al., 2008), ceci peut s'expliquer par la teneur en oxygène, la longueur des chaînes de carbone et l'absence de composés aromatiques. La morphologie peut également se voir affectée. Cependant, la taille de particules primaires serait réduite, ce qui augmente leur surface réactive (Savic et al., 2016). Une augmentation dans la teneur en composés organiques est également observée, celle-ci est proportionnelle au pourcentage de biocarburant présent. La **Figure 11** montre la concentration massique de $PM_{2.5}$ du diesel à faible teneur en soufre (ULSD) et de différents pourcentages de biocarburants (5, 10 et 15%) à trois charges moteur différents (25, 50 et 75%). Le rapport carbone élémentaire et carbone organique (EC/OC) y est également présenté. Globalement, les teneurs en EC et en OC ainsi que les concentrations en $PM_{2.5}$ augmentaient avec la charge du moteur pour chaque carburant. De plus, la teneur en EC était plus élevée que celle de OC. A faible charge du moteur, les mélanges butanol-diesel n'ont montré aucun changement significatif dans les concentrations de $PM_{2.5}$. Cependant, à charges moyenne et élevée, la réduction des concentrations de $PM_{2.5}$ est devenue significative lorsque les carburants mélangés contenaient plus de butanol. Par rapport à l'ULSD, les mélanges ont également réduit les émissions d'EC en fonction des charges du moteur. Les émissions de CO sont restées inchangées, ainsi, la diminution des émissions de $PM_{2.5}$ due aux carburants mélangés peut être attribuée principalement à la réduction des émissions en EC. Cette étude montre que l'ajout de butanol au diesel est efficace pour réduire les émissions de particules, notamment à charge moteur élevée et avec une forte teneur de butanol dans le mélange (Zhang and Balasubramanian, 2014).

Bien que l'émission de particules diminue pour les biocarburants, cet avantage est contrecarré par la formation accrue des composés de structures variées qui peut donner lieu à des émissions plus toxiques (Kohse - Höinghaus et al., 2010).

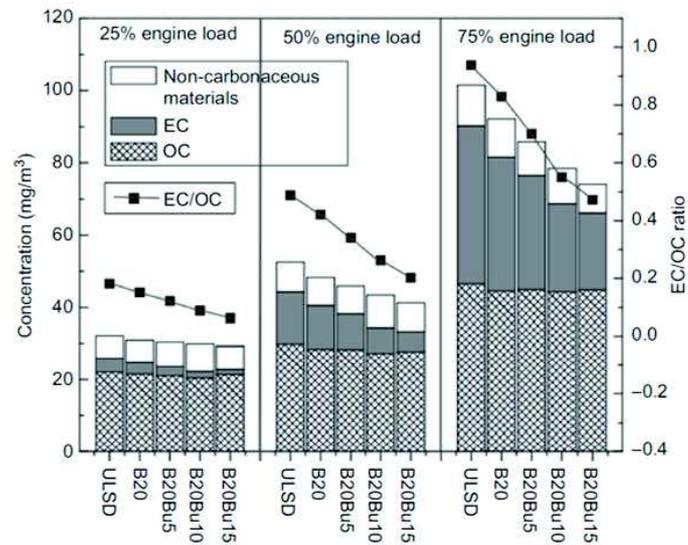


Figure 11. Concentration massique de $PM_{2.5}$, teneurs en carbone élémentaire (EC) et carbone organique (OC) et ratios EC/OC

Source : Zhang et Balasubramanian 2014

3. Approches *in vitro* pour l'étude de la toxicité respiratoire de particules fines et ultrafines

3.1 L'épithélium pulmonaire

Les voies respiratoires comprennent trois niveaux (**Figure 12**) : les voies aériennes supérieures extrathoraciques (cavités nasales, pharynx et larynx), la région thoracique (trachée, bronches et bronchioles) et la région alvéolaire (bronchioles terminales, sacs alvéolaires et alvéoles)(Coumoul, 2017). Chaque niveau est composé de différents types cellulaires avec des fonctions bien spécifiques.

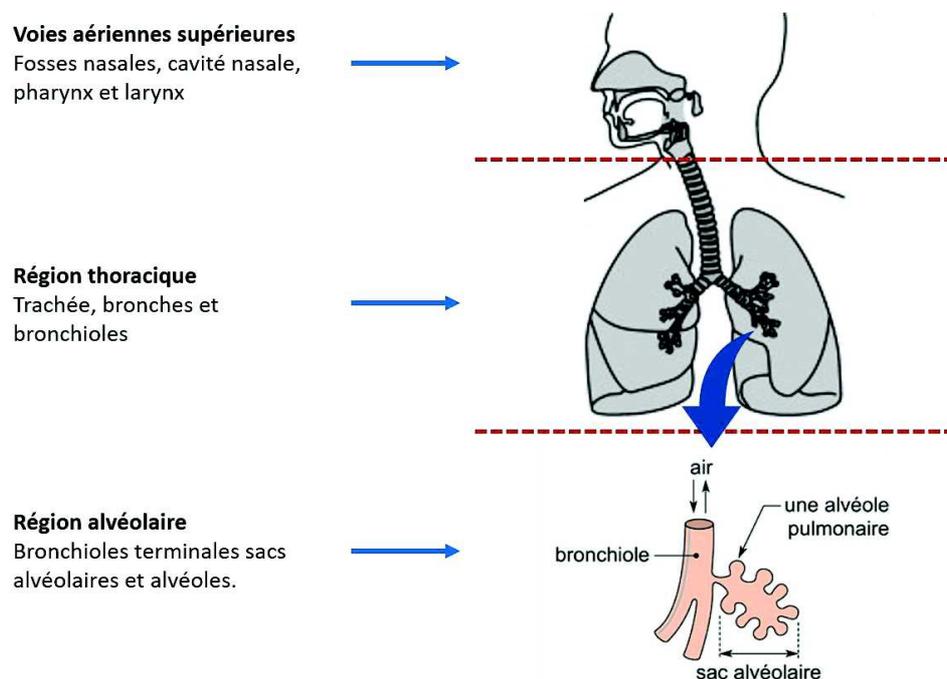


Figure 12. Schéma des voies respiratoires

Adapté de (Coumoul, 2017; Geiser and Kreyling, 2010)

L'épithélium des voies aériennes inférieures (niveau trachéo-bronchique) est de type pseudostratifié cylindrique. Il est composé principalement de trois types cellulaires (**cf. Figure 13**) : les cellules basales qui sont impliquées dans le renouvellement cellulaire, les cellules sécrétrices de mucus (ou caliciformes à mucus) qui participent à la formation du mucus et représentent un moyen de défense contre les agents inhalés et les cellules ciliées qui rendent possible la clairance mucociliaire. Au niveau des bronchioles, l'épithélium est de type cylindrique et est constitué de cellules ciliées et de cellules club. Les cellules club sécrètent des lipides et des protéines, interviennent dans la composition

du surfactant et pourraient se différencier en un autre type cellulaire épithélial (Bishop and Polak, 2007). Dans la région alvéolaire, ou voies respiratoires profondes, l'épithélium est composé par les cellules alvéolaires du type I et type II. Les cellules alvéolaires du type 1 (squameuses) couvrent environ 96% de la surface alvéolaire et leur fonction principale est de permettre les échanges de gaz entre l'air et le sang (environ 85% des échanges gazeux). Les cellules alvéolaires du type 2 (cubiques) sécrètent des surfactants, métabolisent des xénobiotiques et se différencient en cellules du type 1 quand c'est nécessaire. (Bhowmick and Gappa-Fahlenkamp, 2016).

L'appareil respiratoire est muni de systèmes de protection contre les xénobiotiques (biologiques ou physiques) présents dans l'air. Les voies aériennes supérieures sont tapissées d'un épithélium mucociliaire constitué, entre autres, des cellules caliciformes qui produisent du mucus et des cellules ciliées. Le mucus piège les particules et les battements des cils permettent la remontée du mucus et son expectoration. Ce mécanisme de protection est connu comme étant la clairance mucociliaire. Au niveau des voies aériennes inférieures, où se trouvent les alvéoles, le principal mécanisme de protection est la phagocytose de particules assurée par les macrophages. Cette région fonctionne comme barrière protectrice et génère une forte réponse immunitaire envers des pathogènes qui

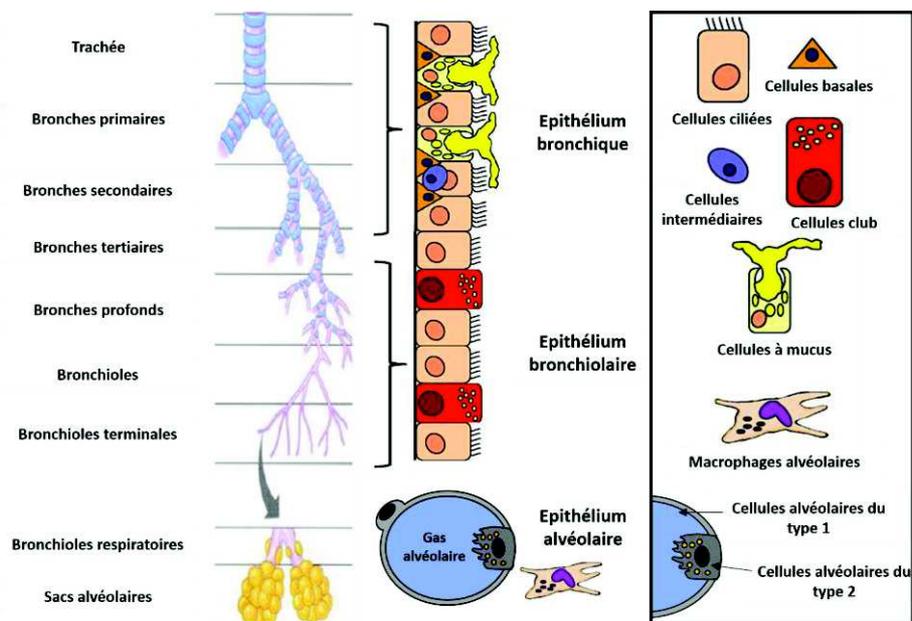


Figure 13. Schéma des principaux types cellulaires retrouvés dans l'épithélium broncho-pulmonaire.

Différents types cellulaires constituent l'épithélium pulmonaire : cellules ciliées, cellules basales, cellules club, cellules à mucus, macrophages alvéolaires, cellules alvéolaires du type I et II (BéruBé, 2010).

arrivent dans cette zone (Baeza-Squiban, 2014; Baeza-Squiban and Lanone, 2011; Coumoul, 2017).

3.2 Méthodes d'évaluation toxicologique *in vitro* pour l'étude de PF et PUF

Afin d'évaluer la toxicité de ces particules chez l'homme, de façon à prédire de manière fiable les potentiels effets, des nombreux modèles *in vivo* et *in vitro* existent. Les modèles *in vitro* présentent des nombreux avantages, ils peuvent être utilisés pour étudier les mécanismes d'action, pour évaluer directement la toxicité d'un composé au niveau d'un organe ciblé. De plus, les progrès ont permis de développer des nouveaux modèles et des méthodes d'exposition plus proches de conditions physiologiques réelles (Loret et al., 2016).

3.2.1 Modèles cellulaires

Les particules fines et ultrafines se déposent tout au long de l'arbre respiratoire et peuvent entraîner des effets indésirables. Différents modèles cellulaires sont utilisés pour évaluer les effets des particules fines et ultrafines sur les voies respiratoires. Ils se distinguent en deux types : les lignes cellulaires et les cellules primaires. Les cellules peuvent être cultivées en monocultures (un seul modèle primaire ou une lignée cellulaire) ou en coculture (plusieurs modèles cellulaires, par exemple des cellules épithéliales et des cellules immunitaires) permettant ainsi une interaction entre différents types cellulaires.

3.2.1.1 Les lignées cellulaires

Les lignées cellulaires, des cellules dites immortelles, sont couramment utilisées en toxicologie du fait de leur utilisation simple. Au niveau bronchique, la lignée BEAS-2B, dérivée de cellules épithéliales bronchiques transfectées par l'adénovirus 12-SV30 et la lignée Calu-3, obtenue à partir d'une biopsie d'un épanchement pleural d'un patient de 25 ans victime d'un adénocarcinome pulmonaire, sont deux exemples des lignées utilisées. Malgré le fait que les lignées cellulaires représentent des modèles moins représentatifs des voies respiratoires à cause de leur prolifération active, leur absence de sécrétion de mucus et la formation de jonctions serrées, ces modèles présentent l'avantage, entre autres, d'être maintenues en culture pendant plusieurs passages. La lignée BEAS-2B, présente, entre autres avantages, le fait d'être métaboliquement active (Uppstad et al.,

2010), elle peut être cultivée à l'interface air-liquide (section **3.2.1.3**) et c'est un modèle largement utilisé dans l'étude des PM (Mülhopt et al., 2008; Oeder et al., 2015; Rossner et al., 2019).

3.2.1.2 La culture de cellules primaires

L'utilisation de cultures primaires de cellules pulmonaires se développe de plus en plus. Ces cellules sont prélevées directement du patient et ne sont pas immortalisées. Ces modèles présentent également l'intérêt de pouvoir être utilisés pour des expositions répétées, pour l'étude d'effets à long terme (Boublil et al., 2013), de comparer des donneurs sains avec des donneurs atteints d'une pathologie ou bien évaluer une population cellulaire ciblée.

Les cellules NHBE (Normal Human Bronchial Epithelial Cells) provenant d'épithélium bronchique humain représentent une alternative intéressante. En effet, elles peuvent être cultivées à l'Interface Air-Liquide (IAL) (**Figure 14**) où le côté apical est en contact avec l'air permettant ainsi de reconstituer un épithélium pseudostratifié et donc une évaluation plus proche des conditions physiologiques qu'avec des cellules cultivées en immergé (Bhowmick and Gappa-Fahlenkamp, 2016). Les cellules sontensemencées dans un insert dans le milieu de culture jusqu'à atteindre la confluence. Elles sont ensuite différenciées à l'IAL avec un milieu spécifique pendant plusieurs jours jusqu'à la reconstitution d'un épithélium pseudostratifié.

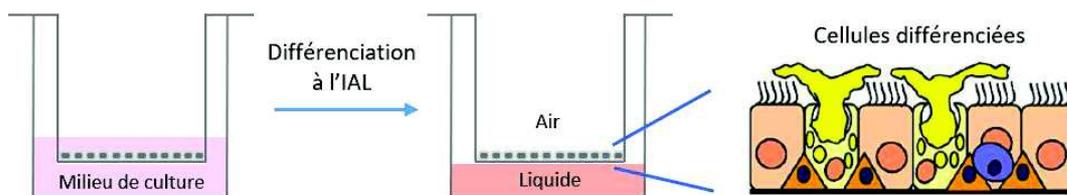


Figure 14. Diagramme de la différenciation de cellules NHBE à l'Interface Air-Liquide (IAL).

Les cellules sontensemencées sur insert dans le milieu de culture jusqu'à atteindre la confluence. Elles sont ensuite différenciées en IAL avec un milieu spécifique. En fonction des conditions de culture (temps et milieu de différenciation) les cellules reconstituent un pseudo épithélium pulmonaire composé de cellules basales, cellules sécrétrices de mucus et cellules ciliées.

Les cellules NHBE cultivées en IAL et soumises à des conditions de différenciation, montrent un profil d'expression génique similaire à celui d'un épithélium bronchique humain constitué de cellules basales, cellules ciliées et cellules sécrétrices de mucus.

L'analyse de l'expression de gènes spécifiques à chaque type cellulaire peut donner une évaluation qualitative de l'épithélium à différents temps de différenciation en IAL (**Tableau 9**). Par exemple, les cellules basales expriment le TP63 qui est impliqué dans la régulation de la morphogénèse épithéliale. Ces cellules sont donc essentielles au maintien de la structure et au fonctionnement normal de l'épithélium ainsi qu'au processus de régénération en cas de dommage (Rock et al., 2010, 2010). Les cellules sécrétrices de mucus, synthétisent et secrètent des mucines en forme de gel qui absorbent de l'eau pour former du mucus (Adler et al., 2013). Elles expriment différentes isoformes de mucines tels que la MUC5AC et la MUC5B (Zaidman et al., 2016). Ensuite, les cellules ciliées, impliquées dans la clairance mucociliaire, peuvent être évaluées par l'expression de tubulines, protéines situées au niveau des cils, et plus spécifiquement pour l'isoforme TUBB3A (Stewart et al., 2012a). Le facteur de transcription de ciliogénèse, FOXJ1 (Turner et al., 2011) peut également être utilisé comme marqueur de ces cellules ciliées.

Tableau 9. Principaux types cellulaires de l'épithélium broncho-pulmonaire

| Type cellulaire | Gène | Protéine | Fonction |
|-----------------------|--------|------------------------|--|
| Cellules basales | TP63 | Tumor Protein 63 (p63) | Facteur de transcription : régulation de la morphogénèse épithéliale |
| Cellules ciliées | TUBB3A | β -tubulin IV | Protéine située au niveau des cils |
| | FOXJ1 | Forkhead box J1 | Facteur de transcription : régulation de cils mobiles |
| Cellules caliciformes | MUC5AC | Mucin 5AC | Glycoprotéine présente dans la composition du mucus |

3.2.1.3 Culture à l'interface air-liquide

Dans ce type de culture, les cellules sont cultivées dans des inserts qui permettent aux cellules de se trouver à l'air au pôle apical alors que le milieu nutritif est apporté dans le compartiment inférieur au pôle apical, d'où le nom d'interface air-liquide. Ce type de culture mime le mieux des conditions physiologiques. Les cellules primaires comme des lignées sont utilisées soit en monoculture ou en co-culture.

Un pseudo-tissu pulmonaire peut être obtenu à partir de la différenciation de cellules primaires cultivées à l'IAL, comme montré dans la **Figure 14**. En effet, la différenciation permet d'obtenir différents types cellulaires et de mieux mimer les conditions physiologiques réelles. De plus, la sécrétion du mucus et le mouvement ciliaire

apportés par les cellules caliciformes et les cellules ciliées sont des facteurs importants pour mimer la clairance mucociliaire qui permet le déplacement et la rétention de particules. Les sphéroïdes cellulaires sont un autre exemple de ce type de modèle. Ici, des mini bioréacteurs sont utilisés pour cultiver les cellules dans une structure en forme sphérique (Bhowmick and Gappa-Fahlenkamp, 2016). D'autres modèles en 3D ont été développés et commercialisés, comme ceux de la société MatTek (« MatTek Corporation | Biotechnology Company ») et Epithelix (« Epithelix, Innovative In Vitro Solutions for Respiratory Diseases and Chemical Testing »). Ils peuvent être utilisés plusieurs mois sans perdre les fonctionnalités du tissu donc c'est un modèle adéquat pour des expositions répétées de gaz, particules ou n'importe quel xénobiotique. Due à la présence de différents types cellulaires, ces modèles peuvent être très résistants donc c'est un paramètre à considérer pour l'étude de certains polluants nécessitant des modèles plus sensibles (Loret et al., 2016; Zavala et al., 2016).

3.2.1.4 « Organ on a chip » – Organe sur une puce

Ce système a été développé en combinant la technologie de la microfluidique et l'ingénierie tissulaire afin de mieux reproduire la complexité de principaux organes humains (cœur, rein, foie, intestin et poumon). Le dispositif peut reconstituer des conditions physiologiques comme les connexions tissulaires, les interactions entre différentes matrices, des gradients de concentrations de nutriments etc... («Recent advances in microfluidic technologies for organ-on-a-chip,» 2019). Ce type de système peut être utilisé pour évaluer les particules atmosphériques (Zheng et al., 2017).

Un vaste nombre de types de cultures et de modèles cellulaires sont disponibles pour évaluer la toxicité de particules *in vitro*. Bien qu'ils présentent aussi des avantages et des inconvénients, les avancées en matière de modèles *in vitro*, permettent de s'approcher de plus en plus des conditions physiologiques réelles. Leur choix dépendra du polluant étudié, par exemple les modèles épithéliaux alvéolaires sont plutôt préconisés pour des polluants moins hydrosolubles et qui peuvent atteindre ce niveau dans l'arbre respiratoire (Zavala et al., 2020). Le **Tableau 9** montre les différents modèles cellulaires utilisés pour évaluer la toxicité de particules inhalées ainsi que leurs avantages et inconvénients à considérer.

Tableau 10. Modèles d'épithélium pulmonaire utilisés pour étudier la toxicité de particules. Adapté de (BéruBé et al., 2010; Bhowmick and Gappa-Fahlenkamp, 2016; Loret, 2017)

| Type d'épithélium | Type de culture | Modèle cellulaire | Provenance | Avantages | Inconvénients |
|---|-----------------|--|--|--|---|
| Epithélium bronchique | Monoculture | Calu-3 | Cellules isolées d'un adénocarcinome bronchique | Lignée immortalisée, formations de jonctions serrées, sécrétion de mucus, développement de cils | Variabilité en la formation des jonctions serrées |
| | | BEAS-2B | Cellules transformées d'un épithélium bronchique | Lignée immortalisée, sécrétion de cytokines, expression d'antioxydants | Absence de jonctions serrées, sécrétion de mucus et de formation de cils |
| | | NCI-H292 | Cellules isolées d'un adénocarcinome bronchique | Lignée immortalisée, sécrétion de mucus | Absence de jonctions serrées, et de formation de cils |
| | | 16HBE14o- | Cellules transformées d'un épithélium bronchique | Lignée immortalisée, différenciation, organisation en multicouche, formation de jonctions serrées, sécrétion des cytokines, Développement de cils et microvillosités | Absence de sécrétion de mucus |
| | | NHBE, hAECB | Cellules primaires d'un épithélium bronchique | Cellules primaires, différenciation, organisation en multicouche, formation de cellules ciliés et de jonctions serrées, sécrétion de mucus, expression de cytokines, milieu sans sérum | Durée de vie limitée, perte de fonctions quand les passages augmentent, variations entre donneurs |
| Autres modèles d'épithélium pulmonaire | Co-culture | Cellules épithéliales pulmonaires associées avec un autre type cellulaire composant la barrière pulmonaire | Co-culture de lignées, ou co-culture de cellules primaires | Modèle plus représentatif des conditions physiologiques | Variabilité plus importante |

| | | | | | |
|--|---|---|--|---|----------------------------|
| | Culture à l'interface Air-Liquide (IAL) | Possible pour la plupart des modèles | Monoculture ou co-culture 3D de cellules primaires ou des lignées | Augmentation de la différenciation de cellules, de la production de mucus | Culture sur insert couteux |
| | Modèles 3D | EpiAirway ou EpiAlveolar (MatTek) et MucilAir (Epithelix) | Epithélium reconstitué à partir de cellules primaires trachéobronchiques ou épithéliales nasales | Epithélium reconstitué, cellules primaires différenciés (cellules basales, caliciformes et ciliées), utilisable plusieurs mois, formation de jonctions serrées, milieu sans sérum | Couteux |

3.2.2 Méthodes d'exposition

En matière d'évaluation *in vitro* de particules, une de contraintes majeures est de s'approcher des conditions réelles d'exposition par inhalation. Afin d'assurer la précision, la reproductibilité et l'efficacité des résultats obtenus dans des études *in vitro*, plusieurs paramètres sont nécessaires à prendre en compte lors des designs des tests toxicologiques : le modèle cellulaire à utiliser (**cf. section 3.2.1**), les doses et la durée d'exposition et finalement la méthode d'exposition. Concernant ce dernier paramètre, globalement, il existe deux méthodes d'exposition : en immergé et à l'IAL (Loret, 2017; Mülhopt et al. 2016).

La méthode en immergé est la plus souvent utilisée (**cf. Figure 15A et 15B**). Les cellules sont cultivées sur un support solide ou sur une membrane semi-perméable (exposition en pseudo-ALI) et le milieu recouvre la totalité de l'épithélium et lors des expositions une suspension de particules est mise en contact avec les cellules. Elle présente des nombreux avantages : c'est une méthode d'exposition rapide et facile à mettre en œuvre, elle permet d'étudier une grande diversité de polluants, des concentrations élevées ainsi que plus de paramètres. Bien que cette démarche ait des avantages intéressants, elle a aussi ses limitations (Clippinger et al., 2018; Mülhopt et al., 2016; Upadhyay et al., 2014; Zavala et al., 2020).

- L'interaction entre différents types cellulaires n'a pas lieu en culture en immergé, où en général, un seul type cellulaire est utilisé ;
- Les cellules sont couvertes du milieu, ce que n'est pas représentatif des conditions physiologiques. Le milieu pourrait changer la pression partielle de l'oxygène par rapport à la surface pulmonaire, où la couche du liquide pulmonaire qui recouvre les cellules est très fine ;
- La remise en suspension de particules (prélèvement → séparation par filtration → sonication) peut altérer l'état d'agglomération ainsi que leur composition chimique. De plus, les gaz de combustion ne sont pas pris en compte ;
- Le milieu de culture contient un grand nombre de biomolécules dont des protéines du sérum qui peuvent s'adsorber sur les particules (formation de corona) et modifier l'effet toxique de celles-ci (Lundqvist et al., 2011) ;

- Les doses ne sont pas déterminées correctement à cause de plusieurs facteurs qui sont ignorés comme l'état d'agglomération de particules, la vitesse de sédimentation, la solubilisation de particules. De plus, la dose est fournie en un temps limité alors que pendant l'inhalation d'un aérosol les particules se déposent graduellement (linéairement) sur une période définie. Cela pourrait modifier la qualité et l'intensité des effets biologiques.

Pour s'affranchir des limites des méthodes en immergé, les méthodes d'exposition à l'interface air-liquide existent (**cf.**

Figure 15C). Dans cette technique, les cultures sont cultivées sur des inserts permettant de les exposer à un aérosol (ou un gaz) directement au pôle apical tandis que le milieu est approvisionné via le pôle basal. Cette approche permet une évaluation plus réaliste d'une exposition par inhalation (BéruBé et al., 2010; Bhowmick and Gappa-Fahlenkamp, 2016; Mülhopt et al., 2016; Paur et al., 2011) et d'implémenter le principe de 3R : Remplacer, réduire et raffiner l'expérimentation animale dans les études de toxicité.

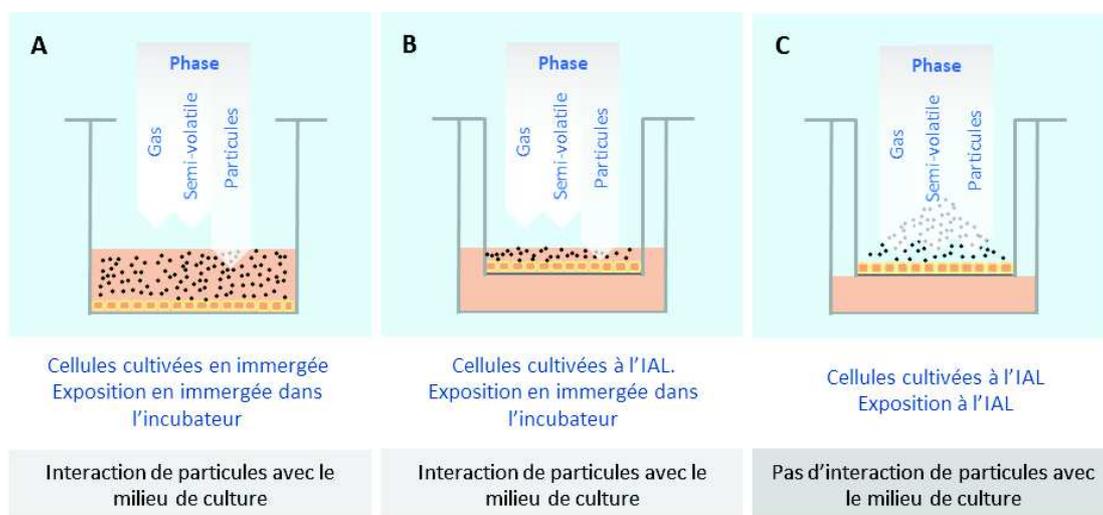


Figure 15. Différents modes d'exposition in vitro aux particules (Adapté du Vitrocell®.com)

Plusieurs dispositifs ont été développés afin d'étudier l'exposition à l'IAL. Parmi les systèmes commercialisés, les systèmes Vitrocell (« VITROCELL® - Advanced in vitro exposure systems ») et Cultex (« First Choice for in Vitro Toxicology at the Air-Liquid Interface ») sont les plus souvent utilisés. D'autres systèmes non commercialisés existent mais nécessitent des modifications pour standardiser le dépôt de particules : Biological aerosol trigger, Voisin chamber, Minu cell system, Nano Aerosol Chamber In vitro Toxicity,

air-liquid interface cell exposure (ALICE) system (Upadhyay and Palmberg, 2018) et Electrostatic Aerosol in Vitro Exposure System (EAVES) (Bruijne et al., 2009). Le dépôt de particules de ces systèmes est assuré par des phénomènes de diffusion, sédimentation, thermophorèse ou précipitation électrostatique (Zavala et al., 2020).

3.2.2.1 Système d'exposition Vitrocell®

Le système d'exposition Vitrocell® est un dispositif commercial conçu pour l'exposition des cellules en culture à l'IAL. Un schéma du module d'exposition Vitrocell® est montré dans la **Figure 16**. Le module est conçu pour maintenir des cultures *in vitro* pendant une exposition aux aérosols à l'IAL. Les cultures sont préparées préalablement dans des inserts avec des membranes semi-perméables. Pendant l'exposition, le pôle basal permet une alimentation du milieu en continu tandis que l'aérosol de particules est distribué en pôle apical. La zone autour des puits est thermostatée par un bain circulant d'eau. Un deuxième module est exposé en parallèle à l'air pur comme contrôle négatif. Le nombre de puits disponibles par module dépend du modèle mais il peut varier entre 3-12. L'approche du système VITROCELL® permet d'obtenir des résultats plus réalistes qu'une exposition en immergé.

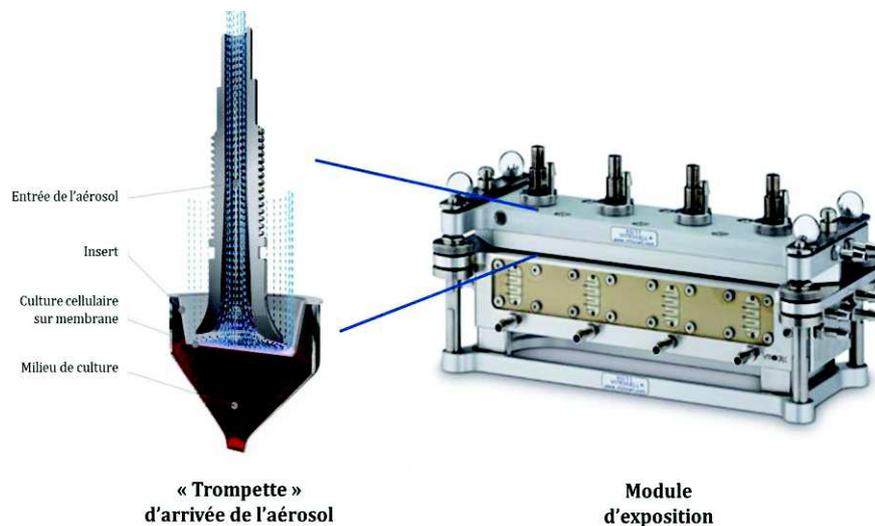


Figure 16. Schéma du module d'exposition VITROCELL®

A gauche, « Trompette » d'arrivée de l'aérosol et à droite, module d'exposition. Adapté de www.vitrocell.com

3.3 Apport des modèles in vitro dans l'étude des mécanismes impliqués dans la toxicité des PF et PUF

De nombreuses études expérimentales *in vitro* montrent les effets néfastes des particules fines et PUF. Les mécanismes d'action incluent l'altération du processus de phagocytose et des défaillances des mécanismes de défense, la génération d'EROs, l'induction du stress oxydant et de l'inflammation (Berend, 2016; Brook et al., 2010), des dommages à l'ADN (Møller et al., 2014) et du dysfonctionnement mitochondrial (Upadhyay et al., 2003)(cf. Figure 17).

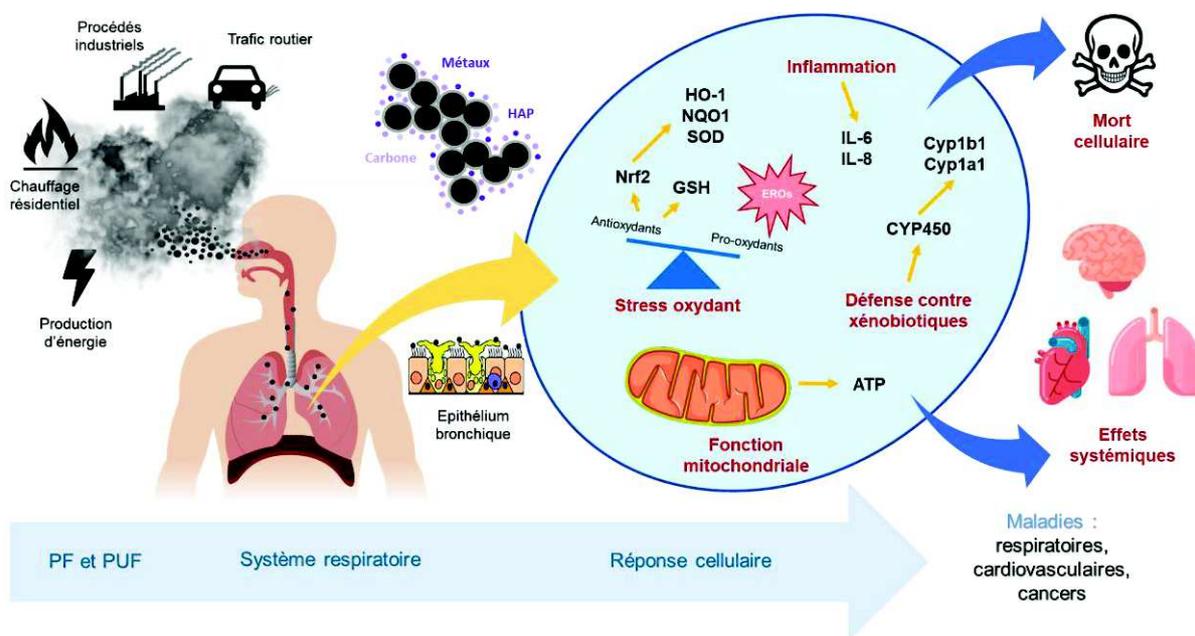


Figure 17. Mécanismes d'action cellulaires impliqués dans la toxicité de PF et PUF

3.3.1 Stress oxydant et inflammation

De nombreuses études scientifiques montrent une corrélation entre les particules fines et ultrafines et l'induction du stress oxydant. Il provoque des effets aux niveaux moléculaires et cellulaires tels qu'une réponse inflammatoire, une modification de la prolifération et de la différenciation cellulaire et la mort cellulaire (Baeza and Marano, 2007). De plus, il joue un rôle critique dans la transduction de réponses systémiques des particules (Gangwar et al., 2020).

Le stress oxydant peut-être défini comme « *un déséquilibre entre les oxydants et les antioxydants, en faveur des oxydants, pouvant conduire à des dommages* » (Sies, 2015). Les EROs, résultent du métabolisme cellulaire normal, cependant, dans des

conditions pathophysiologiques, ils peuvent être produits à des taux élevés (Sies, 1997). Quand l'accumulation des EROs dépasse leur élimination, l'équilibre entre le système d'oxydation et le système antioxydant est altéré et peut conduire à des réponses cellulaires plus ou moins importantes en fonction du stress soumis (Kelly, 2003) (**Figure 18**).

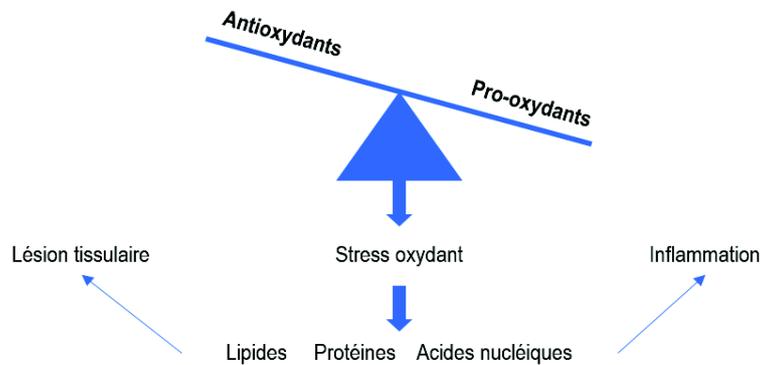


Figure 18. Balance représentant le stress oxydant

Adapté de Kelly, 2003.

Lorsque le stress oxydant est faible, la transcription des enzymes antioxydantes est activée par le facteur de transcription Nfr2. Un stress oxydant moyen, active la cascade de MAP kinases et du facteur de transcription NF-κB (aussi AP-1) nécessaire pour l'induction de la plupart des médiateurs pro-inflammatoires. Quand le stress oxydant est important la mitochondrie active le programme d'apoptose qui peut conduire à une nécrose si le stress augmente (**Figure 19**).

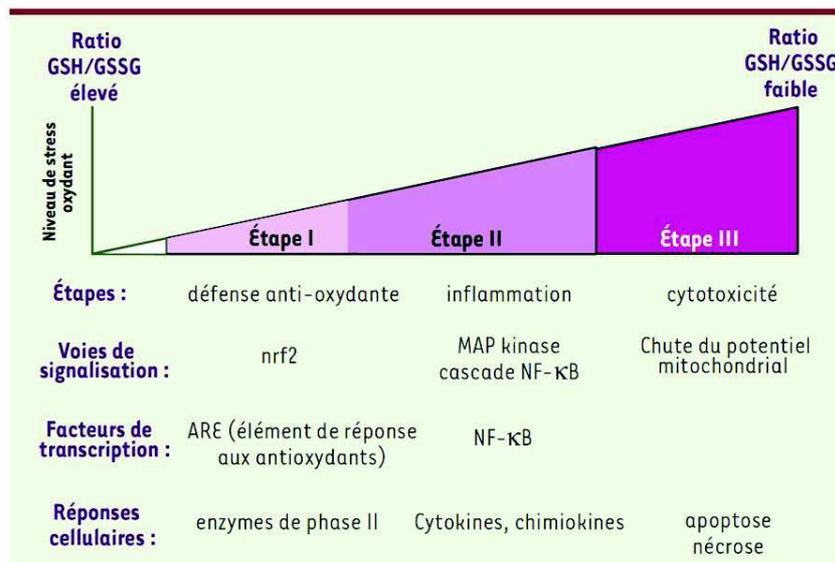


Figure 19. Différentes étapes du modèle stress oxydant

Source : Baeza et Marano 2007.

Les EROs peuvent être des radicaux libres tels que l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) ou le radical hydroxyle ($\cdot OH$), molécules très instables et réactives due à leur électron non apparié, mais aussi des molécules non radicalaires dérivées de l'oxygène comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Les EROs sont produites, en conditions physiologiques, par des sources intracellulaires (la chaîne mitochondriale respiratoire, les monoamines oxydases (MAOs), l'aconitase, les cytochromes P450, la NAD(P)H oxydase), etc... et par des sources extracellulaires (les macrophages, les neutrophiles). Des sources externes à l'organisme, comme les polluants atmosphériques, peuvent également contribuer à leur formation (**cf. Figure 20**). En effet, trois mécanismes peuvent être impliqués : le premier concerne la génération des radicaux libres par des réactions redox entre les différents produits à la surface des particules ainsi que par l'interaction avec d'autres constituants, ensuite, la libération de cytokines et des médiateurs oxydatifs par l'activation des cellules inflammatoires induites par les polluants et finalement, l'interaction entre les polluants et les cellules engendre également la production des EROs par l'activation de systèmes pro-oxydants endogènes (Niemann et al., 2017).

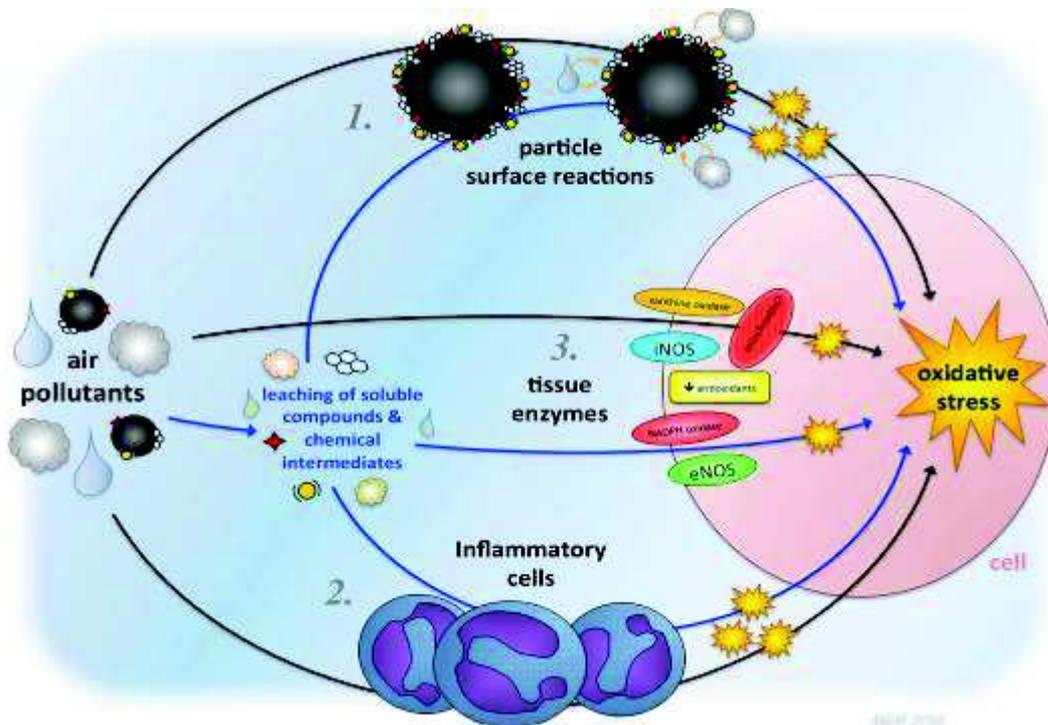


Figure 20. Mécanismes de formation de EROs par les polluants atmosphériques.

Source : Neiman et al., 2017

L'action des EROs peut être retardée ou inhibée par deux types de molécules antioxydantes : non enzymatiques (le glutathion, l'acide urique, les thiorédoxines, etc...) ou

enzymatiques (la superoxyde dismutase (SOD), les glutathions peroxydases (GPX), la catalase et l'hème oxygénase)(Haleng et al., 2007).

Une production importante d'EROs induit des dégâts des composants cellulaires par oxydation des lipides, des protéines et d'ADN.

- La *peroxydation lipidique* est le processus où les radicaux libres attaquent les acides gras insaturés des membranes cellulaires, les lipoprotéines et d'autres molécules contenant des lipides. Le radical extrait un atome d'hydrogène du lipide et une chaîne de réactions peroxydantes s'active donnant lieu à des changements structurels et fonctionnels de la membrane (Fuchs et al., 2014; Jancic and Stosic, 2014) ;
- *Oxydation de protéines*. Les radicaux libres peuvent provoquer des dommages oxydatifs au niveau des acides aminés et des protéines. Les protéines oxydées deviennent très hydrophobes et perdent leur activité biologique, en particulier leurs activités enzymatiques. Ce type d'oxydation donne lieu à la formation des dérivés carbonylés, utilisés comme marqueurs biologiques de l'oxydation protéique (Berger, 2006) ;
- *Domage à l'ADN*. L'ADN est très sensible à l'attaque des EROs. Le radical hydroxyle peut réagir avec les composés de la molécule d'ADN et endommager les bases azotées. Les bases qui composent l'ADN, notamment la guanine, sont sensibles à l'oxydation (Favier, 2003). L'oxydation des bases engendre des produits comme la 8-hydroxyguanine ou la 8 hydroxy-2-doxyguanosine (8-OHdG) qui peuvent être dosés et servir comme marqueurs biologiques du dommage de l'ADN par les radicaux libres.

Les métaux présents à la surface de particules agissent comme des catalyseurs de lésions oxydatives touchant les macromolécules biologiques. Les métaux de transition Fe, Co, Cr et V subissent un cycle d'oxydo-réduction produisant un radical hydroxyle très réactif alors que Cd, Hg, Ni et Pb déplètent le glutathion et les protéines portant un groupement sulfhydryle (Baeza and Marano, 2007; Valko et al., 2005).

Bien que les métaux de transition aient un fort pouvoir oxydatif, ce sont les composés organiques (ex. HAP et quinones) qui seraient impliqués dans la production des EROs par les PUF. En effet, les composés organiques des PUF induisent une production d'EROS par les macrophages et les cellules épithéliales bronchiques (Baulig et al., 2003; Hiura et al., 1999). Les HAP peuvent être convertis en quinones via différents enzymes comme le CYP1A1. En condition de stress oxydant, une défense cellulaire est activée grâce à la translocation du facteur de transcription Nuclear erythroid 2-related factor-2 (Nrf2) vers le noyau qui permet la production d'enzymes antioxydantes. Si cette défense échoue l'accumulation d'EROs intensifie le stress oxydant et peut induire une réponse inflammatoire importante (**cf. Figure 21**) (Li et al., 2016). Lorsqu'il n'y a pas de stress oxydant, keap1 va induire l'ubiquitination de Nrf2 permettant alors sa dégradation par le protéasome afin de réguler son expression (Suzuki et al., 2016).

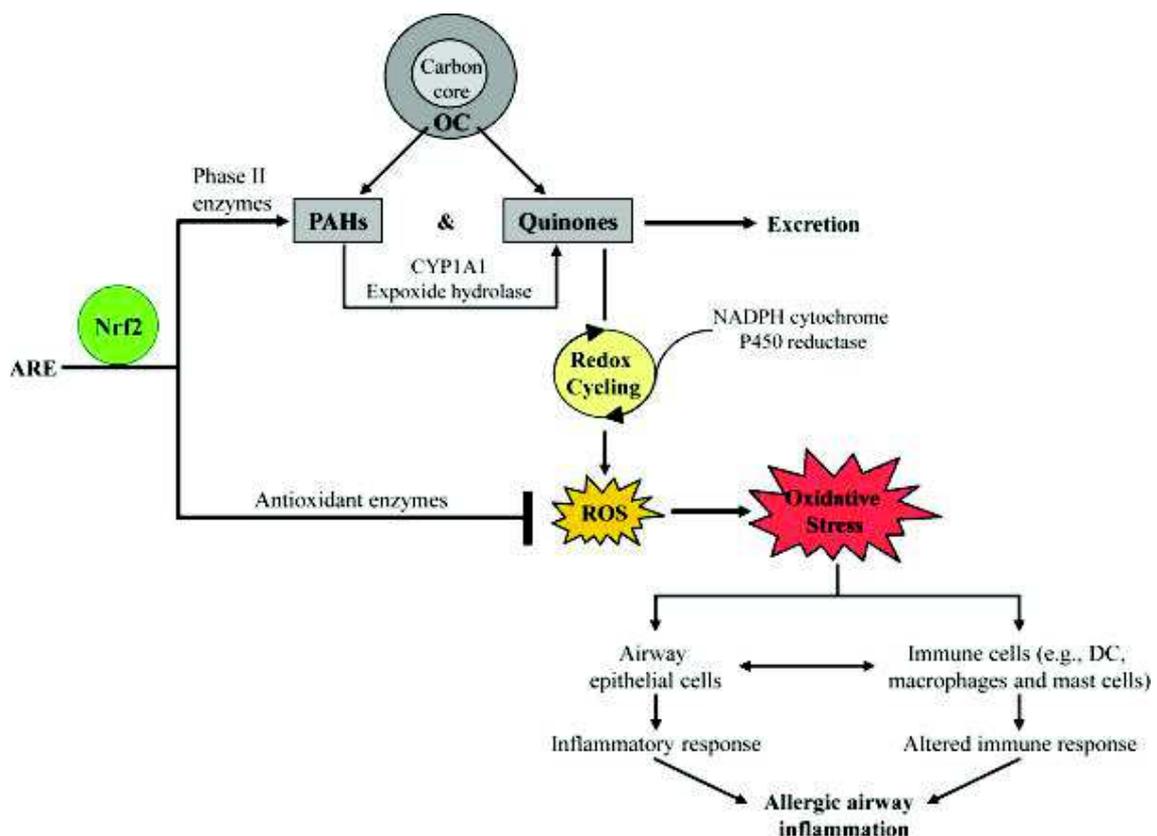


Figure 21. Induction du stress oxydant par les particules et rôle dans la réponse inflammatoire pulmonaire.

Li Ning et al. 2003 ont montré que les PUF atmosphériques avaient une teneur en HAP plus importante que les PM₁₀ et les PM_{2.5} ainsi qu'un potentiel oxydant (test DTT) plus important provoquant des fortes lésions cellulaires associées à une induction de HO-1 et une déplétion du glutathion intracellulaire. De plus, les PUF ont été retrouvées dans les mitochondries, où elles peuvent induire des dommages structuraux ce qui pourrait contribuer au PO des PUF (Li Ning et al., 2003).

Le stress oxydant est à l'origine de diverses pathologies. La suppression de certains gènes ou l'apparition de molécules biologiques anormales formées lors d'un stress oxydant seraient à l'origine de maladies comme le cancer (Favier, 2003). Le stress oxydant et la production d'EROs associés aux composés génotoxiques absorbés par les particules comme les HAP et les métaux peuvent expliquer les dégâts de l'ADN et l'association entre le risque de cancer de poumon et l'exposition aux particules atmosphérique (Hamra et al., 2014; Huang et al., 2017). Une méta-analyse d'études publiées sur les risques associés au développement d'un cancer du poumon associe l'exposition aux PM_{2.5} et la survenue d'adénocarcinomes (Huang et al., 2017).

L'inflammation est considérée comme un mécanisme majeur dans la plupart des effets néfastes des PM sur la santé. Plusieurs études montrent son implication dans le développement de pathologies cardiovasculaires ou de cancer. L'inflammation est une réponse complexe de type immunitaire face à une agression par un agent exogène ou endogène. La réaction inflammatoire a comme objectif de permettre l'acheminement des cellules phagocytaires sur le lieu de l'inflammation. Au niveau pulmonaire, la réponse inflammatoire est initiée principalement par les cellules immunitaires qui se trouvent dans les alvéoles : les macrophages alvéolaires. Ils secrètent des médiateurs pro-inflammatoires et anti-inflammatoires parmi lesquels se trouvent les cytokines.

Après une exposition aux particules fines et ultrafines, les macrophages alvéolaires et l'épithélium pulmonaire secrètent des cytokines et chimiokines tels que le « Tumor Necrosis Factor » (TNF- α) ainsi que des interleukines comme l'IL-6 et l'IL-8 (Fujii et al., 2001).

Les mécanismes de la réponse inflammatoire induits par les particules atmosphériques sont fortement associés à la taille de particules. Les particules ultrafines entraînent une réponse pro-inflammatoire notoire due à leur réactivité de surface. Le

dérèglement des fonctions épithéliales associé à une exposition répétée des particules pourrait engendrer une inflammation chronique ainsi qu'un remodelage bronchique comme il a été montré par Churg et al. 2003 (Churg et al., 2003).

3.3.2 Dysfonction mitochondriale

Les mitochondries sont des organites intracellulaires présentes dans toutes les cellules eucaryotes. Leur nombre dépend de chaque type cellulaire et des besoins énergétiques. Elles sont impliquées dans plusieurs fonctions cellulaires comme dans certaines formes d'apoptose, la régulation ionique et la production et détoxification de radicaux libres. Cependant leur rôle principal est la production d'énergie sous forme d'ATP (Adénosine Triphosphate) par phosphorylation oxydative (OXPHOS). La dysfonction mitochondriale est définie comme une anomalie dans au moins un de ces processus (Brand and Nicholls, 2011; Murphy Elizabeth et al., 2016) et elle est impliquée dans le développement de pathologies (Prakash et al., 2017).

La production d'ATP (**Figure 22**) est fortement liée à la glycolyse, la β -oxydation des acides gras et le cycle de Krebs. En effet, l'ensemble des co-enzymes réduits (Nicotinamide Adénine Dinucléotide – NADH, et Flavine Adénine Dinucléotide - FADH₂) produits lors de ces voies métaboliques, sont ensuite « réoxydés » au sein de la chaîne respiratoire située dans la membrane interne de la mitochondrie permettant la formation d'ATP. Ce processus est connu comme phosphorylation oxydative (OXPHOS) et comprend différents transporteurs d'électrons : le complexe I (NADH-coenzyme Q oxydoréductase), le complexe II (succinate-coenzyme Q oxydoréductase), le complexe III (ubiquinol-cytochrome C oxydoréductase), le complexe IV (cytochrome C oxydase) et le complexe V (ATP synthase). Lors de la phosphorylation oxydative, les complexes I, II et III assurent la translocation des protons à l'extérieur de la membrane interne de la mitochondrie, ensuite l'ATP synthase utilise ce gradient pour générer l'ATP. La sortie de protons est liée à un transfert électronique initié par l'oxydation de coenzymes NADH et FADH₂, qui cèdent 2 électrons jusqu'à l'accepteur final le dioxygène (O₂) (Gautheron, 1984; Nolfi-Donagan et al., 2020).

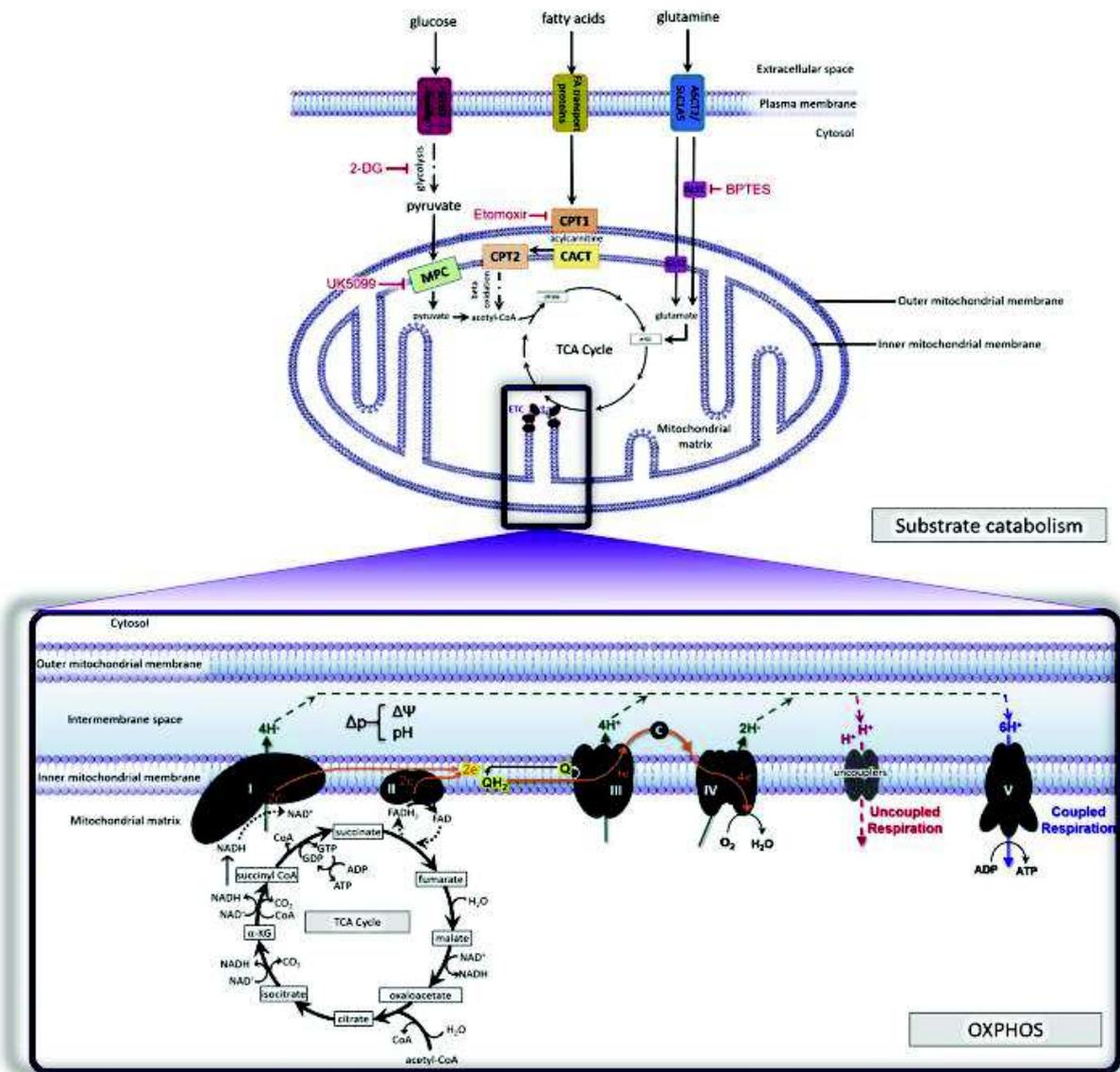


Figure 22. (A) Sources des substrats pour la respiration mitochondriale et (B) Phosphorylation mitochondriale (OXPHOS)

Source : Nolfi-Donagan, 2020

De nombreuses études montrent l'impact des particules atmosphériques sur la fonction mitochondriale caractérisé par une production importante d'EROs mitochondriale. Leclercq et al., 2018 ont observé que les PM_{2.5} peuvent endommager l'homéostasie mitochondriale des cellules NHBE et BEAS-2B. Ceci par un dysfonctionnement mitochondrial important et une diminution de l'apport énergétique de la cellule. De plus, des particules ont été retrouvées dans le cytosol mais pas dans la mitochondrie (BEAS-2B) (Leclercq et al., 2018). Jin et al., 2018 ont montré qu'une exposition aux PM_{2.5} induit des atteintes de la structure mitochondriale, incluant la dynamique mitochondriale, la biogenèse et une modification de la morphologie des cellules. De plus les PM_{2.5} induisent une formation importante d'EROs (Jin et al., 2018). L'accumulation de PUF peut être observée par microscopie électronique dans les mitochondries de macrophages en culture. En altérant le fonctionnement de ces organites cellulaires, les particules peuvent contribuer à la production de stress oxydant (Li Ning et al., 2003).

3.3.3 Métabolisme de xénobiotiques

Compte tenu du caractère lipophile de certains xénobiotiques, ils diffusent à travers la membrane plasmique des cellules où ils peuvent interagir avec des récepteurs cytoplasmiques. Ces récepteurs agissent comme facteur de transcription et augmentent l'expression d'enzymes et de transporteurs du métabolisme des xénobiotiques catalysant des réactions pour pouvoir les éliminer de la cellule. Les xénobiotiques sont d'abord activés par les enzymes de la phase I (dépendant majoritairement du système des mono-oxygénases à Cytochrome P450). Ensuite, ils sont conjugués par les enzymes de la phase II comme la glutathion S transferase (GST) qui ajoute un groupement hydrophile (ex. glutathion) sur la fonction activée et qui permet d'augmenter la solubilité dans les fluides biologiques facilitant son élimination. Finalement, ces composés sont éliminés par des transporteurs actifs de la phase III.

Le récepteur AhR (aryl hydrocarbon receptor) est un facteur de transcription, essentiel à la cellule, dont la principale fonction est la régulation de l'expression d'enzymes du métabolisme de xénobiotiques (CYP1a1, CYP1a2, CYP1b1) (Beischlag et al., 2008). Il est exprimé dans de nombreux tissus et serait également impliqué dans des nombreuses fonctions physiologiques, comme le contrôle du cycle cellulaire, la modulation

du système immunitaire, le développement embryonnaire, le renouvellement et la différenciation de cellules souches.

Dans la voie classique, AhR est présent dans le cytoplasme. Lors de la liaison avec des ligands (ex. TCDD ou HAP), le complexe AhR se transloque vers le noyau, où il forme un complexe avec ARNT et se lie à XRE, induisant l'expression du gène AhR. L'AhR peut également induire la transcription de gènes impliqués dans l'inflammation, la réponse immunitaire et/ou le développement. AhRr entre en compétition avec l'AhR pour la liaison avec l'ARNT et forme l'hétérodimère inactif AHRR-ARNT. La dissociation du complexe transcriptionnel AHR conduit à la translocation de l'AhR vers le cytoplasme, où il est dégradé via la voie protéasomale (Choudhary and Malek, 2020; Kazmi and Avadhani, 2020) (Figure 23).

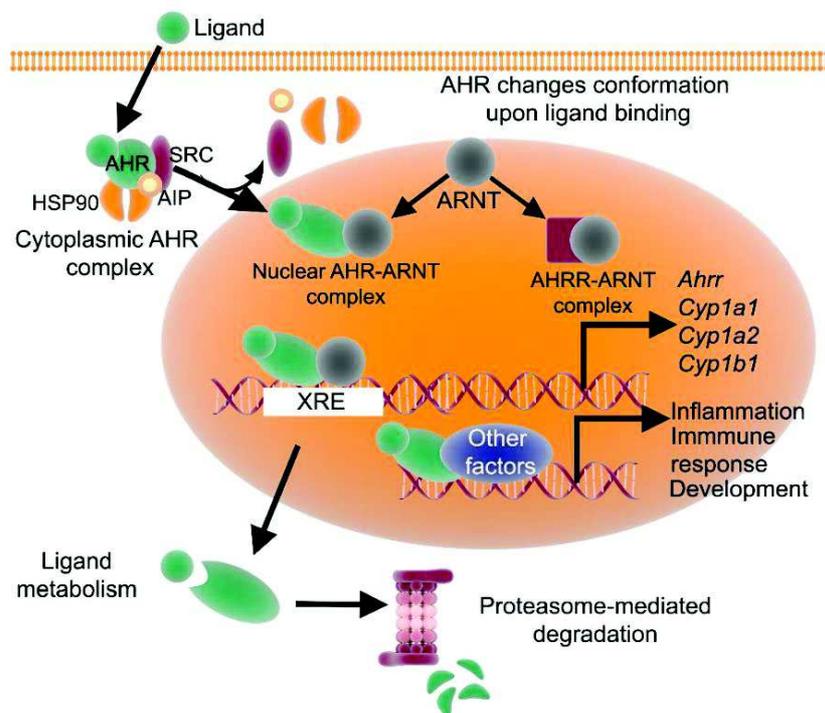


Figure 23. Voie de signalisation du AhR.

AhR : récepteur d'hydrocarbure aryle ; AhRr : répresseur AhR ; ARNT : translocateur nucléaire AhR ; AIP : protéine interagissant avec AhR ; Ub : ubiquitine ; et XRE : élément de réponse aux xénobiotiques. Source : Choudhary and Malek, 2020

En fonction des conditions expérimentales, AHR peut agir sur l'activation ou l'atténuation de la toxicité des xénobiotiques. Il est associé au stress oxydant cellulaire à considérer lors de l'étude des mécanismes d'action des xénobiotiques : inflammation, enzymes antioxydants et pro-oxydants, cytochrome P450 (Dalton et al., 2002).

Les ligands de AhR (ex. TCDD et le benzo[a]pyrène) induisent l'expression du cytochrome p450 1A1 (CYP1A1) qui peut générer des EROs. Ceci entraîne des dommages à l'ADN et une inflammation. Cependant, des ligands phytochimiques antioxydants peuvent aussi se lier à AHR et induire une régulation positive du CYP1A1. Ils activent également des facteurs de transcription antioxydants comme NFR2 qui améliore l'expression de la NAD (P) H déshydrogénase [quinone] 1 (NQO1) et de l'hème oxygénase 1 (HMOX1) et inhibe la génération des EROs (**Figure 24**) (Furue et al., 2014).

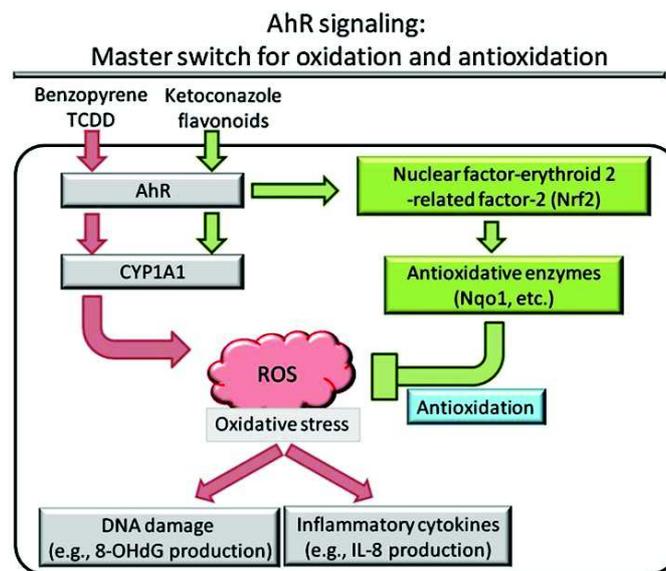


Figure 24. AhR et stress oxydant.

AhR un médiateur clé de la réponse inflammatoire et il est connu pour jouer un rôle essentiel dans l'immunorégulation. Il interagit directement avec la voie classique du nuclear factor-kappa B (NF- κ B) (RelA). En comparaison avec d'autres types de cellules humaines, des fortes expressions d'AhR et de NF- κ B RelB sont observées dans les macrophages alvéolaires humains suggérant que l'interaction AhR-RelB pourrait jouer un rôle important dans la modulation des réponses immunitaires / inflammatoires et pourrait être importante dans la régulation et la résolution de l'inflammation pulmonaire. Cette interaction aurait un rôle important dans des maladies telles que l'asthme et la carcinogenèse pulmonaire (Tian et al., 2010).

Les composés organiques de particules fines et ultrafines entraînent l'activation d'AhR et par conséquent l'induction des gènes impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques décrits précédemment (Harmon et al., 2018; Vogel et al., 2020).

3.3.4 Etudes *in vitro* à l'IAL des particules de combustion

A ce jour, la littérature scientifique sur ce type de particules se heurte à plusieurs difficultés et montre qu'il est essentiel de standardiser les conditions d'exposition. En effet, plusieurs paramètres peuvent intervenir dans les résultats observés. Tout d'abord, la **source de particules** peut être assurée par différents moyens, la plus fréquente étant la collecte in-situ et la remise en suspension avant l'exposition sur le tapis cellulaire, et la nébulisation. D'autres approches, encore très peu utilisées, consistent à réaliser des expositions sur le terrain (Gualtieri et al., 2018), d'autres encore peuvent utiliser un dispositif relié directement à des échappements moteurs (Hawley et al., 2014a, 2014b). Des dispositifs commercialisés tels que le générateur de suies miniCAST (Ess and Vasilatou, 2019; Mamakos et al., 2013; Marhaba et al., 2019; Moore et al., 2014) peuvent également être utilisés. La production des suies est assurée par une flamme de diffusion produite grâce à un débit de carburant gazeux (propane ou liquide évaporé) et à l'air d'oxydation. L'avantage de ce type de dispositifs est qu'ils permettent une source fiable et reproductible d'aérosols. De plus, ce type permet la génération de particules à des tailles et compositions diverses en fonction des conditions de fonctionnement. Le second élément qui rend ces études compliquées est le **type de carburant** à utiliser. En effet, un aérosol est un mélange complexe dont leur composition et leur taille peuvent varier d'une expérience à une autre. Si nous nous intéressons aux émissions du trafic routier, par exemple, la composition des carburants trouvés sur le marché peut varier d'un fabricant à un autre ou bien, leur composition peut être impactée par l'effet du vieillissement. Afin de s'affranchir de cette variabilité, des substituts de carburants peuvent être utilisés. Ils simulent un carburant commercial afin de normaliser sa composition. Ensuite, le troisième paramètre à considérer est le **système d'exposition** à l'IAL. Des systèmes, comme CULTEX et Vitrocell® ont été développés et permettent de contrôler différents paramètres (temps et dose d'exposition) afin de réaliser des expositions proches des conditions réelles. Enfin, un dernier paramètre essentiel à l'étude des particules est le **choix du modèle cellulaire**. En effet, étant donné que le système respiratoire est la voie d'entrée des particules dans le corps, la majorité des études utilisent des modèles pulmonaires et notamment des modèles bronchiques. Les résultats biologiques obtenus pour une condition donnée peuvent varier en fonction de la sensibilité du modèle, ainsi, des modèles différenciés peuvent s'avérer plus résistants que des modèles plus simples (Sotty, 2019).

Dans les travaux cités, la démarche méthodologique prise peut varier d'une étude à une autre. Dans un premier temps, la durée dans le système d'exposition peut varier de quelques minutes à quelques heures en fonction du carburant, s'il est dilué ou pas etc. Ce paramètre est étroitement lié à la dose d'exposition. Ensuite, le temps de contact des particules avec les cellules est compris entre 0 h et plusieurs heures. Cette variation du temps est intéressante quand on s'intéresse aux réponses immédiates ou tardives des particules. Ensuite, une large gamme des marqueurs biologiques sont étudiés. Ils s'intéressent tous dans un premier temps à la cytotoxicité par des tests comme le MTT ou le dosage de la LDH. Ensuite, ils ciblent des mécanismes cellulaires tels que le stress oxydant, l'inflammation ainsi que le métabolisme de xénobiotiques par différentes méthodes comme la qRT-PCR, le WB etc. Enfin, la synthèse bibliographique souligne l'importance des différents paramètres abordés et leur impact dans la réponse biologique observée ainsi que le besoin de développer des protocoles standardisés qui permettent une évaluation par inhalation des particules dans des conditions contrôlées et représentatives des conditions physiologiques réelles. Le **Tableau 11** résume un ensemble des travaux portant sur l'étude *in vitro* de particules de combustion, notamment des carburants, sur des modèles pulmonaires utilisant une exposition à l'IAL.

Tableau 11. Bilan des études pour évaluer les propriétés toxicologiques de particules de combustion sur des modèles cellulaires à l'interface air-liquide.

| Type d'aérosol | Modèle cellulaire | Système d'exposition | Temp d'exposition | Temps d'incubation | Dose de particules | Paramètres étudiés | Référence |
|--|----------------------------------|-------------------------|-------------------|---------------------|---|---|------------------------|
| Gaz d'échappement incinérateur à déchet (Mazout) | BEAS-2B + THP-1 | CULTEX | 1 - 6 h | 20 h | 20 ng/cm ² | Cytotoxicité et inflammation (IL-8) | (Mülhopt et al., 2008) |
| Diesel et biodiesel | NHBE | EAVES | 5 - 60 min | 2 h | 0,7 - 340 ng/cm ² | Cytotoxicité, stress oxydant (HO-1), métabolisme (Cyp1a1), | (Hawley et al., 2014a) |
| Diesel | NHBE | EAVES | 90 - 180min | 1, 3, 6, 9, et 24 h | 0,36 à 1,1 µg/cm ² | Cytotoxicité, stress oxydant (HO-1), métabolisme (Cyp1a1), inflammation (IL-8, COX-2), dysfonction (HSP-70) | (Hawley et al., 2014b) |
| Diesel - Biodiesel - avec/sans traitement/filtre | A549 | Fait par le laboratoire | 3 h | 0 | / | Cytotoxicité, stress oxydant (HO-1, SOD, EROS, glutathion, génotoxicité) | (Barraud et al., 2017) |
| Diesel-Essence avec/sans additif : éthanol | 16HBE14o- + Monocyte | Fait par le laboratoire | 6h | 6 h | 600 - 2,8X10 ⁵ #/cm ³ | Cytotoxicité, stress oxydant (HO1, NQO1, GSR, glutathion), inflammation (IL8- TNF α) | (Bisig et al., 2016) |
| Essence | 16HBE14o- + Monocyte et MucilAir | Fait par le laboratoire | 6h | 6 h | 1,5 - 3,5X10 ⁵ #/cm ³ | Cytotoxicité, stress oxydant (HO1, SOD, NQO1), inflammation (IL-8, TNF α) | (Bisig et al., 2018) |
| Diesel | HFBE 21 | CULTEX | 60 min | 2 h | / | Cytotoxicité | (Knebel et al., 2002) |
| Diesel | A549 | Vitrocell | 1h30 | 24 h | 5 ng/cm ² | Cytotoxicité, stress oxydant (HO-1, glutathion), inflammation (IL-8) | (Kooter et al., 2013) |
| Essence (vieillis) | HBE et BEAS-2B | Fait par le laboratoire | 2 h | 24 h | 10 – 350 ng/cm ² | Cytotoxicité, inflammation (IL-6 et IL-8) | (Künzi et al., 2015) |
| Diesel -avec/sans filtre | A549 | CULTEX | 20 - 120 min | 3 h et 24 h | / | Cytotoxicité, stress oxydant (HO-1), inflammation (IL8, TNF α) | (Okubo et al., 2015) |

| | | | | | | | |
|--|---|-------------------------|------------------------|------------------|---------------------------------|---|--|
| Diesel | A549 + Ea.hy 926 + THP-1 + HMC-1 | Vitrocell | 2.5 – 20 min | 12 et 24 h | 1,75 - 5 µg/cm ² | Cytotoxicité, stress oxydant (HO-1, Nrf2), métabolisme (Cyp1a1), inflammation (IL-6, IL-8, COX-2) | (Fizeşan et al., 2018) |
| Carburant lourd - Diesel | BEAS-2B et A549 | Vitrocell | 4 h | / | 28 à 56 ng/cm ² | Métabolisme (Cyp1a1), inflammation (IL-6, IL-8) | (Oeder et al., 2015) |
| Diesel - Biodiesel - triacétin | pHBEC | CULTEX | 30 min | 5 h | / | Cytotoxicité, stress oxydant (HO-1), métabolisme (Cyp1a1), inflammation (IL-8) | (Vaughan et al., 2019a) |
| Diesel - N-acetylcystéine (antioxydant) | pHBEC avec/sans COPD | CULTEX | 30 min | 3 h | / | Cytotoxicité, stress oxydant (HO-1), métabolisme (Cyp1a1), inflammation (IL-8) | (Vaughan et al., 2019b) |
| Diesel | PBEC avec/sans THP-1 | XposeALI | 15 s – 45 s -3 min | 24 h | 12,7 µg/cm ² | Cytotoxicité, inflammation (IL-6, IL-8, TNF α) | (Ji et al., 2018) |
| Diesel | A549 + Ea.hy 926 + THP-1 + HMC-1 | Vitrocell | 1 min 8 s – 6 min 52 s | 6 h et 48h | 80 à 240 ng/cm ² | Cytotoxicité, stress oxydant (HO-1, SOD, NQO1, GSR, Nrf2), inflammation (IL-6, IL-8, TNF α), dysfonction (HSP-70) | (Klein et al., 2017) |
| Essence | BEAS-2B et MucilAir | Fait par le laboratoire | 24 h et 5 jours | / | | Cytotoxicité, stress oxydant (GSR), métabolisme (Cyp1a1) | (Rossner et al., 2019) |
| Diesel | PBEC | Vitrocell | 60 – 375 min | 1h30 – 3 h – 6 h | 0,65 - 31,72 ng/cm ² | Cytotoxicité, stress oxydant (HO-1, NQO1), inflammation (IL-8) | (Zarcone et al., 2016) |
| Diesel -Bactérie | PBEC avec/sans COPD | Vitrocell | 1h | 3h | 6,86 ng/cm ² | Cytotoxicité, stress oxydant (HO-1), inflammation (IL-8) | (Zarcone et al., 2017)(Zarcone et al., 2017) |

Objectifs de la thèse

Objectif de la thèse

Les effets sanitaires des PF et PUF ont été mis en évidence par plusieurs études scientifiques. En effet, une exposition à court et/ou long terme est associée au développement de maladies respiratoires tels que l'asthme, la BPCO ainsi que le cancer de poumon et elle serait aussi responsable de l'aggravation d'autres pathologies. La mise en place des réglementations concernant les émissions des PM a permis leur diminution en milieu urbain, où le principal émetteur est le trafic routier. Aujourd'hui, les transports automobiles utilisent majoritairement des carburants fossiles, carburants qui ne sont pas renouvelables. De ce fait, le développement de nouveaux carburants comme les biocarburants de seconde génération, pourrait contribuer à diminuer l'utilisation des carburants fossiles et leurs émissions toxiques. Cependant, en termes d'effets sanitaires, il existe encore très peu d'études qui s'intéressent aux produits de combustion de ces nouveaux carburants. Ainsi, l'objectif principal de ma thèse est « **Evaluer la toxicité de particules fines et ultrafines produites lors de la combustion de carburants pétroliers et de biocarburants, pour des conditions de combustion et d'exposition parfaitement contrôlées, représentatives de l'exposition humaine** ».

Stratégie expérimentale

Pour répondre à cet objectif, trois axes de travail ont été établis :

- a) Développement d'un protocole innovant d'exposition des cellules pulmonaires adapté à l'étude de particules fines et ultrafines ;
- b) Etude, pour des expositions contrôlées et reproductibles, de la toxicité de PUF riches en HAP sur le profil de réponse toxique *in vitro* ;
- c) Comparaison, pour un point de fonctionnement fixé, l'influence du carburant utilisé (essence et biocarburant de seconde génération, B2G) sur la composition physico-chimique et le profil de réponse toxique observé après exposition aux particules fines et ultrafines.

La stratégie expérimentale est résumée dans la Figure 25.

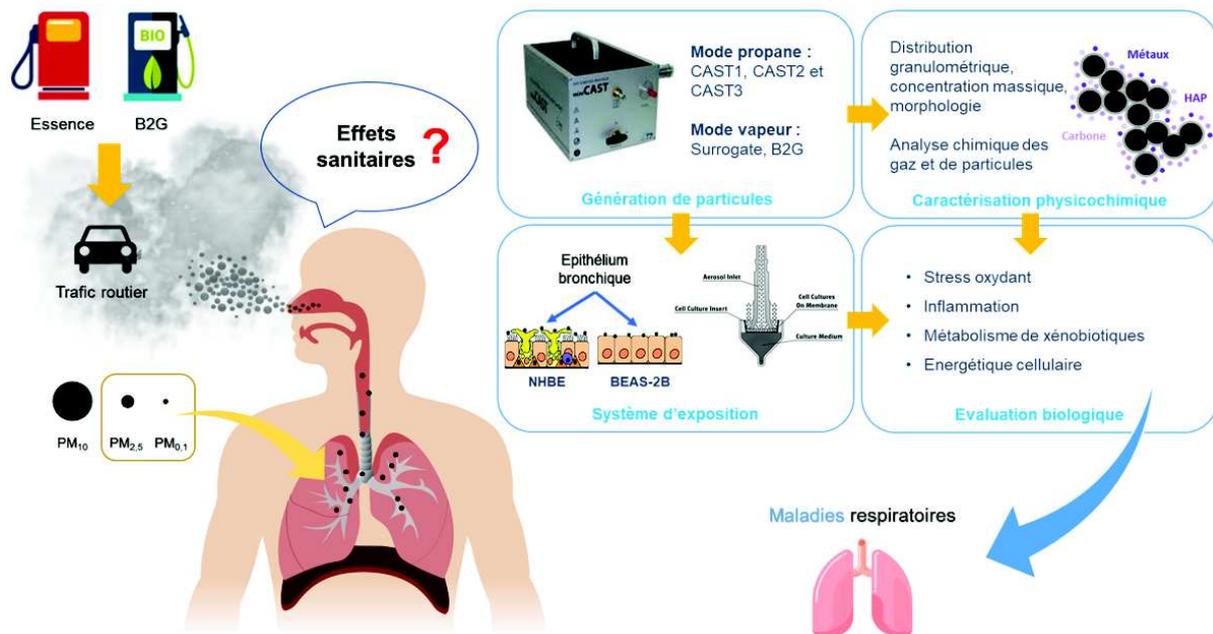


Figure 25. Stratégie expérimentale

Résultats

Les résultats obtenus lors de cette thèse sont présentés sous la forme de trois articles :

Article 1: Development of a standardized *in vitro* approach to evaluate microphysical, chemical, and toxicological properties of combustion-derived fine and ultrafine particles

Article 2: Toxicological impact of organic UFPs in human bronchial epithelial BEAS-2B cells

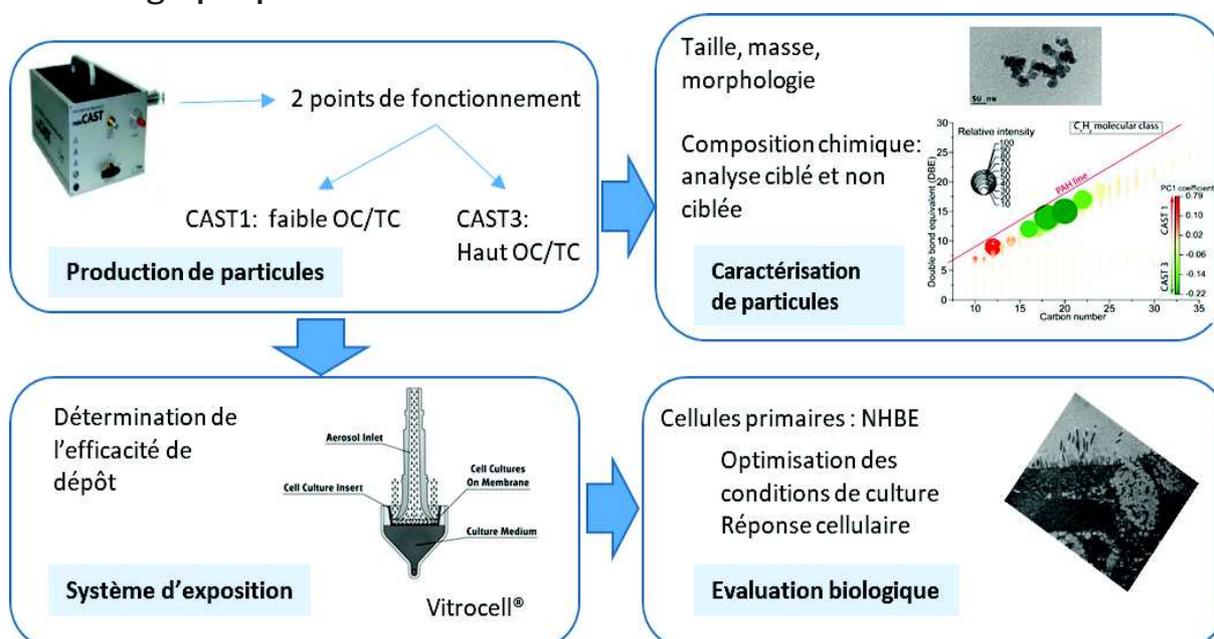
Article 3: Ultrafine particles issued from oil fuels and second-generation biofuels combustion: a comparative study of the physico-chemical and *in vitro* toxicological characteristics.

Article n° 1

Development of a standardized *in vitro* approach to evaluate microphysical, chemical, and toxicological properties of combustion-derived fine and ultrafine particles

Ana Teresa Juarez-Facio, Clément Castilla, Cécile Corbière, Hélène Lavanant, Carlos Afonso, Christophe Morin, Nadine Merlet-Machour, Laurence Chevalier, Jean-Marie Vaugeois, Jérôme Yon, Christelle Monteil

Résumé graphique



Contexte

L'étude des particules fines et ultrafines représente aujourd'hui un défi important dans le domaine de la toxicologie. En effet, à l'heure actuelle il n'existe pas de protocoles standardisés pour évaluer la toxicité de particules par inhalation. De ce fait, nous proposons dans cette étude une approche méthodologique qui permet d'étudier les caractéristiques physico-chimiques et toxicologiques de PF et PUF. Ainsi, nous avons utilisé et caractérisé deux types d'aérosols (CAST1 et CAST3), représentant des particules avec des teneurs différentes en composés organiques et nous avons exposé à l'interface air liquide (IAL) des cellules NHBE différenciées à ces particules.

Principaux résultats

La génération des particules a été assurée par le miniCAST qui, en variant les débits d'oxydation, génère des particules avec des caractéristiques physico-chimiques variables. Ce dispositif est une source fiable et reproductible de particules. Ainsi, les deux aérosols étudiés présentent des tailles (CAST1 114.04 nm > CAST3 58.9 nm) et une teneur en composés organiques (CAST1 OC/TC : 4.1 ± 3.5 % > CAST3 OC/TC : 87 ± 5 %) différents. L'analyse chimique non ciblée a montré la présence de HAP dans les deux aérosols, pour le CAST1 présentant plutôt des HAP à chaîne courte et pour le CAST3 des HAP à chaîne longue. L'analyse ciblée a confirmé ces résultats et indiqué la présence de composés comme l'acénaphylène, le fluorène et le phénanthrène dans les particules du CAST1 et le fluoranthène, le pyrène, et le b(gui)perylène dans les particules du CAST3. Les caractéristiques des particules ont une influence sur leur comportement dans le système d'exposition donnant une efficacité de dépôt différente pour chaque type d'aérosol. Tout de même, la dose de particules déposée sur le tapis cellulaire ($1.8 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) est très faible comparée à la plupart des études de toxicité.

Concernant l'étude toxicologique, dans un premier temps, la culture primaire de cellules épithéliales bronchiques humaines (NHBE) à l'IAL a été caractérisée. L'expression de gènes de différenciation ainsi que des observations en microscopie ont montré la reconstitution d'un épithélium pseudostratifié à 14 jours de culture à l'IAL. Ensuite, nous avons exposé les NHBE à des doses non cytotoxiques aux deux aérosols (CAST1 et CAST3) et, après 3 h d'incubation, nous avons étudié la réponse antioxydante et inflammatoire. Notre étude a montré que seulement les particules du CAST3 induisent une réponse antioxydante et inflammatoire. Ces résultats peuvent s'expliquer par la dose d'exposition utilisée pour chaque aérosol mais surtout par la composition chimique de particules.

Conclusion

Il existe peu d'études avec des approches similaires à celle que nous avons utilisé. Bien que l'exposition à l'IAL des cellules bronchiques permette une meilleure et plus réaliste évaluation des PF et PUF par inhalation, le choix d'un modèle primaire (NHBE) peut s'avérer complexe dû notamment au temps de culture nécessaire ce qui peut rendre les études longues. Cette première étude a permis de valider le système d'exposition utilisé dans ce travail. Cette validation s'est focalisée principalement sur le système

Vitrocell® qui a nécessité des contrôles réguliers ainsi que des ajustements pour permettre un fonctionnement optimal lors des expositions. Notre étude permet de souligner l'importance de développer des nouvelles approches qui permettent une évaluation correcte des PF et PUF dans des conditions physiologiques proches des conditions réelles. Elle souligne également les difficultés de travailler avec différents types de particules. En effet, les caractéristiques physico-chimiques jouent un rôle important dans leur comportement dans le système d'exposition (dépôt sur les cellules différent en fonction du point de fonctionnement utilisé). Malgré quelques mises au point nécessaires, cette étude propose de nouvelles perspectives pour l'étude des PF et PUF. Ainsi, notre approche peut être utilisée pour étudier d'autres types de particules sur d'autres modèles cellulaires.



ELSEVIER

Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

www.elsevier.com/locate/jes

JES

JOURNAL OF
ENVIRONMENTAL
SCIENCESwww.jesc.ac.cn

Development of a standardized in vitro approach to evaluate microphysical, chemical, and toxicological properties of combustion-derived fine and ultrafine particles

Ana Teresa Juarez-Facio¹, Clément Castilla², Cécile Corbière¹,
Hélène Lavanant², Carlos Afonso², Christophe Morin²,
Nadine Merlet-Machour², Laurence Chevalier³, Jean-Marie Vaugeois¹,
Jérôme Yon⁴, Christelle Monteil^{1,*}

¹Normandie Univ, UNIROUEN, UNICAEN ABTE, 76000 Rouen, France

²Normandie Univ, UNIROUEN, INSA Rouen, CNRS, COBRA, 76000 Rouen, France

³Normandie Univ, UNIROUEN, INSA Rouen, CNRS, GPM-UMR6634, 76000 Rouen, France

⁴Normandie Univ, UNIROUEN, INSA Rouen, CNRS, CORIA, 76000 Rouen, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 February 2021

Revised 31 May 2021

Accepted 2 June 2021

Keywords:

In vitro

Air-liquid interface

MiniCAST

Fine and ultrafine particles

Organic compounds

OC/TC

ABSTRACT

Ultrafine particles represent a growing concern in the public health community but their precise role in many illnesses is still unknown. This lack of knowledge is related to the experimental difficulty in linking their biological effects to their multiple properties, which are important determinants of toxicity. Our aim is to propose an interdisciplinary approach to study fine (FP) and ultrafine (UFP) particles, generated in a controlled manner using a miniCAST (Combustion Aerosol Standard) soot generator used with two different operating conditions (CAST1 and CAST3). The chemical characterization was performed by an untargeted analysis using ultra-high resolution mass spectrometry. In conjunction with this approach, subsequent analysis by gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) was performed to identify polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH). CAST1 enabled the generation of FP with a predominance of small PAH molecules, and CAST3 enabled the generation of UFP, which presented higher numbers of carbon atoms corresponding to larger PAH molecules. Healthy normal human bronchial epithelial (NHBE) cells differentiated at the air-liquid interface (ALI) were directly exposed to these freshly emitted FP and UFP. Expression of *MUC5AC*, *FOXJ1*, *OCN* and *ZOI* as well as microscopic observation confirmed the ciliated pseudostratified epithelial phenotype. Study of the mass deposition efficiency revealed a difference between the two operating conditions, probably due to the morphological differences between the two categories of particles. We demonstrated that only NHBE cells exposed to CAST3 particles induced upregulation in the gene expression of *IL-8* and *NQO1*. This approach offers new perspectives to study FP and UFP with stable and controlled properties.

© 2021 The Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences. Published by Elsevier B.V.

* Corresponding author.

E-mail: christelle.monteil@univ-rouen.fr (C. Monteil).

Introduction

Air pollution is a serious worldwide issue due to its health impacts. As classified by the International Agency of Research on Cancer (IARC) as carcinogenic to humans (Group 1), air pollution led to 8.8 million early deaths in 2015 (Lelieveld et al., 2019). The strongest evidence for public health concerns mostly includes coarse (PM₁₀, i.e. PM with a median aerodynamic diameter <10 µm) and fine particulates (FP, PM_{2.5}, i.e. PM with a median aerodynamic diameter <2.5 µm). This has been demonstrated both after short- and long-term exposures for cardiovascular and respiratory diseases, as well as for all-cause mortality (Brook et al., 2010; Burnett et al., 2018; Pope et al., 1995).

There is a growing concern in the scientific community about the contribution of ultrafine particles (UFP, PM with a median aerodynamic diameter of 100 nm or less; PM_{0.1}) to human health. Indeed, physical factors such as size and morphology participate in the toxicity of particles by letting them penetrate into the different regions of the respiratory system (Carvalho et al., 2011; Tyler et al., 2016). Depending on its size, PM is deposited in different parts of the respiratory system: PM₁₀ in upper airways, PM_{2.5} in the lower airways including alveoli (Nemmar et al., 2013) and UFP, which can be translocated to interstitial sites in the respiratory tract and in extrapulmonary organs (Kreyling et al., 2009; Oberdörster et al., 2004). The large surface area of UFP enables them to deliver a greater quantity of chemical compounds to the respiratory system for a given mass of PM, playing an important role in their toxicological effects (Abdel-Shafy and Mansour, 2016; Chen and Lippmann, 2009; Tyler et al., 2016). Several studies have demonstrated the role played by PM in the oxidative stress and inflammation response (Donaldson et al., 2002; Leikauf et al., 2020; Li et al., 2003; Nemmar et al., 2013; Schraufnagel, 2020). However, despite their higher number and important reactivity, UFP have been less studied than coarse and FP (Schmid et al., 2009). Total PM emissions include both filterable PM, directly emitted from the source as solid or nonvolatile liquid particles, and condensable PM, initially in the vapor phase after combustion and immediately forming solid or liquid droplets. Both these condensable and filterable PM form UFP (Feng et al., 2018; Kwon et al., 2020). Another characteristic of the UFP are their very short atmospheric lifetimes: their concentrations decrease with increasing distance from the emission sources, hence efficient sampling strategies to collect sufficient PM mass are required (Kumar et al., 2021). An alternative is to conduct experiments with a source providing relevant emissions of UFP that can be easily produced in a reproducible way.

The mini-Combustion Aerosol Standard (mini-CAST) is a reference soot generator in which soot particles, produced from a co-flow propane diffusion flame, are quenched and quickly diluted to stabilize the soot particle stream and prevent water condensation. Many studies have been carried out to analyze the properties of soot particles, demonstrating that soot particle characteristics (such as Organic Carbon (OC) / Total Carbon (TC), morphology, number and size distribution) can be varied depending on the operating conditions, while maintaining a stable and repeatable source (Bescond et al.,

2016; Jing, 1999; Moallemi et al., 2019; Moore et al., 2014). The mini-CAST has been used primarily as a calibration device for soot and to understand soot formation and has been adapted for liquid fuels. Recently, it has been used as a relevant tool in the production of aircraft soot analogues (Marhaba et al., 2019). Thus, the miniCAST soot generator should serve as an adequate device for studying particle toxicity with microphysical and chemical properties representative of real-world emissions.

The toxicity of inhaled airborne particles can be studied by different *in vivo* and *in vitro* techniques. Concerning the *in vitro* approaches, submerged assessments are commonly chosen, where cells are exposed to a particle suspension, but these are not representative of physiological conditions (Loret et al., 2016). Conversely, particle exposure of lung cells grown at the air-liquid interface (ALI) depicts a situation close to physiological conditions and allows estimation of the toxicity of combustion particles (BéruBé et al., 2010; Bhowmick and Gappa-Fahlenkamp, 2016; Paur et al., 2011). Here, cells were cultured on the semi-permeable membranes of a trans-well insert in a culture well where medium was supplied only from the basal pole. Then cells were exposed to an aerosol at the apical pole. Several devices have been developed in order to study this approach, such as the Cultex® System and the Vitrocell® System (Aufderheide and Mohr, 2004, 2000). Despite the advantages provided by these devices, controlled and repeatable cell exposures at relevant airborne concentrations are scarce. However, these devices, associated with the use of novel tissue engineering tools, are attractive tools to extend the knowledge on the cellular effects of UFP. Among these novel cellular tools, normal human bronchial epithelial (NHBE) cells can differentiate into a mucociliary phenotype similar to *in vivo* conditions. Additionally, when cultured at the air-liquid interface, NHBE cells are adapted to direct aerosol exposure, allowing preservation of the physical and chemical characteristics of the aerosol (Bhowmick and Gappa-Fahlenkamp, 2016; Zavala et al., 2020).

Several experimental *in vitro* studies at the ALI have demonstrated the role of oxidative stress and inflammation in FP- and UFP-induced respiratory toxicity (Crobbeddu et al., 2017; Diabaté et al., 2008; Sotty et al., 2019). These effects may be due to the organic composition and polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) contents (Akhtar et al., 2014; Li et al., 2003), although other studies suggest that the relationship between biological response and chemical composition is much more complex (Schwarze et al., 2007). Indeed, in the study of Schwarze et al. (2007), the authors outlined the importance of size and composition, which may lead to different cellular responses. The issue of what characteristics make a particle more biologically reactive than others is pivotal, but needs further investigation and the development of suitable experimental tools.

This work aims to propose an integrated approach suitable for the physical, chemical, and toxicological characterization of FP and UFP. For that, a miniCAST soot generator was used under two different operating conditions (CAST1 and CAST3) generating particles made respectively of low and high OC/TC. First, we examined the microphysical properties of these particles as well as their deposition efficiency using an ALI device. Then, we characterized their chemical properties by a

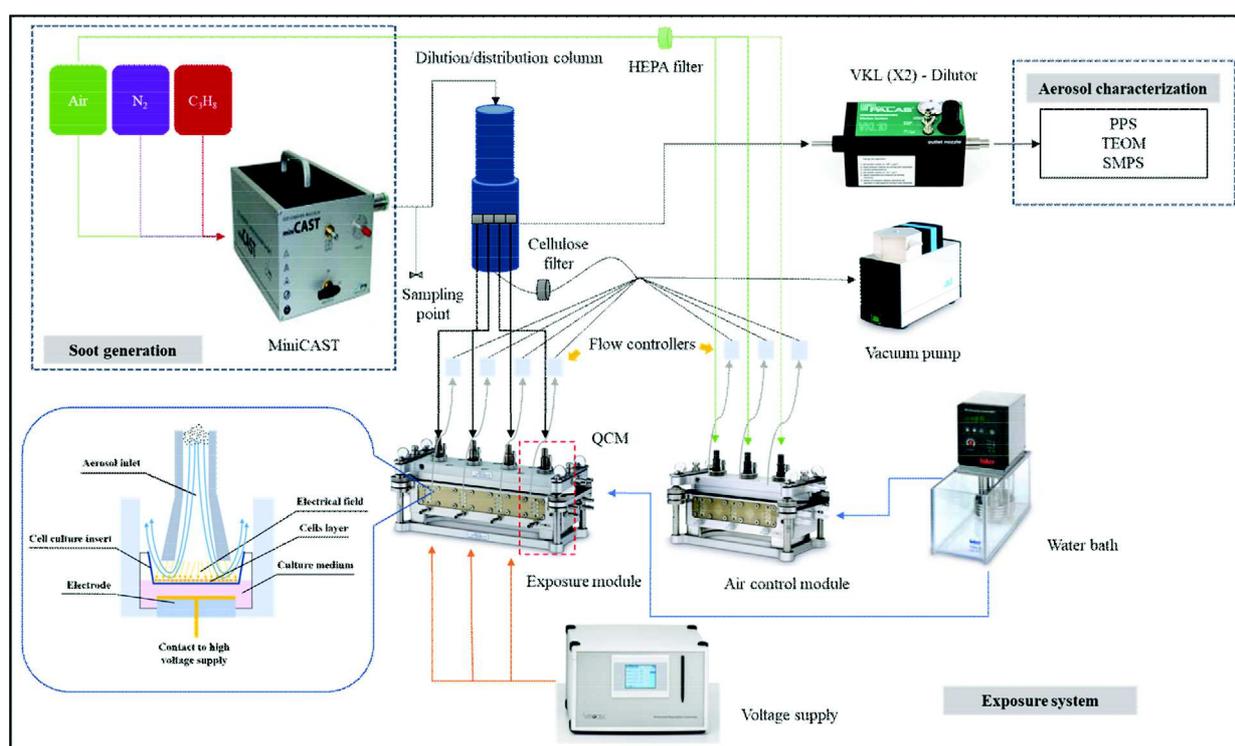


Fig. 1 – Experimental setup.

non-targeted approach using ultra-high resolution mass spectrometry and a direct insertion probe (DIP FTICR-MS), and a targeted approach using GC-MS. Finally, we conducted *in vitro* toxicity assays using the ALI-differentiated model of NHBE.

1. Materials and methods

1.1. Experimental setup

The exposure system is comprised of several main components: soot generator miniCAST (5201c, Jing Ltd., Switzerland), the Vitrocell® exposure system (model VITROCELL® 6/4 CF, Vitrocell® Systems GmbH, Germany), and several devices for the physical characterization and control of aerosol generation, as described below. A schematic of the experimental setup is shown in Fig. 1.

Soot particles were produced with a miniCAST soot generator allowing the production of a stable and repeatable aerosol of soot particles whose size distribution, morphology, chemical composition (organic compound content) and microstructure (arrangement of graphitic planes) are variable, through modification of the propane and air flow rates. Two operating conditions (CAST1 and CAST3) were chosen for their different contents of organic carbon (Bescond et al., 2016). They are defined by four flow rates: propane (mL/min), nitrogen (L/min), oxidation air (L/min) and dilution air (L/min). The flow rates for the operating conditions studied in the present investigation are presented in Table 1. Aerosol from the miniCAST is delivered to the exposure system by the distribution/dilution column.

Table 1 – Flow rates for the operating conditions studied.

| | CAST1 | CAST3 |
|-----------------------|-------|-------|
| Propane (mL/min) | 60 | 60 |
| Nitrogen (mL/min) | 7 | 7 |
| Oxidation air (L/min) | 1.5 | 1 |
| Dilution air (L/min) | 20 | 20 |

The Vitrocell® exposure system comprises two stainless steel modules (exposure module and air control module). Aerosols are delivered to the modules in parallel: the first module receiving the aerosol and the second module receiving filtered clean air as negative control. The modules are designed for simultaneous exposure of three independent replicates. The exposure module is equipped with electrodes for high voltage charging to increase particle deposition, and in addition one well contains a quartz crystal microbalance sensor system (QCM) to determine particle dose by the Vitrocell® software. Since the QCM is not equipped with the electrode, it was not possible to measure particle deposition efficiency when the electrostatic field was used.

Prior to exposure, the exposure wells are filled with medium and heated at 37°C by a circulating water bath. The aerosol distribution to the different wells is ensured by four isokinetic sampling ports. Finally, for each well, exposure is ensured by a designed trumpet pipe, which enables the aerosol to pass over the apical pole of the cell layer (placed on the adaptors for 12-well sized inserts) at a flow rate of 10 mL/(min·well) driven by an external vacuum pump. Cells

were exposed to aerosol for 35 min and control samples were exposed for 35 min to ambient HEPA-filtered laboratory air through the Vitrocell System. An electrostatic field (+1000 V) was applied to increase the rate of particle deposition.

The distribution/dilution column includes a sampling point that is connected to the dilution system (Palas VKL, Palas GmbH, Germany) for complementary analysis, such as the aerosol control concentration with the Pegasor Particle Sensor (PPS) (Mi3, Pegasor, Finland) or distribution size analysis with the Scanning Mobility Particle Size (SMPS-3080, TSI, USA). The total sampling flow rate of the exposure system is 12.3 L/min driven by a vacuum pump at the end of the line (flow rate from Vitrocell® system and VKL dilutors).

1.2. Particle characterization: size, mass, and morphology

The number and particle size distributions were measured with the SMPS in the range of 14.46–679.25 nm immediately downstream of the Vitrocell® system after going through the VKL dilutors. This enabled characterization of the particle number concentration at the time of deposition. The SMPS was operated at a sample flow of 0.3 L/min. SMPS data were corrected for the PALAS VKL dilutors (100). The mass concentration of the aerosol was measured with the Tapered Element Oscillating Microbalance (TEOM) (1105 Rupprecht & Patashnick Co., Inc., USA) and controlled over time with the PPS directly after the VKL dilutors. The soot particles were deposited onto a grid (200-mesh copper grid with a Formvar/carbon film, Agar Scientific) through impaction/interception (Ouf et al., 2010), and then observed by transmission electron microscopy (TEM) with a high-resolution microscope (JEM-2010 model, JEOL, Japan).

1.3. Determination of deposition efficiency

The deposition efficiency is defined here as the percentage of the aerosol mass transported by the aerosol flow exposed to the cells, which deposits on their surface. The deposition mechanisms are complex, and due to the small exposure flow rate (10 mL/min), only a fraction of the particles is deposited. This fraction was determined by combining the deposited mass rate measurement (quartz crystal microbalance QCM (Vitrocell®) integrated in the exposure module) and the mass concentration of the exposed aerosol (TEOM measurement). The increase in deposition efficiency induced by the electrostatic precipitator was evaluated by comparing the size distribution upstream and downstream of the exposure modules with the SMPS, with and without electric field.

1.4. Chemical characterization

Non-targeted analyses. The non-targeted analysis of the two CAST conditions was performed using a direct insertion probe with atmospheric pressure chemical ionization source (DIP APCI) coupled to ultra-high resolution mass spectrometry (FTICR MS) (12T Solarix XR FTICR, Bruker Daltonics, USA). Cellulose filters containing particulate matter were obtained from the miniCAST exhaust next the dilution column after 35 min of cell exposure. Soot particles were scraped from the frozen filters for direct solid analysis. About 0.1 to 0.5 mg of

soot particles was put in the hollow part of a glass capillary, sealed with a piece of quartz fiber filter then inserted in the DIP APCI FTICR MS system for acquisition. The amount of soot particles could not be measured more precisely because of difficulties in handling the capillary on the precision weighing scale. Three analytical replicates were acquired for each condition, in random order to avoid systematic bias from the measurement devices.

External calibration was performed using a polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) mixture (Supelco EPA 610, Sigma Aldrich, France). Generally, errors below 250 ppb were found. After calibration, each individual scan of the time-resolved data was peak-picked (S/N 9) and exported with Bruker Data Analysis (5.0) visual basic scripts. The exported mass spectra were processed by self-written MATLAB routines, and molecular assignment was performed using the following restrictions: $C_cH_nN_nO_o$; $n \leq 1$ and $o \leq 4$, with a maximum error of 2 ppm, $DBE \leq 80$, $0 \leq H/C \text{ ratio} \leq 3$. The molecular formula attribution lists of the six data sets were merged into one list. All attributions were considered, and attributions not found within a sample were set to zero intensity. To ensure that the program and results were reliable, we checked whether the resulting errors calculated from the difference between experimental m/z values and m/z values predicted for the molecular formulas produced the normal distribution expected for random errors. The elemental composition attributions of the average spectra were compared via multivariate data analysis. Principal Component Analyses (PCA) were performed. Data were subjected to power transformation before PCA, to reduce heteroscedasticity and to do pseudo-scaling. The resulting scores and loadings data, combined with the elemental composition attribution, were used for visualization. In this respect, score data are linked to the experiments (replicates and sample type) and loadings data to the individual elemental compositions (molecular profile).

Targeted analyses. Aerosols were sampled on a quartz filter for 1 min in the sampling point after the miniCAST (Fig. 1). After collection, the filters were cut using a punch in order to obtain similar samples of 16 mm² surfaces. The obtained samples were introduced in glass-lined non-deactivated TDU tubes (Gerstel GmbH & Co. KG, Germany).

A PAH mixture (TraceCERT, 2000 µg/mL in benzene/dichloromethane, 1/1, V/V) containing 16 US EPA priority PAH was diluted to 100 µg/mL with toluene and used as the standard stock mixture for PAH. An oxy-PAH mixture ($\geq 98.8\%$, 100 µg/mL in toluene) was prepared with 9-fluorenone (9-Fluo-one), Benzo(a)fluorenone (B(a)Fluo-one), 6H-benzo(c,d)pyren-6-one (B-Pyr-one), 1,4-naphtoquinone (1,4 NaphtQ) and 9,10-anthraquinone (9,10 QanthQ). Perylene-D12 and Phenanthrene-D10 were used as internal standards. All solvents used were of HPLC grade. Standard addition was used for quantification in order to prevent matrix bias. The three levels of addition ranged from 0.5 to 5 ng (3 replicates per level). The analyses were performed by using a gas chromatograph (7890-B, Agilent Technologies, USA) coupled to a triple quadrupole mass spectrometer (MS/MS) (7000 C, Agilent Technologies, USA). This chromatograph was equipped with an external desorption unit (TDU 2, Gerstel GmbH & Co. KG, Germany) and a programmed temperature vaporization (PTV) inlet (CIS 4, cool injection system, Gertel). The temperature for

thermal desorption was initially set at 30°C, then increased at 20°C/min to 350°C (held for 10 min) with helium desorption flow at 96 mL/min by using solvent vent mode. Desorbed compounds were focused at 10°C onto a quartz wool in the glass liner (1 mm i.d.) in the cooled injection system (CIS) before their analysis by GC-MS/MS. After thermodesorption, the CIS 4 unit was programmed from 10°C (held for 0.15 min) to 350°C (held for 5 min) at 720°C/min for injecting trapped compounds in splitless mode into the GC column (column DB5-5MS, 60 m × 0.25 mm i.d. × 0.10 μm, Agilent). The GC oven was programmed at 60°C for 1.2 min, increased at 40°C to 190°C, then increased at 4°C/min to 240°C and finally at 6°C/min to 305°C (held 8.5 min). Helium was used as the carrier gas at 1.4 mL/min in constant flow mode. The temperature of the transfer line between the GC and MS spectrometer was set at 310°C. MS/MS analyses were performed in Multiple Reaction Monitoring (MRM) mode. Helium was used as the quenching gas. Its flow was set at 2.25 mL/min. Nitrogen collision gas was supplied at 1.5 mL/min. Electron ionization (EI) was used for detection (70 eV, ionizing current: 35 μA). The ion source temperature was 230°C and the temperature of quadrupoles 1 and 2 was 150°C. The resolutions of MS1 and MS2 were unit and wide, respectively. One precursor ion and two product ions (1 quantifier and 1 qualifier) were selected for each analyzed compound. Nine time segments were used to perform MS/MS analyses. These segments included 1 to 5 ions within a narrow range of retention times. Collision energies were optimized for each of the 23 analyzed compounds (21 analytes plus 2 internal standards) to maximize the signal abundance of the product ions in the analysis of standard compounds. Dwell times were also optimized for each analyzed compound.

1.5. NHBE cells cultures and exposures

Primary Normal Human Bronchial Epithelial (NHBE) cells (ATCC-PCS-300-010TM, USA) were obtained from biopsies isolated from a healthy donor. NHBE cells were maintained until confluence (75%–80%) in 75 cm² plastic flasks (BD Falcon®, Corning, USA) in Airway Epithelial Cell Basal Medium (ATCC, USA) complemented with a Bronchial/Tracheal Epithelial Cell Growth Kit (ATCC, USA) supplemented with Penicillin (10 Units/mL; GIBCO USA) and Streptomycin (10 μg/mL; GIBCO, USA). Then, cells were seeded at a density of approximately 80,000 cells per cm² on collagen-coated 12 mm Transwell®, 0.4 μm Pore Polyester Membrane Inserts (Costar®, STEMCELL Technologies Inc., France). Once cells had reached confluence (3 days) ALI conditions were established by removing the apical medium and replacing the basal medium by PneumaCultTM-ALI Basal medium (STEMCELL Technologies Inc., France) complemented with Pneuma-CultTM-ALI 1X Supplement (STEMCELL Technologies Inc., France), PneumaCultTM-ALI 1X Maintenance Supplement (STEMCELL Technologies Inc., France) and hydrocortisone (2 μmol/L) (STEMCELL Technologies Inc., France). In order to determine the culture conditions to allow progressive differentiation into ciliated, goblet and basal cell types within a pseudo-stratified epithelium, NHBE cells were grown until 0, 7, 14 or 21 days at ALI before gene expression of differentiation markers was performed.

Air-liquid interfaces were maintained for 14 days (prior to exposure). Mucus production was removed with a gentle saline rinse (PBS-1X, GIBCO, USA) 1 day prior to exposure. Cells were maintained in 95% humidified air with 5% CO₂ at 37°C. During exposures cells were placed in the Vitrocell® system and exposed on-line to fresh particles (CAST1 and CAST3) for a duration of 35 min (minimum *n* = 3 per treatment group). Control cells were exposed to the same conditions described above but to filtered air. We compared the response of particle-exposed cells with the response of control cells, 3 hr after exposure.

1.6. NHBE microscopy observations

NHBE cells were directly fixed on the Transwell®, 0.4 μm Pore Polyester Membrane Inserts in 2.5% Glutaraldehyde (EMS, USA) in 0.2 mol/L Hepes buffer pH 7.4 (VWR, USA). After several rinses in buffer, membrane inserts were removed from their support and cut in small pieces. Samples were post-fixed in 1% Osmium tetroxide (EMS, USA) for 1 hr at +4°C and rapidly rinsed again. Cells were then dehydrated using a graded series of ethanol and acetone before being impregnated with Epoxy Low Viscosity Resin (EMS, USA) under vacuum. The resin was polymerized at 60°C between 48 and 72 hr. For optical microscopy, 800 nm-thin sections were prepared by ultramicrotomy (Ultracut-UCT, Leica-microsystems, Germany) and stained with toluidine Blue (EMS, USA), a metachromatic dye. Observations were performed on an upright light microscope (DM6B, Leica-microsystems, Germany) and images acquired with a sCMOS camera (DFC9000, Leica-microsystems, Germany).

For transmission electron microscopy (TEM), ultrathin sections (50–70 nm, Ultracut-UCT Leica-microsystems, Germany) were collected on gold 600 mesh grids and stained 7 min with 0.5% uranyl acetate in methanol solution. Conventional TEM observations were performed on JEM 2010 operating at 120 kV and equipped with a LaB6 cathode, a SDD-detector (Oxford Instruments, UK), a CDD camera (Erlangshen 500 Gatan, USA) driven by Digital Micrograph software (Gatan-Ametek, USA). High-Resolution images were acquired on JEM-ARM200F HRTEM (JEOL Ltd., Japan) that was double-corrected, configured for analysis purposes, and equipped with an ultrascan camera (US1000, Gatan, USA) and ultrafast camera (Gatan-Ametek, USA).

1.7. Cytotoxicity and gene expression

Cytotoxicity was measured by the MTT assay 3 hr after exposure. Inserts were gently rinsed with PBS-1X. Briefly, 0.05 mL of MTT solution (50 μg/mL, Sigma Aldrich, France) in 0.5 mL of medium was added to the lower chamber (basal) for 3 hr. Then 0.5 mL of SDS (10% in 0.1 mol/L HCl) were added to the lower and upper chambers and incubated during the night to dissolve the purple crystals. The extracted solution was transferred to 96-well plates, and absorbance was measured at 570 nm using the SAFAS (Xenius, Safas, Monaco). The absorbance of the samples was normalized to the control, which was set to 100%.

For the study of gene expressions, total RNA was extracted from cells using TRI-REAGENT® (Sigma-Aldrich, France) and

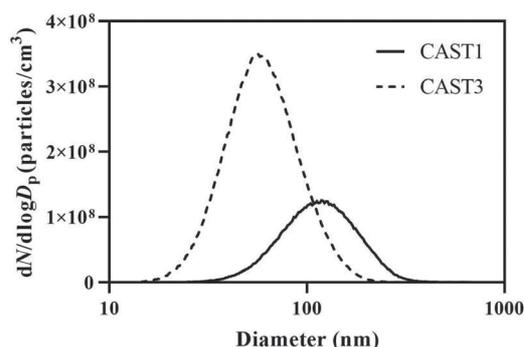


Fig. 2 – Particle size distribution for each operating condition (corrected for VKL dilution).

Direct-zol™ RNA MiniPrep (Ozyme, France). RNA concentration and purity were measured with a NanoDrop spectrophotometer (NanoDrop™ 2000 / 2000c, Thermo Fisher Scientific Inc., USA). All the RNA integrity numbers of the samples were > 8. cDNA was prepared by reverse transcribing extracted RNA samples using Invitrogen™ Transcriptase inverse M-MLV (Invitrogen, USA). The expression of mRNA was determined by the quantitative real time polymerase chain reaction (qRT-PCR) using Brilliant III Ultra-fast SYBR Green QPCR Master Mix (Agilent Technologies, USA) and Stratagene Mx3005P (Agilent Technologies, USA). Expression profiles were normalized to the housekeeping gene B2M. Only the results of qRT-PCR comprising between 80%–110% efficiency were considered. Results for differentiation genes are expressed as absolute quantification $\Delta Ct = Ct_{(target\ gene)} - Ct_{(housekeeping\ gene)}$, while oxidative and inflammatory genes are expressed as absolute quantification $\Delta Ct = Ct_{(target\ gene)} - Ct_{(housekeeping\ gene)}$ and oxidative and inflammatory genes are expressed as relative expression (fold change) using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method (Livak and Schmittgen, 2001). All primer sequences used in this work are shown in Appendix A Table S1.

1.8. Statistical analysis

Results were expressed as mean ± standard deviation (SD). Statistical analysis of gene expression was performed using the non-parametric Mann-Whitney U test (GraphPad for Windows, v8.0). Statistically significant differences were reported with $p < 0.05$.

2. Results

2.1. Particle characterization: size, mass, and morphology

The particle size distribution within the aerosol can be seen in Fig. 2. The geometric median (GM) mobility diameter, particle number, and mass concentration for each different operating condition are shown in Table 2. Particle emission depends on the operating conditions. CAST3 produced a smaller size distribution compared to CAST1. The mass concentration for CAST1 condition is higher (89.4 mg/m³) compared with CAST3 (57.9 mg/m³).

Table 2 – Geometric median (GM) mobility diameter, Count and Mass Concentration for each operating condition of the miniCAST.

| Operating condition | CAST1 | CAST3 |
|--|------------|-------------|
| GM (nm) | 114 ± 1.54 | 58.9 ± 1.53 |
| Count concentration (N/cm ³) | 6.12E+07 | 1.63E+08 |
| Mass concentration (mg/m ³) | 89.4 | 57.9 |

Table 3 – Mass deposition during exposures.

| Operating condition | CAST1 | CAST3 |
|--|-------|--------|
| Deposition efficiency (%) | 0.29 | 1.3 |
| Increase factor (+ 1000 V) | 7.42 | 7.7 |
| Mass deposition (ng/cm ²) in 35 min (0 V) | 79.8 | 230.4 |
| Mass deposition (ng/cm ²) in 35 min (+ 1000 V) | 591.8 | 1775.0 |

Concerning the particle morphology, the two operating conditions produced fractal aggregates, which is typical of soot particles. Fig. 3 confirms that CAST3 produces smaller particles than CAST1. Nevertheless, the primary spheres were not very different. Indeed, according to Bescond et al. (2016), the primary sphere diameter is 26.6 nm for CAST1 and 29.9 nm for CAST3.

2.2. Particle mass deposition efficiency

Mass deposition during exposures with or without electrostatic field is shown in Table 3. A better deposition efficiency was observed with the CAST3 compared to the CAST1 operating condition. This discrepancy is probably due to a morphological difference between the two categories of particles, as observed in Fig. 3, using transmission electronic microscopy. The deposition efficiency was low, whatever the experimental CAST conditions (0.29% to 1.3%) but was increased with an electrostatic field (5.5 to 7.7-fold), allowing it to reach 1.78 µg·cm² in a 35 min exposure.

2.3. Non-targeted analyses

The two conditions CAST1 and CAST3 were compared using DIP APCI FTICR MS. One list of 1600 molecular formulas was obtained for all conditions and replicates. Fig. 4 illustrates the score plot for the two principal components (PC1 and PC2), which explained 99% of the total variance. PC1 explained 98% of the variation of the sample. The analytical replicates were more similar to each other for the CAST3 conditions and showed more spread for the CAST1 conditions.

DBE vs C plots are often used for the analysis of complex samples as they can give information on the molecular structures in the sample, focusing on certain molecular classes (Marshall and Rodgers, 2008). These plots include information on the relative intensity of the observed ion, with the dot size and color coding matched to the PC loadings: red indicates a positive PC coefficient, linked to CAST1 conditions, while

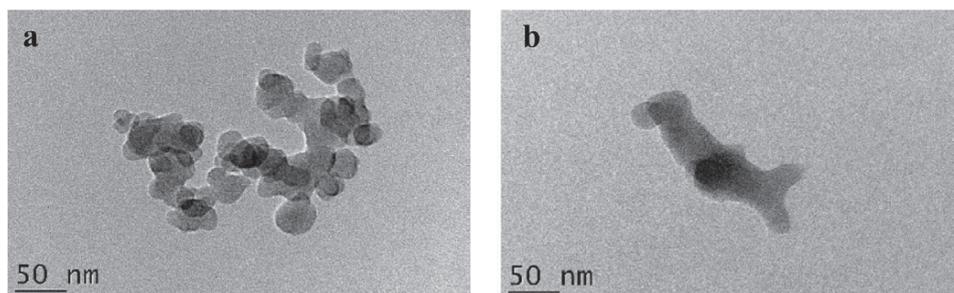


Fig. 3 – Transmission electron microscopy images of particles generated at the two different operating conditions of the miniCAST (a: CAST1, b: CAST3).

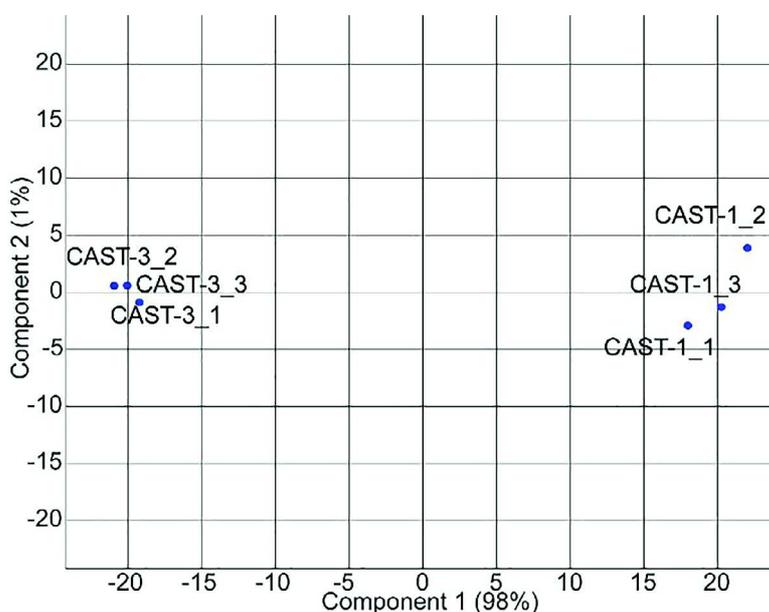


Fig. 4 – Score plot from PCA visualizing the first two components (99% of variance).

green is related to a negative PC coefficient more often found in CAST3 conditions.

Here, the ions from hydrocarbon compounds clearly showed two distinct families. Ions of high intensity were observed with DBE values between 5 and 25 and between 10 and 35 carbon atoms that share the characteristics of PAH, whose DBE and carbon number roughly follow the red PAH line represented in Fig. 5. CAST1 produced more compounds with a low number of carbons (below 15), that correspond to small PAH molecules. Conversely, CAST3 showed hydrocarbons with higher numbers of carbon atoms corresponding to larger PAH molecules. Many other low-intensity compounds with DBE values below 5 were observed with similar intensity in CAST1 and CAST3, as shown in the light orange PC1 coefficient color indicative of very small PC loadings.

From the raw molecular formulas, a putative structure was determined for each compound with the highest and lowest PC loadings (negative for CAST1 and positive for CAST3). These compounds are found in Appendix A Tables S2 and S3. Low-mass PAH molecules with the lowest PC1 coefficients most likely corresponded to naphthalene, acenaphthy-

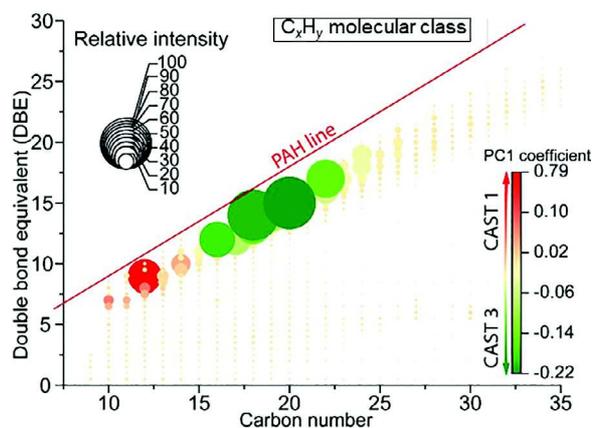


Fig. 5 – Double-bond equivalent (DBE) vs carbon number plot of ions with molecular formulas containing only carbon and hydrogen (HC class). The dot size is indicative of the relative intensity of the ions and the colormap points to the PC1 loadings.

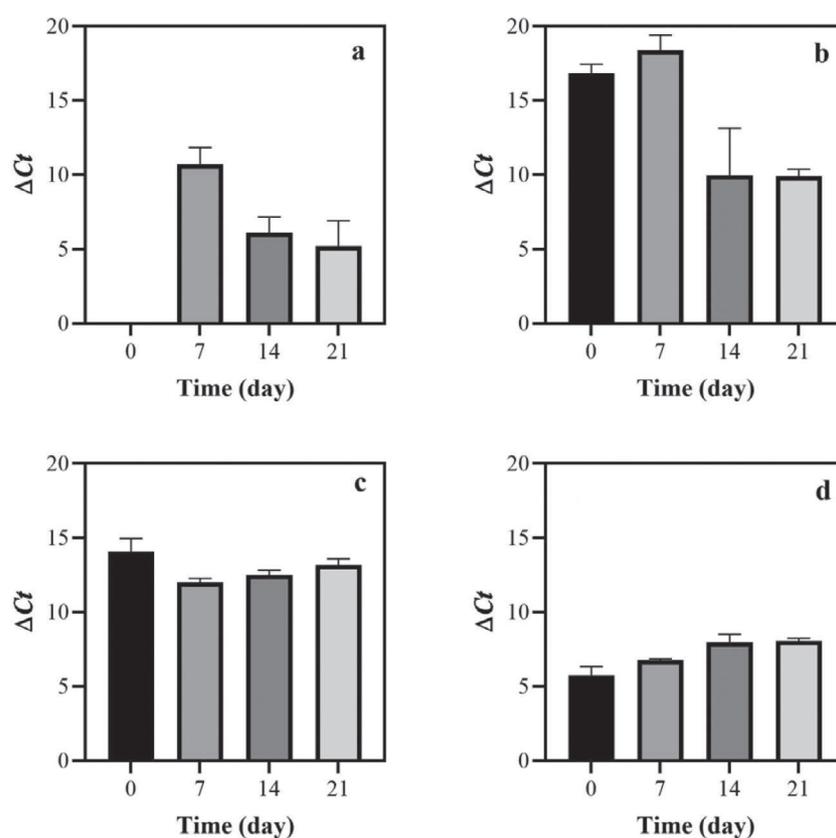


Fig. 6 – mRNA expression of differentiation and tight junction markers. Primary cells were cultured at the ALI over 21 days. RNA was extracted at days 0, 7, 14 and 21 during ALI differentiation. Expression of (a) MUC5AC, (b) FOX-J1, (c) OCLN and (d) ZO1. Results are expressed as mean \pm standard deviation (SD) of 2–3 independent experiments.

lene, acenaphthene and anthracene (Appendix A Table S2). Higher mass PAH molecules with high PC loadings could correspond to pyrene, benzo(a)fluorene, benzo[ghi]fluoranthene and benzo[ghi]perylene (Appendix A Table S3).

2.4. Targeted analyses

The quantitative analysis tested for the 16 priority PAH and 5 oxy PAH (Appendix A Fig. S1). For CAST1, the low-mass PAH (2–3 aromatic rings) represented 70% of the total deposit. Acenaphthylene, fluorene and phenanthrene showed amounts higher than 10 ng/cm². The other 30% were mainly represented by fluoranthene and pyrene. The total amount ranged from 200 to 400 ng/cm² depending on the sampling localization. For CAST3, the PAH repartition covered a larger range of aromatic cycle numbers: from 10% to 15% for low-mass PAH (2–3 aromatic rings), 40%–50% for the 4-aromatic ring PAH and 35%–40% for the heavy-mass PAH (5–6 aromatic rings). For CAST3, fluoranthene and pyrene presented amounts higher than 10 ng/cm². Benzo[ghi]perylene was also found at this amount. The total PAH mass ranged from 400 to 700 ng/cm². These results are consistent with non-targeted analyses and confirm the presence of the suggested molecules. The total amount of PAH is also consistent with the mass deposition determined: 591.8 ng/cm² for CAST1 and 1775 ng/cm² for CAST3. Moreover, the oxy-PAH amounts represented 3% for CAST1

with mainly 9-fluorenone and 9% for CAST3 with compounds like benzo(a)fluoranthene and benzopyrenone.

2.5. Optimization of cell culture conditions

Figure 6 shows the gene expression of four differentiation markers on NHBE cultured at the ALI for 0, 7, 14 and 21 days. Data are expressed as Δ Ct. The lower the Δ Ct the more the expression of this gene was induced. Results showed the highest expression of the MUC5AC gene, which is a marker of goblet cells, at 14 and 21 days in ALI (Fig. 6a). Expression of FOX-J1 (Fig. 6b), a transcription factor that controls expression of ciliary genes, was present from 0 days to 21 days at ALI. Expression of FOX-J1 remained at the same level at 14 and 21 days at ALI. Expression of MUC5AC and FOX-J1 at 14 and 21 days means the reconstitution of a pseudostratified epithelium. Regarding membrane integrity, two junction markers were studied by quantifying the expression of OCLN and ZO1 (tight junctions). Constant expression of OCLN (Fig. 6c) and ZO1 (Fig. 6d) was observed in all the conditions. NHBE differentiation was confirmed by microscopic observation. Fig. 7a and b shows a cross-section of differentiated NHBE cells at 14 days under metachromatic toluidine blue coloration. Goblet cells appear light purple, basal and ciliated cells are blue-stained. Fig. 7c-f shows the subcellular characterization of NHBE cells: basal cells with long cytoplasmic extensions (white arrowhead) (Fig. 7c), goblet cells rich in mucus granules accumu-

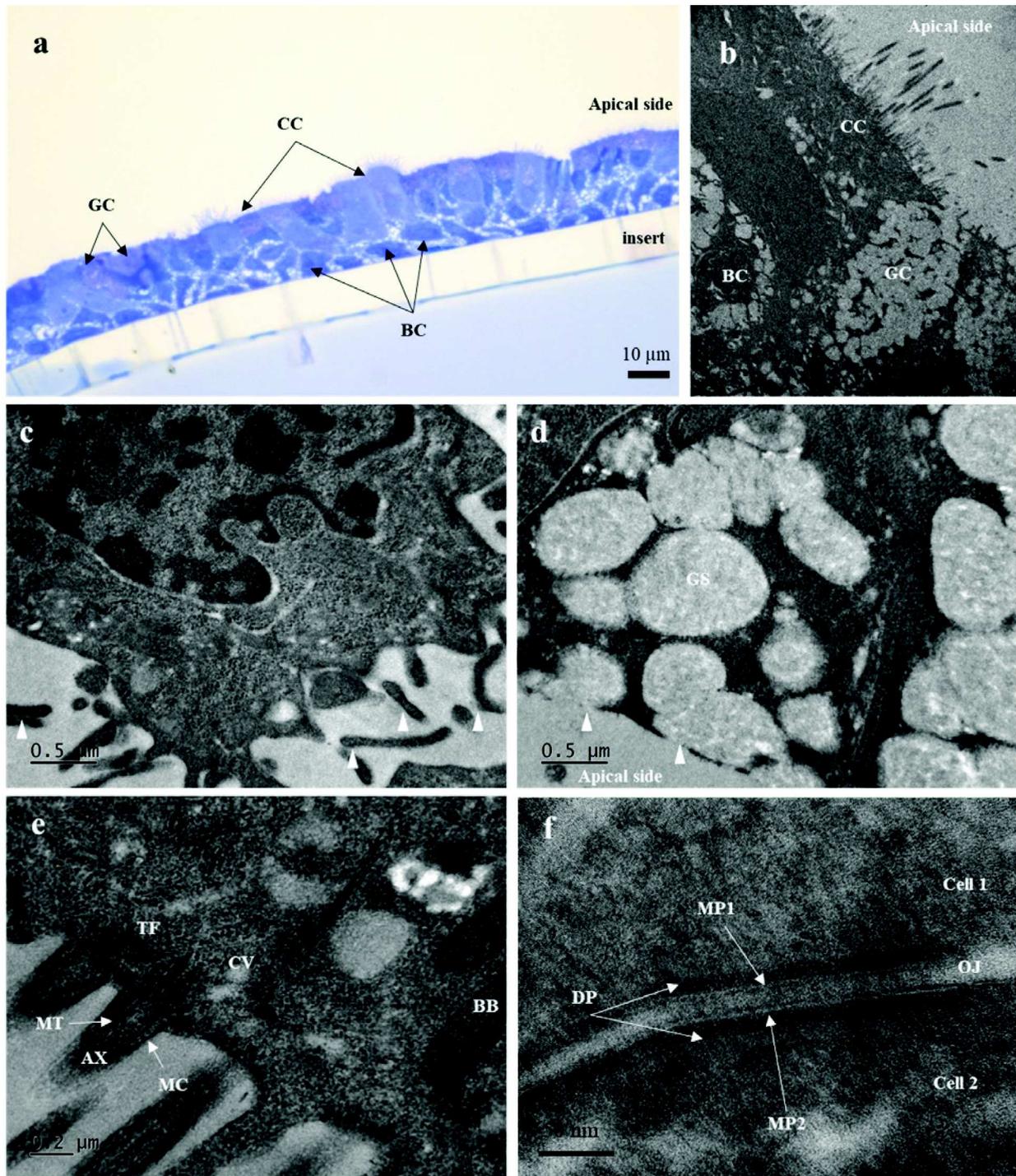


Fig. 7 – Cellular structure and subcellular characterization of NHBE cells after 14 days of differentiation. (a) Optical microscopy of NHBE14-d. stained with metachromatic Toluidine blue. **(b)** Bright-field Transmission Electron Microscopy of NHBE, large field of view. **(c)** Basal cells with long cytoplasmic extensions (White arrowheads). **(d)** Goblet cells rich in mucus granules. Granules accumulate at the apical side of the cells to release their polysaccharide content in the extracellular space (White arrowheads). **(e)** Ciliated cells are well-differentiated as seen by the presence of mature motile cilia. **(f)** High-resolution TEM micrography of occludens junctions. Legend: GC: Goblet Cells; CC: Ciliated cells; BC: Basal cell; GS: Secretory granules in goblet cells; BB: Basal body; AX: Axoneme; TF: Transition fiber; CV: Centriolar Vesicles; DP: Dense Plate; MP1: Plasma membrane cell 1; MP2: Plasma membrane cell 2.

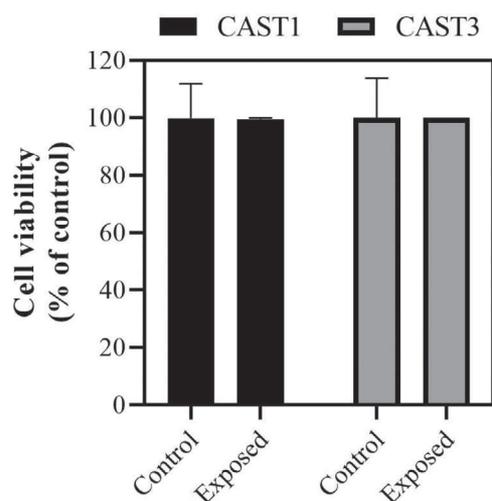


Fig. 8 – Cell viability determined by MTT test 3 hr after exposure to CAST1 and CAST3 (+1000 V) aerosol. The data are expressed as mean \pm SD of 3–4 independent experiments.

lated at the apical side of the cells to release their polysaccharide content in the extracellular space (white arrowhead) (Fig. 7d), ciliated cells well-differentiated as seen by the presence of mature motile cilia. The micrograph shows basal bodies (BB), which constitute the intracytoplasmic part of the cilia and axoneme (AX) the external part, composed of membrane cilia and microtubules organized as $9 + 2$ pairs. Close to the plasma membrane, transition fiber (TF) is visible as a dense round structure. Residual centriolar vesicles (CV) are observed (Fig. 7e). Moreover, differentiated epithelium is characterized by several intercellular junctions located at the apical part of the lateral side (Fig. 7f). From these findings, which confirm the reconstitution of a pseudostratified phenotype, cell exposures were performed on differentiated NHBE cells at 14 days.

2.6. Cellular response

Then, differentiated NHBE at 14 days were exposed in the ALI system to CAST1 or CAST3 particles or filtered air (controls) with an electrostatic field. No cytotoxicity was observed under any of these conditions. Results are shown in Fig. 8.

Oxidative stress and inflammation markers (NQO1 and *IL-8*) genes were measured in NHBE cells after exposure to CAST1 and CAST3 particles or filtered air. Results are shown in Fig. 9. No significant difference was observed in exposure to CAST1 particles. Nevertheless, expression of *IL-8* (2.02-fold) and *NQO1* (1.33-fold) was significantly modified 3 hr after exposure to CAST3 particles.

3. Discussion

The present results illustrate a methodological approach which allows comparing, in an original and innovative way, the physical, chemical, and toxicological properties of different fine and ultrafine particles, using a mini-CAST generator.

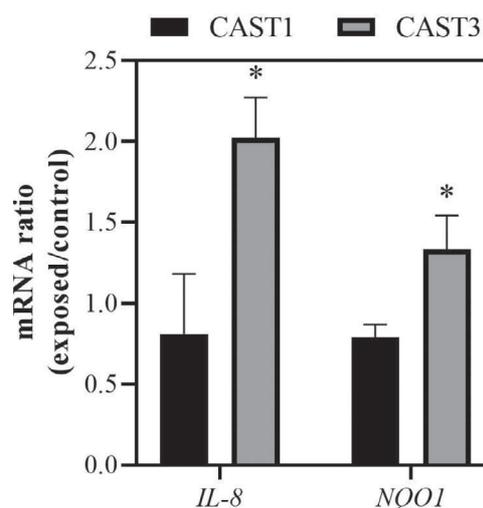


Fig. 9 – Gene expression in NHBE cells exposed to particles. Cells were exposed to CAST1 and CAST3 particles (+1000 V) for 35 min and incubated with particles for 3 hr. Results are expressed as mean \pm SD of 3–4 independent experiments. * Statistically significant differences are reported with $p < 0.05$.

In this study, we used two different operating conditions to obtain model particles containing either high (CAST3) or low (CAST1) organic contents, and exposed differentiated NHBE cells “on-line” at the air-liquid interface to be closer to realistic conditions.

Varying the oxidation airflow in the mini-CAST generates different operating conditions, allowing emission of particles with different physicochemical properties (Moallemi et al., 2019; Moore et al., 2014). For the studied operating conditions in this work, we found that the median particle size decreases ($114.04 \text{ nm} > 58.9 \text{ nm}$) and the number concentration increases ($6.12 \times 10^7 \text{ \#/cm}^3 > 1.63 \times 10^8 \text{ \#/cm}^3$) with decreasing oxidation airflow (CAST1 $>$ CAST3). This is in accordance with previous studies by Bouvier et al. (2019). Bescond et al. (2016) demonstrated that CAST1 contains a relatively low amount of organic compounds (OC/TC: $4.1\% \pm 3.5\%$), whereas CAST3 represents UFP with a high content of organic (OC/TC: $87\% \pm 5\%$) compounds (Bescond et al., 2016; Bouvier et al., 2019).

We then extend these observations by a careful chemical characterization with combined analytical approaches using DIP FTICR-MS and GC-MS with a focus on PAH, a family of ubiquitous pollutants, which raises concern about their health effects (Marris et al., 2020). The non-targeted approach identified the detailed elemental compositions and class distributions of the compounds. The data showed similar PAH profiles for CAST1 and CAST3, with a predominance of small PAH molecules for the CAST1 contrary to CAST3 particles, which presented higher numbers of carbon atoms corresponding to larger PAH molecules. These results were consistent with the data from the targeted analysis by GC-MS, which confirmed the presence of high levels of PAH for CAST3, as fluoranthene, pyrene, b(a)pyrene, b(ghi)perylene, whereas lower molecular weight PAH such as acenaphthylene, fluorene or phenan-

threne were found in CAST1. Previous studies showed that vehicle combustion represents an important source of PAH, at levels ranging between 4.5 to 11.3 mg PAH/m³ (Lee et al., 1995) with a predominance of 2- or 3-ring PAH from diesel engines (Ravindra et al., 2008). Overall, it can be concluded that CAST1 and CAST3 particles present the properties of engine particles, in agreement with previous studies (Bescond et al., 2016; Moore et al., 2014).

The operating conditions of the mini-CAST were also found to affect the mass concentration (89.4 mg/m³ vs. 57.9 mg/m³, CAST1 vs. CAST3) and the deposition efficiency in the exposure chambers. We found a deposition efficiency of 0.29% for CAST1 and 1.3% for CAST3. These results suggest that deposition efficiency, and in general particle behavior, is not dependent on mass concentration, but rather is related to the chemical composition or physical characteristics such as the size of the aggregates' primary spheres. This observation highlights the influence of the physicochemical properties in the deposition of particles, which may be lost during the preparation of the particulate suspensions or organic extracts used in classical submerged cell cultures (Kaur et al., 2019). However, one potential limitation of the reduced deposition efficiency reported in this study is that it was insufficient to produce an observable cellular response. Hence, to obtain an adequate dose exposure able to induce a cellular response, an electrostatic field (+1000 V) was induced in the upper side of the exposure chamber to increase the deposition efficiency. The increase factor of the deposition efficiency was determined by measuring the size distribution upstream and downstream of the exposure chambers with the Scanning Mobility Particle Sizer (SMPS). Using an electrostatic field can increase the deposition efficiency from 5.5 to 7.7-fold, allowing it to reach 1.78 µg/cm² in a 35-min exposure. EF represents an attractive alternative allowing short-term exposure studies preserving cell viability or other biological markers (Bruijne et al., 2009; Frijns et al., 2017; Mühlhopt et al., 2016; Ning et al., 2008; Sillanpää et al., 2008; Zavala et al., 2014).

Determination of the deposition dose in “real exposure conditions” is difficult. For example, using the Multiple-path particle dosimetry model (MPPD) (Applied Research Associates Inc., Raleigh, NC), Manojkumar et al. (2019), estimated that 24 hr exposure to real PM₁ concentrations resulted in PM deposition in the tracheobronchial region of 0.10–0.13 ng/cm². A similar study by Gualtieri et al. (2018) estimated, with the same *in silico* model, a PM deposition of 0.015–0.025 ng/cm². Hence, real dose exposures are variable, as several factors can interfere (gender, age, diseases, atmospheric conditions, aerosol characteristics). In any case, even if our dose exposure represents an exposure to important concentrations of PM, it was lower compared to the majority of UFP studies using PM suspensions (Leclercq et al., 2018; Sotty et al., 2019).

Primary Normal Human Bronchial Epithelial (NHBE) cells were used in this study because FP and UFP particles can reach lower airways. The gene expression of differentiation markers and microscopy showed that, after 14 days at the ALI, NHBE cells form a pseudostratified epithelial phenotype composed of ciliated, goblet and basal cells as has already been shown (BéruBé et al., 2010; Bhowmick and Gappa-Fahlenkamp, 2016; Rayner et al., 2019; Stewart et al., 2012). Most studies concern-

ing FP and UFP are performed in submerged conditions. This approach allows one to work “faster”, with higher exposure doses and with different kinds of particles, but it has many limitations such as changes in particle properties and difficulty in determining the correct delivery dose (Schmid and Cassee, 2017) and, above all, it is not representative of the conditions in the lung. Alternatively, in ALI exposure, aerosol is distributed directly on the cell cultures preserving the intrinsic properties of particles, and it is more representative of physiological conditions (Mühlhopt et al., 2016). Therefore, differentiated NHBE at the ALI depict a situation close to physiological conditions and allow estimation of the toxicity of combustion particles in the lower airways. With these experimental conditions, we demonstrated that only NHBE cells exposed to CAST3 particles induced an upregulation of gene expression of *IL-8*, an inflammation marker and *NQO1*, an enzyme that exerts cytoprotective, antioxidant and anti-inflammatory effects in lungs (Li et al., 2004; Rubio et al., 2011, 2010). No significant difference was observed after exposure to CAST1 exhaust. This apparent discrepancy could be explained by the difference in mass deposition between these two conditions, although the levels remained close to those observed in the literature with nebulized diesel particles and the induction of *IL-8* expression (Hawley et al., 2014b). It is likely that the differences in organic composition between the two operating conditions played an important role in these biological effects (Billet et al., 2007; Borgie et al., 2015; Dergham et al., 2012). It is worth mentioning that no cytotoxic effect was observed in our experimental conditions. This is in agreement with the study of Hawley et al. (2014a) where differentiated NHBE (21 days) were exposed to petro- or alternative biodiesel exhaust treated with or without a diesel particulate filter. Despite the lowered dose exposure of exhaust emissions (2–340 ng/cm²), significant increases in transcripts associated with oxidative stress and PAH response were observed in all exposure groups (Hawley et al., 2014a). This response suggests that the lack of cytotoxicity at low exposure dose could be associated with a highly developed muco-ciliary phenotype for the NHBE, as previously demonstrated (BéruBé et al., 2010; Bhowmick and Gappa-Fahlenkamp, 2016; Rayner et al., 2019). It would be interesting to evaluate these responses on other cellular models such as the human bronchial epithelial cell line Beas-2B, which is the most commonly used cell line for respiratory toxicological studies with possible use at the ALI, as previously described (Stewart et al., 2012; Gualtieri et al., 2018).

4. Conclusions

In conclusion, this study presents a new methodological approach to study freshly emitted FP and UFP on differentiated bronchial cells with respect to their physicochemical properties. It outlines the necessity of a thorough characterization to control dose delivery, which depends on the physical and chemical characteristics of particles. Although further testing and optimization are still required, this approach offers new perspectives to study FP and UFP having properties similar to those emitted by real-world sources and to determine which characteristics are involved in the biological responses.

In further study, the present methodological approach could be used with other cell models, such as pathological models, to offer new insights into the cell mechanism aggravated by FP and UFPs. It would be also interesting to study repeated exposure to lower doses.

Acknowledgments

This work was supported by ANSES (French Agency for Food, Environmental and Occupational Health and Safety; PUFbio project, Grant number EST-2017-190) and co-supported by the Regional Council of Normandy and the European Union in the framework of the ERDF-ESF (CellSTEM project). Ana Teresa Juarez Facio received a PhD fellowship funded by ADEME (Agency for Ecological Transition). The authors would like to thank Cathy Logie, Violaine Martin de Lagarde and Marion Janona for their technical support.

The COBRA laboratory is financed by the Labex SynOrg (ANR-11-LABX-0029) and the European Regional Development Fund (ERDF HN0001343). Financial support from the National Fourier transform ion cyclotron resonance network (FR 3624 CNRS) and the European Union's Horizon 2020 Research Infrastructures program (grant agreement 731077), are gratefully acknowledged.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at doi:10.1016/j.jes.2021.06.001.

REFERENCES

- Abdel-Shafy, H.I., Mansour, M.S.M., 2016. A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: source, environmental impact, effect on human health and remediation. *Egypt. J. Pet.* 25, 107–123.
- Akhtar, U.S., Rastogi, N., McWhinney, R.D., Urch, B., Chow, C.W., Evans, G.J., et al., 2014. The combined effects of physicochemical properties of size-fractionated ambient particulate matter on in vitro toxicity in human A549 lung epithelial cells. *Toxicol. Rep.* 1, 145–156.
- Aufderheide, M., Mohr, U., 2004. A modified CULTEX® system for the direct exposure of bacteria to inhalable substances. *Exp. Toxicol. Pathol.* 55, 451–454.
- Aufderheide, M., Mohr, U., 2000. CULTEX—an alternative technique for cultivation and exposure of cells of the respiratory tract to airborne pollutants at the air/liquid interface. *Exp. Toxicol. Pathol.* 52, 265–270.
- BéruBé, K., Prytherch, Z., Job, C., Hughes, T., 2010. Human primary bronchial lung cell constructs: the new respiratory models. *Toxicology, Highlights of the 2010 Annual Congress of The British Toxicology Society. Includes the Abstracts of The British Toxicology Society. Spring 2010* 278, 311–318.
- Bescond, A., Yon, J., Ouf, F.X., Rozé, C., Coppalle, A., Parent, P., et al., 2016. Soot optical properties determined by analyzing extinction spectra in the visible near-UV: toward an optical speciation according to constituents and structure. *J. Aerosol Sci.* 101, 118–132. doi:10.1016/j.jaerosci.2016.08.001.
- Bhowmick, R., Gappa-Fahlenkamp, H., 2016. Cells and culture systems used to model the small airway epithelium. *Lung* 194, 419–428.
- Billet, S., Garçon, G., Dagher, Z., Verdin, A., Ledoux, F., Cazier, F., et al., 2007. Ambient particulate matter (PM_{2.5}): physicochemical characterization and metabolic activation of the organic fraction in human lung epithelial cells (A549). *Environ. Res.* 105, 212–223.
- Borgie, M., Dagher, Z., Ledoux, F., Verdin, A., Cazier, F., Martin, P., et al., 2015. Comparison between ultrafine and fine particulate matter collected in Lebanon: chemical characterization, in vitro cytotoxic effects and metabolizing enzymes gene expression in human bronchial epithelial cells. *Environ. Pollut.* 205, 250–260.
- Bouvier, M., Yon, J., Lefevre, G., Grisch, F., 2019. A novel approach for in-situ soot size distribution measurement based on spectrally resolved light scattering. *J. Quant. Spectrosc. Radiat. Transf.* 225, 58–68.
- Brook, R.D., Rajagopalan, S., Pope, C.A., Brook, J.R., Bhatnagar, A., Diez-Roux, A.V., et al., 2010. Particulate matter air pollution and cardiovascular disease: an update to the scientific statement from the American Heart Association. *Circulation* 121, 2331–2378.
- Bruijne, K.de, Ebersviller, S., Sexton, K.G., Lake, S., Leith, D., Goodman, R., et al., 2009. Design and testing of Electrostatic Aerosol in Vitro Exposure System (EAVES): an alternative exposure system for particles. *Inhal. Toxicol.* 21, 91–101.
- Burnett, R., Chen, H., Szyszkowicz, M., Fann, N., Hubbell, B., Pope, C.A., et al., 2018. Global estimates of mortality associated with long-term exposure to outdoor fine particulate matter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 115, 9592–9597.
- Carvalho, T.C., Peters, J.I., Williams, R.O., 2011. Influence of particle size on regional lung deposition—what evidence is there? *Int. J. Pharm.* 406, 1–10.
- Chen, L.C., Lippmann, M., 2009. Effects of metals within ambient air particulate matter (PM) on human health. *Inhal. Toxicol.* 21, 1–31.
- Crobeddu, B., Aragao-Santiago, L., Bui, L.C., Boland, S., Squiban, Baeza, A., 2017. Oxidative potential of particulate matter 2.5 as predictive indicator of cellular stress. *Environ. Pollut.* 230, 125–133.
- Dergham, M., Lepers, C., Verdin, A., Billet, S., Cazier, F., Courcot, D., et al., 2012. Prooxidant and proinflammatory potency of air pollution particulate matter (PM_{2.5-0.3}) produced in rural, urban, or industrial surroundings in human bronchial epithelial cells (BEAS-2B). *Chem. Res. Toxicol.* 25, 904–919.
- Diabaté, S., Mühlhopt, S., Paur, H.R., Krug, H.F., 2008. The response of a co-culture lung model to fine and ultrafine particles of incinerator fly ash at the air-liquid interface. *Altern. Lab. Anim.* 36, 285–298.
- Donaldson, K., Brown, D., Clouter, A., Duffin, R., MacNee, W., Renwick, L., et al., 2002. The pulmonary toxicology of ultrafine particles. *J. Aerosol Med.* 15, 213–220.
- Feng, Y., Li, Y., Cui, L., 2018. Critical review of condensable particulate matter. *Fuel* 224, 801–813.
- Frijns, E., Verstraelen, S., Stoehr, L.C., Van Laer, J., Jacobs, A., Peters, J., et al., 2017. A novel exposure system termed NAVETTA for in vitro laminar flow electrodeposition of nanoaerosol and evaluation of immune effects in human lung reporter cells. *Environ. Sci. Technol.* 51, 5259–5269.
- Hawley, B., L'Orange, C., Olsen, D.B., Marchese, A.J., Volckens, J., 2014a. Oxidative stress and aromatic hydrocarbon response of human bronchial epithelial cells exposed to petro- or biodiesel exhaust treated with a diesel particulate filter. *Toxicol. Sci.* 141, 505–514.
- Hawley, B., McKenna, D., Marchese, A., Volckens, J., 2014b. Time course of bronchial cell inflammation following exposure to diesel particulate matter using a modified EAVES. *Toxicol. In Vitro* 28, 829–837.
- Jing, L., 1999. Standard Combustion Aerosol Generator (SCAG) for Calibration Purposes. Third ETH Workshop “Nanoparticle Measurement”, ETH Hönggerberg Zürich 9.-10. August 1999.

- Kaur, K., Jaramillo, I.C., Mohammadpour, R., Sturrock, A., Ghandehari, H., Reilly, C., et al., 2019. Effect of collection methods on combustion particle physicochemical properties and their biological response in a human macrophage-like cell line. *J. Environ. Sci. Health Part A Tox. Hazard. Subst. Environ. Eng.* 54, 1170–1185.
- Kreyling, W.G., Semmler-Behnke, M., Seitz, J., Scymczak, W., Wenk, A., Mayer, P., et al., 2009. Size dependence of the translocation of inhaled iridium and carbon nanoparticle aggregates from the lung of rats to the blood and secondary target organs. *Inhal. Toxicol.* 21 (1), 55–60 Suppl.
- Kumar, P., Kalaiarasan, G., Porter, A.E., Pinna, A., Kłosowski, M.M., Demokritou, P., et al., 2021. An overview of methods of fine and ultrafine particle collection for physicochemical characterisation and toxicity assessments. *Sci. Total Environ.* 756, 143553.
- Kwon, H.S., Ryu, M.H., Carlsten, C., 2020. Ultrafine particles: unique physicochemical properties relevant to health and disease. *Exp. Mol. Med.* 52, 318–328.
- Leclercq, B., Kluza, J., Antherieu, S., Sotty, J., Alleman, L.Y., Perdrix, E., et al., 2018. Air pollution-derived PM_{2.5} impairs mitochondrial function in healthy and chronic obstructive pulmonary diseased human bronchial epithelial cells. *Environ. Pollut.* 243, 1434–1449.
- Lee, W.J., Wang, Y.F., Lin, T.C., Chen, Y.Y., Lin, W.C., Ku, C.C., et al., 1995. PAH characteristics in the ambient air of traffic-source. *Sci. Total Environ.* 159, 185–200.
- Leikauf, G.D., Kim, S.H., Jang, A.S., 2020. Mechanisms of ultrafine particle-induced respiratory health effects. *Exp. Mol. Med.* 52, 329–337.
- Lielieveld, J., Klingmüller, K., Pozzer, A., Pöschl, U., Fnais, M., Daiber, A., et al., 2019. Cardiovascular disease burden from ambient air pollution in Europe reassessed using novel hazard ratio functions. *Eur. Heart J.* 40, 1590–1596.
- Li, N., Alam, J., Venkatesan, M.I., Eiguren-Fernandez, A., Schmitz, D., Stefano, E.D., et al., 2004. Nrf2 is a key transcription factor that regulates antioxidant defense in macrophages and epithelial cells: protecting against the proinflammatory and oxidizing effects of diesel exhaust chemicals. *J. Immunol.* 173, 3467–3481.
- Li, N., Sioutas, C., Cho, A., Schmitz, D., Misra, C., Sempf, J., et al., 2003. Ultrafine particulate pollutants induce oxidative stress and mitochondrial damage. *Environ. Health Perspect.* 111, 455–460.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} method. *Methods* 25, 402–408.
- Loret, T., Peyret, E., Dubreuil, M., Aguerre-Chariol, O., Bressot, C., le Bihan, O., et al., 2016. Air-liquid interface exposure to aerosols of poorly soluble nanomaterials induces different biological activation levels compared to exposure to suspensions. *Part. Fibre Toxicol.* 13, 58.
- Manojkumar, N., Srimuruganandam, B., Shiva Nagendra, S.M., 2019. Application of multiple-path particle dosimetry model for quantifying age specified deposition of particulate matter in human airway. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 168, 241–248.
- Marhaba, I., Ferry, D., Laffon, C., Regier, T.Z., Ouf, F.X., Parent, P., 2019. Aircraft and MiniCAST soot at the nanoscale. *Combust. Flame* 204, 278–289.
- Marris, C.R., Kompella, S.N., Miller, M.R., Incardona, J.P., Brette, F., Hancox, J.C., et al., 2020. Polyaromatic hydrocarbons in pollution: a heart-breaking matter. *J. Physiol.* 598, 227–247.
- Marshall, A., Rodgers, R., 2008. Petroleomics: chemistry of the underworld. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 18090–18095.
- Moallemi, A., Kazemimanesh, M., Corbin, J.C., Thomson, K., Smallwood, G., Olfert, J.S., et al., 2019. Characterization of black carbon particles generated by a propane-fueled miniature inverted soot generator. *J. Aerosol Sci.* 135, 46–57.
- Moore, R.H., Ziemba, L.D., Dutcher, D., Beyersdorf, A.J., Chan, K., Crumeyrolle, S., et al., 2014. Mapping the operation of the miniature combustion aerosol standard (Mini-CAST) soot generator. *Aerosol Sci. Technol.* 48, 467–479.
- Mühlhopt, S., Dilger, M., Diabaté, S., Schlager, C., Krebs, T., Zimmermann, R., et al., 2016. Toxicity testing of combustion aerosols at the air-liquid interface with a self-contained and easy-to-use exposure system. *J. Aerosol Sci.* 96, 38–55.
- Nemmar, A., Holme, J.A., Rosas, I., Schwarze, P.E., Alfaro-Moreno, E., 2013. Recent advances in particulate matter and nanoparticle toxicology: a review of the in vivo and in vitro studies. *BioMed Res. Int.* 2013, 1–22.
- Ning, Z., Sillanpää, M., Pakbin, P., Sioutas, C., 2008. Field evaluation of a new particle concentrator-electrostatic precipitator system for measuring chemical and toxicological properties of particulate matter. *Part. Fibre Toxicol.* 5, 15.
- Oberdörster, G., Sharp, Z., Atudorei, V., Elder, A., Gelein, R., Kreyling, W., et al., 2004. Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain. *Inhal. Toxicol.* 16, 437–445.
- Ouf, F.X., Yon, J., Ausset, P., Coppalle, A., Maillé, M., 2010. Influence of sampling and storage protocol on fractal morphology of soot studied by transmission electron microscopy. *Aerosol Sci. Technol.* 44, 1005–1017.
- Paur, H.R., Cassee, F.R., Teeguarden, J., Fissan, H., Diabate, S., Aufderheide, M., et al., 2011. In-vitro cell exposure studies for the assessment of nanoparticle toxicity in the lung—A dialog between aerosol science and biology. *J. Aerosol Sci.* 42, 668–692.
- Pope, C.A., Bates, D.V., Raizenne, M.E., 1995. Health effects of particulate air pollution: time for reassessment? *Environ. Health Perspect.* 103, 472–480.
- Ravindra, K., Sokhi, R., Van Grieken, R., 2008. Atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons: source attribution, emission factors and regulation. *Atmos. Environ.* 42, 2895–2921.
- Rayner, R.E., Makena, P., Prasad, G.L., Cormet-Boyaka, E., 2019. Optimization of normal human bronchial epithelial (NHBE) cell 3D cultures for in vitro lung model studies. *Sci. Rep.* 9, 500.
- Rubio, V., Valverde, M., Rojas, E., 2010. Effects of atmospheric pollutants on the Nrf2 survival pathway. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 17, 369–382.
- Rubio, V., Zhang, J., Valverde, M., Rojas, E., Shi, Z.Z., 2011. Essential role of Nrf2 in protection against hydroquinone- and benzoquinone-induced cytotoxicity. *Toxicol. In Vitro* 25, 521–529.
- Schmid, O., Cassee, F.R., 2017. On the pivotal role of dose for particle toxicology and risk assessment: exposure is a poor surrogate for delivered dose. *Part. Fibre Toxicol.* 14, 52.
- Schmid, O., Möller, W., Semmler-Behnke, M., Ferron, G.A., Karg, E., Lipka, J., et al., 2009. Dosimetry and toxicology of inhaled ultrafine particles. *Biomarkers* 14, 67–73.
- Schraufnagel, D.E., 2020. The health effects of ultrafine particles. *Exp. Mol. Med.* 52, 311–317.
- Schwarze, P.E., Øvreivik, J., Hetland, R.B., Becher, R., Cassee, F.R., Låg, M., et al., 2007. Importance of size and composition of particles for effects on cells in vitro. *Inhal. Toxicol.* 19, 17–22.
- Sillanpää, M., Geller, M.D., Phuleria, H.C., Sioutas, C., 2008. High collection efficiency electrostatic precipitator for in vitro cell exposure to concentrated ambient particulate matter (PM). *J. Aerosol Sci.* 39, 335–347.
- Sotty, J., Garçon, G., Denayer, F.O., Alleman, L.Y., Saleh, Y., Perdrix, E., et al., 2019. 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.* 176, 108538.
- Stewart, C.E., Torr, E.E., Mohd Jamili, N.H., Bosquillon, C., Sayers, I., 2012. Evaluation of differentiated human bronchial epithelial cell culture systems for asthma research. *J. Allergy.* 2012, 1–12.

- Tyler, C.R., Zychowski, K.E., Sanchez, B.N., Rivero, V., Lucas, S., Herbert, G., et al., 2016. Surface area-dependence of gas-particle interactions influences pulmonary and neuroinflammatory outcomes. *Part. Fibre Toxicol.* 13, 64.
- Zavala, J., Freedman, A.N., Szilagyi, J.T., Jaspers, I., Wambaugh, J.F., Higuchi, M., et al., 2020. New approach methods to evaluate health risks of air pollutants: critical design considerations for in vitro exposure testing. *Int. J. Environ. Res. Public. Health* 17, 2124.
- Zavala, J., Lichtveld, K., Ebersviller, S., Carson, J.L., Walters, G.W., Jaspers, I., et al., 2014. The gillings sampler – An electrostatic air sampler as an alternative method for aerosol in vitro exposure studies. *Chem. Biol. Interact.* 220, 158–168.

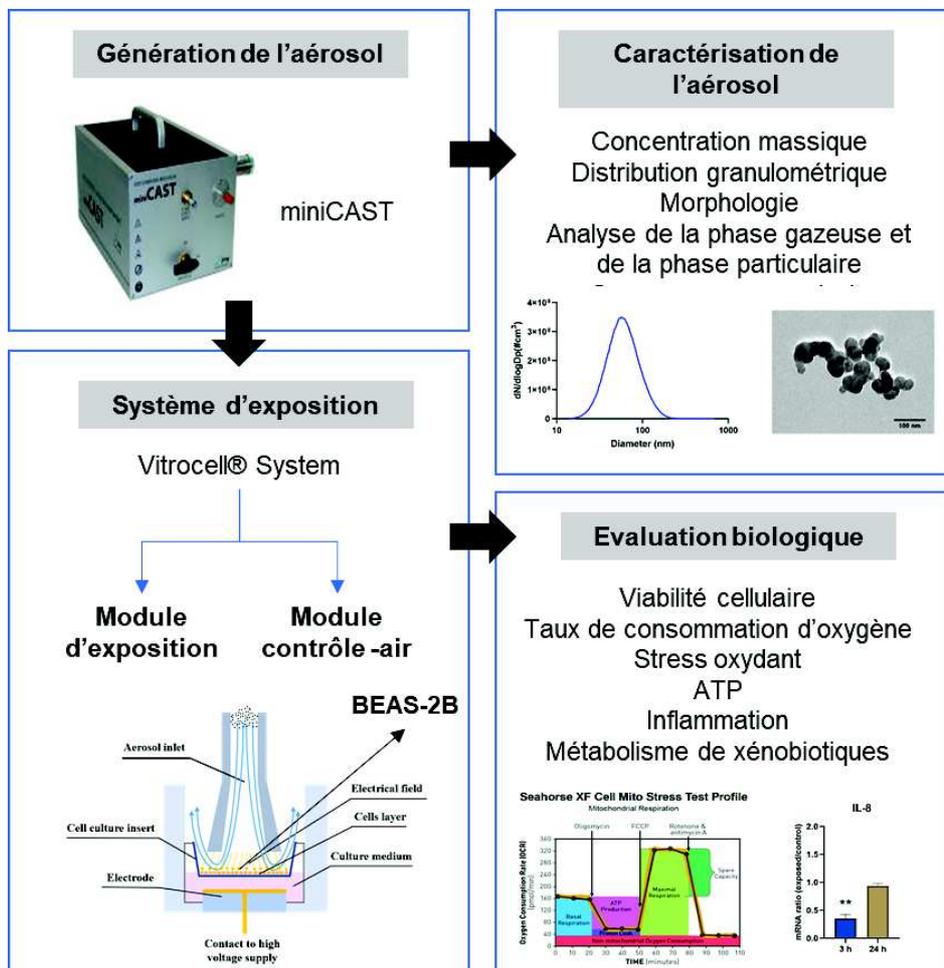
Article n° 2

Toxicological impact of organic UFPs in human bronchial epithelial BEAS-2B cells

Ana Teresa Juarez-Facio, Jérôme Yon, Cécile Corbière, Tiphaine Rogez-Florent, Cécile Castilla, Hélène Lavanant, Mélanie Mignot, Christine Devouge-Boyer, Cathy Logie, Laurence Chevalier, Jean-Marie Vaugeois, Christelle Monteil

Article soumis

Résumé graphique



Contexte

Les PUF comprennent des particules d'un diamètre aérodynamique ≤ 100 nm. L'attention se porte de plus en plus sur cette fraction car leur impact sanitaire serait plus

important. Malgré leur masse négligeable dans l'air ambiant, les PUF sont beaucoup plus nombreuses, de plus, leur grande surface spécifique permet d'avantage l'adsorption de composés néfastes (toxiques) tels que les composés organiques. Parmi ces composés organiques, les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) y sont présents à des concentrations très variables en fonction de la source d'émission. Bien qu'il soit difficile de dissocier l'apport de HAP de l'ensemble des composés caractérisant les PUF, ils représentent des composants clés dans la réponse toxique. Compte tenu des résultats obtenus dans la première étude, nous nous sommes intéressés aux particules du CAST3 qui présentent une forte teneur en composés organiques. Des analyses complémentaires de la phase gazeuse et particulaire ont été réalisées. Dans cette étude, la lignée BEAS-2B cultivée sur insert a été utilisée. L'objectif de cette étude a été de montrer les effets toxicologiques de PUF avec une teneur importante en composés organiques sur la lignée BEAS-2B exposée à l'interface air-liquide (IAL) à l'aide d'un système Vitrocell® et un générateur de suies miniCAST.

Principaux résultats

L'aérosol organique de cette étude a déjà fait l'objet d'une caractérisation physicochimique lors du premier article. En effet, il s'agit du point fonctionnement nommé CAST3 produisant des particules d'un diamètre aérodynamique de 58.9 ± 1.53 nm et une teneur en composés organiques de $87 \pm 5\%$. La phase gazeuse présente des composés tels que le dioxyde de carbone, le dihydrogène, l'acétylène, le méthane entre autres, à de très faibles concentrations (<1%). L'analyse non-ciblée montre que les particules sont composées principalement en HAP et HAP oxygénés. Comme dans la première étude, la dose d'exposition a été de $1.8 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. Dans cette étude, la lignée BEAS-2B cultivée sur insert, a été exposée à l'IAL selon le même mode opératoire que celui décrit dans l'article 1. Ce modèle présente des avantages intéressants pour notre étude. En effet, même si le modèle ne se différencie pas en épithélium pseudo-stratifié comme les cellules NHBE, il a été montré que sous certaines conditions de culture, il peut exprimer des gènes de différenciation et il présente une forte capacité de métabolisation des HAP par rapport au modèle NHBE.

Dans cette étude nous avons étudié la réponse cellulaire 3 h et 24 h après exposition à un aérosol organique. Dans ces conditions, les cellules BEAS-2B n'ont montré

ni cytotoxicité ni modification des niveaux d'ATP et d'ADP. Concernant l'énergétique cellulaire, nous avons complété les mesures d'ATP et d'ADP par des mesures de consommation d'oxygène en utilisant le dispositif Seahorse Extracellular Flux Analyser (Agilent) pour étudier la fonction mitochondriale. Cette approche a également nécessité des mises au point et a permis de confirmer l'absence d'altération du métabolisme énergétique. Toutefois, une limite de cette approche est à souligner : la lecture se fait à partir de microplaques adaptées à l'analyseur nécessitant un repiquage des cellules après l'exposition et une lecture le lendemain, ce qui ne permet pas d'obtenir une réponse juste après l'exposition et nécessite l'utilisation des cellules en conditions immergées.

Dans ces conditions non cytotoxiques et sans modification de l'énergétique cellulaire, plusieurs marqueurs biologiques ont été modifiés. D'abord, le stress oxydant a été évalué par la mesure du GSH et des enzymes antioxydantes. Les niveaux de GSH ont été significativement réduits 3 h alors qu'à 24 h ces niveaux ont augmenté par rapport au contrôle. Ensuite, l'expression de gènes *Nrf2*, *NQO1*, *HO-1*, *CuZnSOD*, *MnSOD* et *catalase* a été évaluée par qRT-PCR. L'expression de *Nrf2* a été supprimée à 24 h. *CuZnSOD* a été significativement exprimé à 24 h alors que l'expression de *MnSOD* a été inhibée après 3 h. Concernant la réponse inflammatoire, étonnamment, les deux gènes étudiés, *IL-6* et *IL-8* ont été significativement inhibés après 3 h d'exposition. Enfin, l'expression des deux gènes du métabolisme de xénobiotiques, *CYP1A1* et *CYP1B1*, a été fortement induit dans les deux temps d'exposition.

Conclusion

Cette deuxième étude présente une approche expérimentale pour étudier l'impact des PUF organiques fraîchement émises en conditions contrôlées et reproductibles. Nos résultats montrent que, malgré aucune cytotoxicité ni altération de l'ATP, l'aérosol organique induit une réponse antioxydante et une suppression de la réponse inflammatoire ainsi que l'induction d'enzymes métabolisant les xénobiotiques. Ce travail a permis de montrer que les cellules Beas-2B cultivées à l'IAL et exposées en ligne, permettent de montrer une toxicité cellulaire adaptée à l'étude des PUF.

Toxicological impact of organic ultrafine particles (UFPs) in human bronchial epithelial BEAS-2B cells at air-liquid interface

A. T. Juarez Facio¹, J. Yon², C. Corbière¹, T. Rogez-Florent¹, C. Castilla³, H. Lavanant³, M. Mignot³, C. Devouge-Boyer³, C. Logie¹, L. Chevalier⁴, J.-M. Vaugeois¹, C. Monteil¹

¹ Normandie Univ, UNIROUEN, UNICAEN ABTE, 76000 Rouen, France

² Normandie Univ, UNIROUEN, INSA Rouen, CNRS, CORIA, 76000 Rouen, France.

³ Normandie Univ, INSA Rouen, UMR 6014 CNRS, COBRA, 76801, Saint Etienne Du Rouvray, France

⁴ Normandie Univ, UNIROUEN, INSA Rouen, CNRS, GPM-UMR6634, 76000 Rouen, France

* Corresponding author: C. Monteil

ABTE-ToxEMAC, UFR Santé, 22 boulevard Gambetta, 76000 ROUEN

+33235148475

E-mail: christelle.monteil@univ-rouen.fr

ABSTRACT

Air pollution has significant health effects worldwide and airborne particles play a significant role in these effects. Ultrafine particles (UFPs) have an aerodynamic diameter of 0.1 μm or less and can penetrate deep into the respiratory tree and reach other organs such as the liver, heart, and brain. UFPs are thought to be more toxic due to their large specific surface area which should absorb more organic compounds. The aim of this study is to show the toxicological effects of UFPs with high organic content on BEAS-2B cells through at air-liquid interface (ALI) exposure using a Vitrocell® technology and a miniCAST (Combustion Aerosol Standard) generator. In conjunction with this approach, chemical analysis of particles and gas phase was performed to evaluate the presence of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). Analyses showed that PAHs are presented in our UFPs aerosol. With this experimental setup, exposure of the BEAS-2B cells induced neither cytotoxicity, nor mitochondrial dysfunction. However, an increase of oxidative stress was observed, as assessed through *Nrf2*, *NQO1*, *HO-1*, *CuZnSOD*, *MnSOD* and *Catalase* gene expression, together with a significant induction of genes related to metabolism of xenobiotics *CYP1A1* and *CYP1B1*. A negative regulation of inflammatory genes expression (*IL-6* and *IL-8*) was present 3 three hours after the exposition to the UFPs. Taken together, this experimental approach, using repeatable condition, should help clarifying the mechanisms by which organic UFPs induce toxicological effects.

KEYWORDS: BEAS-2B, Air-Liquid Interface, miniCAST, ultrafine particles, PAH, oxidative stress, inflammation, metabolism of xenobiotics

1. INTRODUCTION

Presence of particulate matter in ambient air is responsible for important health impacts in many urban and industrialized zones. Due to its physical properties and health effects, airborne ultrafine particulate matter is getting more attention. Ultrafine particles (UFPs) are defined as particles for which aerodynamic diameter is equal or inferior to 100 nm. The principal sources of UFPs emissions in urban environments are road traffic (mainly caused by Diesel engines) but also industrial processes related to energy production, incinerators, construction and home heating (Li et al., 2016; Oberdörster et al., 2005). Despite the very low concentrations of UFPs in the air, they represent very high particle number concentrations. Moreover, because of their higher specific area and surface reactivity, UFPs can adsorb a significant amount of toxic compounds making them more threatening than larger particulate matter (PM) (Kwon et al., 2020). Therefore, besides morphological characteristics of the particles, their chemical composition also plays an important role in adverse health effects of UFPs.

UFPs emissions contain a wide range of chemical species in highly variable concentrations depending on the source. For example, traffic emissions include soot particles coated with organic compounds such as alkanes, alkenes, aldehydes, and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) surrounded by a gas phase containing CO, CO₂, NO_x, SO_x, VOCs, SVOCs and water vapor (Kwon et al., 2020). Despite the fact that it is difficult to disentangle

PAHs from other air pollutants derived from combustion processes, they deserve major attention as they are among the key compounds in UFPs toxicity (Kwon et al., 2020; Lee et al., 1995; Walgraeve et al., 2010).

PAHs are organic compounds with two or more fused aromatic (benzene) rings. PAHs with low molecular weight (two or three rings) stay in the vapor phase in the atmosphere while PAHs with more than three rings are mostly bound to particles allowing them to travel by air and water to soil and sediments becoming widespread pollutants in environment. They are formed during incomplete combustion processes including forest fires, fossil fuels and wood burning, tobacco smoke, various forms of cooking, industrial processes and traffic emissions (Hussar et al., 2012). Benzo(a)pyrene (BaP) is the most studied PAHs and is often used as a marker for exposure to carcinogenic PAHs due to its high contribution to the carcinogenic potential (Ohura et al., 2004), that is why the current European directive sets a target value for ambient air concentration of BaP, measured in PM₁₀. However, a broader range of PAH-species may contribute to the health effects of air pollution and may be associated with even smaller particles. Consequently, it is uncertain if the current regulation sufficiently protects against the various health outcomes of PAHs (Lag et al 2020).

UFPs exposure has been implicated in the development of several health outcomes through mechanisms that involve oxidative stress, inflammation, and mitochondrial dysfunction (Araujo and Nel, 2009; Pope and Dockery, 2006; Sotty et al., 2020). Redox-active organic chemicals on particle surface, as PAHs, are the principal source of reactive oxygen species (ROS) in UFPs (Daiber et al., 2020; Li et al., 2016). A high concentration of these pro-oxidant molecules cause an imbalance between oxidants and antioxidants known as oxidative stress, inducing a disruption of redox signaling and molecular damage (Sies and Jones, 2007). The transcription factor Nrf2 is the key regulator to protect cells against the harmful effects of ROS by inducing most of the antioxidants and detoxifications enzymes, as HO-1 and NQO1 (Cho and Kleeberger, 2010). Several proinflammatory signaling pathways are redox-sensitive. Hence, these pathways can be activated and induce airway inflammation after a failure of cells to restore redox homeostasis (Araujo and Nel, 2009; Biswas and Rahman, 2009). Inflammation is characterized by the activation of several signaling pathways in response to stress. The inflammatory response involves both anti- and pro-inflammatory mediators shown by the expression of cytokines and transcription factors (Chen et al., 2017). Along with oxidative stress and inflammation, mitochondrial dysfunction has been reported to be a mechanism induced by airborne PM. Mitochondria play a crucial role in cellular bioenergetics by the synthesis of adenosine triphosphate (ATP) and they are also important regulators of oxidative stress through generation of ROS (Lavrich et al., 2018; Wang and Tang, 2018). The mentioned pathways may be initiated by PAHs binding to the aryl hydrocarbon receptor (AhR) (Låg et al., 2020) resulting in up regulation of AhR-regulated genes as CYP enzymes (Nebert et al., 2004). However, although there have been a large number of studies on the toxicity of PM, there are few studies specific to UFPs and a number of uncertainties remain to be clarified, such as the specific toxicological effects observed after UFPs exposures and the contribution of PAHs in these cellular effects.

Many toxicological studies are performed with PM collected *in-situ* (Bengalli et al., 2019, 2017; Borgie et al., 2015; Cho et al., 2018). This approach is relevant to examine toxicity associated with a specific site and/or season. However, the collected particles are resuspended in a liquid medium for subsequent contact with cells, which may induce potential shortcomings, such as the loss of volatile organic compounds and microphysical properties of UFPs. To address these issues, we have used in the present study a Combustion Aerosol Standard aerosol (mini-CAST) generator with a selected operational condition in order to produce UFPs with a high content in PAHs, and directly connected to an air-liquid interface (ALI) device. This approach allows studying in a reproducible manner UFPs toxicity rich in PAHs, without potential confounders like variations in air quality, metals or other compounds present in field samples and without the loss of the properties of the aerosol. The objective of this study is to provide a description of this *in vitro* methodological approach and to investigate the potential toxicity mechanisms involved after organic aerosol exposures.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Chemicals

Unless otherwise specified, chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (St Quentin Fallavier, France).

2.2 Exposure system

The exposure system consisted of a soot generator miniCAST (5201c), a Vitrocell® exposure system, and several devices for physical characterization and sampling points for chemical analysis. A schematic of the experimental setup is shown in Figure S1. The studied aerosol was chosen for its high contents in organic carbon and for assuring modal diameter lower than 100 nm. The operating condition in miniCAST consisted of propane combustion controlled with different flow rates: propane (60 mL/min), nitrogen (7 mL/min), oxidation air (1 mL/min) and dilution air (20 L/min).

2.3 Aerosol characterization

Mass concentration was measured with a Tapered Element Oscillating Microbalance (TEOM) and controlled with the Pegasor Particle Sensor (PPS-M PEGASOR). Number and particle size distributions were measured with a Scanning Mobility Particle Sizer (SMPS – DMA 3082 – CPC 3756) downstream of the Vitrocell® system. To examine particle morphology, soot particles were deposited onto a grid (200-mesh copper grid with a Formvar/carbon film, Agar Scientific) and then observed with a high-resolution microscope (JEOL, JEM-3010 model) using transmission electron microscopy (TEM). The chemical characterization focused on both the gas phase and soot, is described in the supplementary experimental part.

Dose exposure was determined in two steps. First deposited mass rate was measured by the quartz crystal microbalance (QCM – Vitrocell®) integrated in the exposure module. Then, deposition factor is increased by activating the electrostatic precipitator for which enhancement factor was determined with the Scanning Mobility Particle Sizer (SMPS): Aerosol size distributions were measured, upstream and downstream of the exposure module, with and without electric field.

2.4 Cell culture and exposure conditions

BEAS-2B cell line (ATCC – CRL9609™) derived from normal human bronchial epithelial cells were obtained from autopsy of non-cancerous individuals. BEAS-2B cell line was cultured in LHC-9 medium (GIBCO) supplemented with 100 U/ml penicillin and 100 mg/ml streptomycin in collagen pre-coated flasks to improve cell adherence until 75-80% of confluence. Then, they were seeded at a density of 90,000 cells per cm² on collagen coated Transwell™ inserts. Culture was maintained in Liquid-Liquid interface for 10 days prior to exposure. Then apical medium was removed, and Air-Liquid interface was carried out during and after exposure. The cultures were maintained in 95% humidified air with 5% CO₂ at 37°C.

During exposure, cells were placed in the Vitrocell® system and exposed at air-liquid interface (ALI) to aerosol (exposure module) or to HEPA-filtered clean air (air control module) for 35 minutes. Aerosol was delivered to each well by isokinetic sampling at a flow rate of 10 mL/min/well. Each module was designed for simultaneous exposure of three independent replicates. An electrical field (+1000 V) was used to increase particles deposition. Cellular response relative to control was then evaluated, 3 h and 24 h following the exposure.

2.5 Biological endpoints

2.5.1 Cell viability

Cell viability after exposure was assessed using the MTT assay (formazan product formed by functional mitochondrial dehydrogenases). After 3 h and 24 h exposure, inserts were rinsed with phosphate-buffered saline (PBS-1X). Then, 0.05 mL of MTT solution (50 µg/mL) was added in 0.5 mL of LHC-9 medium to the lower chamber during 3 h. To dissolved formazan crystals, 0.8 mL of SDS (10% in 0.1 N HCl) were added to lower and upper chambers and incubated during the night. The extracted solution was transferred to 96 well plates, and absorbance was measured at 570 nm (Xenius, Safas, Monaco). Results were calculated with the absorbance of the samples normalized to the control, which was set to 100%.

2.5.2 Gene expression

Total RNAs were isolated using Direct-zol™ RNA MiniPrep (Ozyme) according to manufacturer's instructions. RNA concentration and purity were measured with a NanoDrop spectrophotometer (NanoDrop™ 2000 / 2000c.). RNA integrity numbers of the samples were > 8. DNase treatment was carried out with DNase I, Amplification Grade (Invitrogen™). cDNAs were synthesized using Invitrogen™ Transcriptase inverse (M-MLV) from 1 µg of total RNA. Real-time PCR was performed with the cDNA samples and Brilliant III Ultra-fast SYBR Green QPCR Master Mix on Stratagene Mx3005P System (Agilent Technologies). Expression profiles of *Nrf2*, *NQO1*, *HO-1*, *CuZnSOD*, *MnSOD*, *IL-6*, *IL-8*, *CYP1B1* and *CYP1A1* were normalized to *B2M*. Primers sequences are shown in Table S2. Results are expressed as relative expression using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method.

2.5.3 Assessment of oxygen consumption

Assessments of oxygen consumption were performed with the Seahorse XF HS mini analyzer (Agilent Technologies, les Ulis, France) from cells exposed 24 h to particles, after 3 days on culture at ALI. After the exposures, cells were harvested and replated in XFp8 miniplates (Agilent Technologies) at 30000 cells/well. 24 h later, oxygen consumption rates (OCR) were measured according to the instructions of the manufacturer. Briefly, cells were washed once with XF DMEM media (Agilent) supplemented with 1 mM pyruvate, 2 mM glutamine, and 10 mM glucose at pH 7.4. Then, cells in DMEM were incubated for 1 h at 37 °C in non-CO₂ incubator. Measurements of baseline OCR were determined before administration of different drugs of the assay (Mitochondrial stress test – Agilent Technologies). Next, media was removed, and cells were frozen until determination of protein content. OCR were normalized against protein content and data analysis was conducted with the Seahorse Wave software (Agilent Technologies).

2.5.4 ATP and ADP measurements

After 3 h and 24 h exposure, inserts were washed in PBS-1X and incubated in 500 µL of perchloric acid solution (1 N) for 60 minutes at 4 °C. Cells were subsequently harvested by scraping and centrifuged at 13500 g for 5 minutes at 4 °C. Pellets were resuspended in NaOH (1 N) and used to determine proteins concentration by Lowry assay. Supernatants were neutralized by addition of K₂CO₃ (2 M) and centrifuged at 13500 g for 5 minutes at 4 °C. Supernatant was collected and stored at -80°C until use.

Intracellular ATP and ADP amounts were quantified by high performance liquid chromatography coupled with diode array detector (HPLC-DAD, 1260 Infinity II, Agilent Technologies). Analytes were separated on a Poroshell 120 EC-C18 (3 x 150 mm, 2.7 µm) with guard EC-C18 (3 mm). Briefly, stock solutions of 10 mM ATP, ADP were prepared by dissolving the appropriate amounts in ultrapure water. The above stock solutions were all stored at -20 °C, the working solutions were prepared daily by appropriate dilution in mobile phase. The mobile phase consisted of 50 mM of potassium hydrogen phosphate (pH 6.80). The chromatographic separation was carried out at 20 °C with 0.6 mL/min as flow rate. The identification of peaks was based on the comparison of retention times and diode-array spectra of chemicals standard and biological samples. For the quantification, the UV data were collected at 254 nm. Validation of the analytical method was performed by assessment of the linearity, limits of quantification and detection and accuracy to meet the ICH requirements.

2.3.5 Total glutathione measurement (GSH)

Total glutathione measurements were performed with supernatants obtained for ATP and ADP quantification. Briefly, 40 µl of sample, 200 µl of reagent pad and 40 µl of glutathione reductase (8.5 U/mL) were deposited in a 96 well plate and absorbance was measured at 405 nm for 2 min and 40 s. Reagent pad consisted of NADPH (0.4 mM), DTNB (1 mM) and methanol (10%) (VWR, Fontenay-sous-Bois, France) in buffer (160 mM Na₂H₂PO₄; 8 mM EDTA, pH 7.4). GSH levels were determined from a standard curve and normalized to the protein content (Lowry assay) of the corresponding well.

2.3.6 Statistical analysis

Biological endpoints results were expressed as mean \pm SD. Statistical analysis was performed using the non-parametric Mann-Whitney U-test (GraphPad for Windows, v9.0). Statistically significant differences were reported with $p < 0.05$.

3. RESULTS

3.1 Aerosol characterization

During exposure, mass concentration was 57.85 mg/m^3 , geometric median (GM) mobility diameter was $58.9 \pm 1.53 \text{ nm}$ and total count concentration was $1.63\text{E}+08 \text{ N/cm}^3$. These measures correspond to the particle conditions delivered to cells. Size distribution by SMPS and transmission electron microscopy image are reported in Fig. 1.

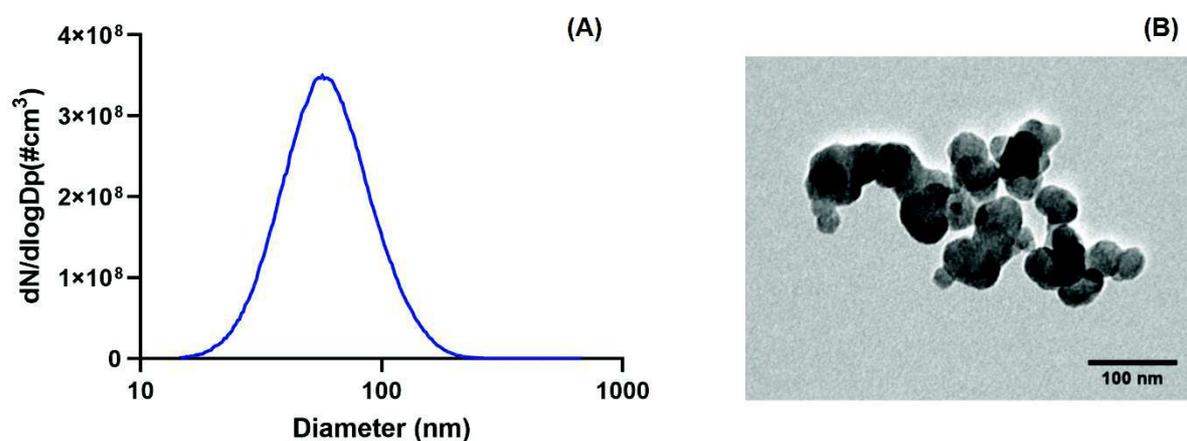


Fig. 1. (A) Size distribution by SMPS and (B) Transmission electron microscopy images of particles

A typical mass spectrum of organic aerosol sample using with laser desorption ionization (LDI) with ultra-high-resolution mass spectrometry (FT-ICR MS) is shown in Figure 2. The main distribution of ions was observed between m/z 200 and m/z 900 and centered around m/z 400. This distribution was easily resolved with FTICR and few isobaric compounds were found within each nominal mass. The mass precision of the FTICR led to the reliable attribution of 1800 molecular formulas, with 85-90% common to all the replicates, as shown in the Venn diagram of Figure S2. Hydrocarbons and molecules with one and two oxygen atoms were mostly found in the sample, as shown in the insert in Fig. 2 representing ion relative intensities for each molecular class.

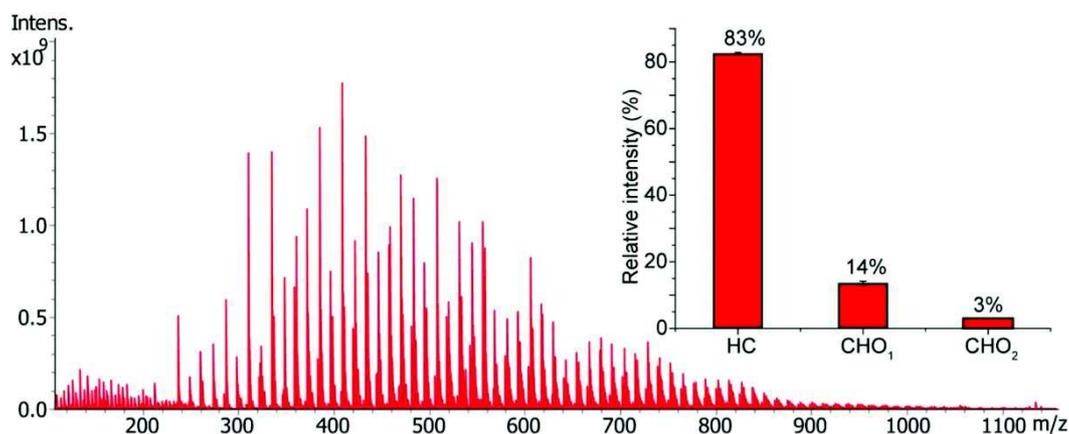


Fig. 2. LDI (+) FTICR mass spectra of organic aerosol sample. The insert corresponds to the relative intensity of the main three molecular class observed within the sample: hydrocarbons (HC), and hydrocarbons with one (CHO_1) and two (CHO_2) oxygen atoms.

The Fig. 3 shows the diagram of the double bond equivalent (DBE) vs carbon number for hydrocarbons. DBE, also called degree of unsaturation or index of hydrogen deficiency totals the number of rings and π bonds present in a molecule. For ions, DBE values can be either integer or half integer numbers depending the type of ion: M^+ (with an odd number of electrons and an even nominal mass) or $[\text{M} + \text{H}]^+$ and $[\text{M} - \text{H}]^+$ (with an even number of electrons and an odd nominal mass). Both types of ions can be obtained from LDI depending on the ionization energy and gas-phase basicity of the molecules.

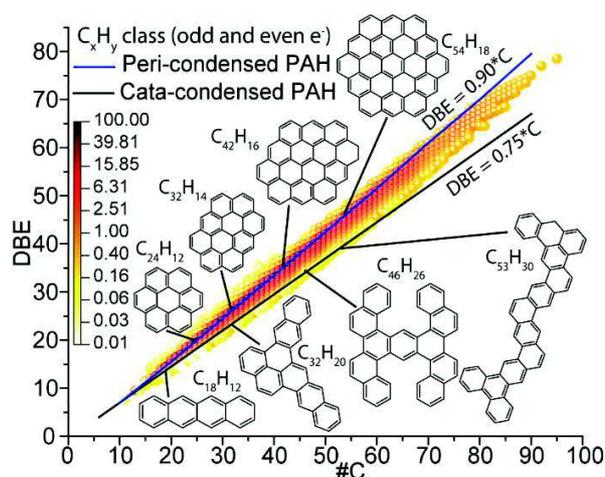


Fig. 3. DBE vs $\#C$ diagrams of LDI FTICR MS data from CAST sample for hydrocarbon compounds with odd and even number of electrons. The colors indicate the relative intensity of the ions. The lower black line represents the trend of cata-condensed PAH and the upper blue line represents the trend of peri-condensed PAH. Putative neutral structures found in the sample were added.

A single distribution of ions was observed for the molecular class chosen with a number of carbon atoms between 10 and 100, and DBE values between 10 and 80 (Fig. 3). These DBE values were very high and corresponded to highly aromatic compounds. Two lines were drawn in the diagram, corresponding to two limits of PAH structures: the cata-condensed and peri-condensed PAH, described in many studies (Hsu et al., 2011; Jacobson et al., 2020; Siegmann and Sattler, 1999). The cata-condensed structures have no carbon atoms shared by more than two aromatic rings and have a $\text{C}_{(4i+2)}\text{H}_{(2i+4)}$ formulas. The peri-condensed PAH have their carbons shared with more

than two aromatic rings. Their formulas obey the relationship by K. Siegmann et al. (Siegmann et al., 1995) in equation 1.

$$[\text{Carbon number}] = \frac{[\text{Hydrogen number}]^2}{6} \quad (1)$$

The peri-condensed and cata-condensed PAH line were drawn using the equations showed in Table S2. As shown in Figure 3, most of the ions observed in LDI FTICR MS were above the cata-condensed curve and most of the highest intensity ions (Table S3) followed the peri-condensed PAH line, indicating that highly condensed PAH were generated during the experiment. Similar characteristics were observed for the molecular class containing one oxygen atom (Figure S3).

Concerning the gaseous phase, the main compounds, presented in Table S5, were carbon dioxide (0.6%), dihydrogen (0.04%), acetylene (0.03%), methane (0.02%), ethylene (0.01%), propyne (0.0007%), propadiene (0.0006%). Other compounds (i.e., propene, propane, 1-buten-3-yne, 1,3 butadiyne, benzene) were detected but at levels under the LQ.

3.2 Cell viability after clean air exposure

To validate the applicability of BEAS-2B cells in ALI for exposure experiments, we first performed a viability study at 3 h and 24 h after 35 min of exposure to clean filtered-air (Air control) using the Vitrocell® system, compared to cultures left in the incubator (Incubator). We evaluated cell viability by the MTT test (Fig. 4.). A slight but not significant reduction of viability was reported compared to incubator controls at 3 h and 24 h after exposure. Based on these results, control air was chosen as control for particle exposure analysis.

3.3 Cellular response after aerosol exposure

3.3.1. Cell viability

Then, BEAS-2B cells were exposed to the aerosols for 35 min resulting in the deposition of approximately 1.8 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Cell viability was evaluated after 3 h and 24 h and compared to control air. The cells maintained a good viability, as observed either with the MTT test or with the ATP/ADP ratio (Fig. 5).

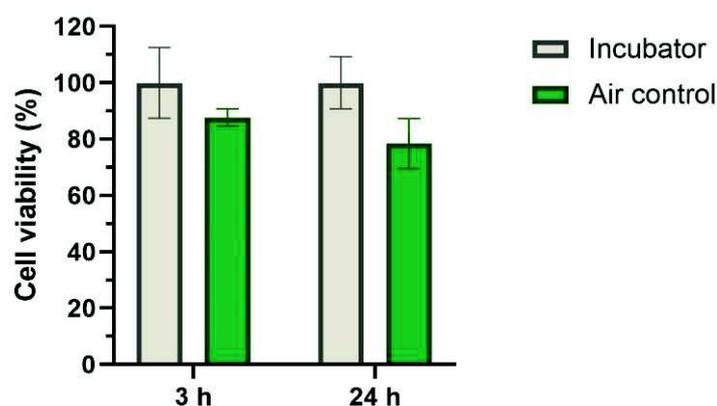


Fig. 4. Cell viability by MTT test (as percent of incubator) in BEAS-2B cells in response to clean air exposure for 35 minutes in the Vitrocell system. Data was expressed as mean \pm SD of 3 independent experiments

These results are in accordance with those observed after the measurement of the mitochondrial function, analyzed using the Cell Mito Stress test (Fig. 6). During this test, the cells were sequentially exposed to oligomycin, an ATP synthase inhibitor, carbonyl cyanide-4-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone (FCCP), an uncoupler, and rotenone with antimycin A, two chain inhibitors. The OCR measured in these conditions evaluated non-mitochondrial and basal respiration, proton leak, ATP production and the spare respiratory capacity. All these parameters were unaffected in our experimental conditions. These results were obtained 24 h after exposures to particles, since the Seahorse technology used in the present study requires replating cells in the Seahorse miniplates, and in submerged conditions, one day prior to assay.

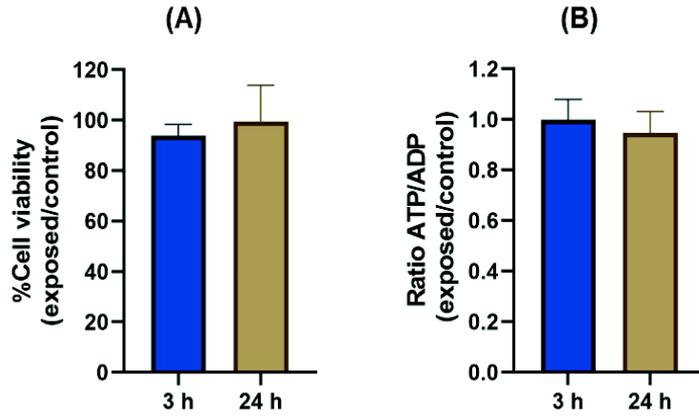


Fig. 5. (A) Cell viability determined by MTT assay and (B) ATP/ADP ratio measurement by HPLC 3 h and 24 h after exposure of organic aerosol. Data was expressed as mean \pm SD of 3-4 independent experiments.

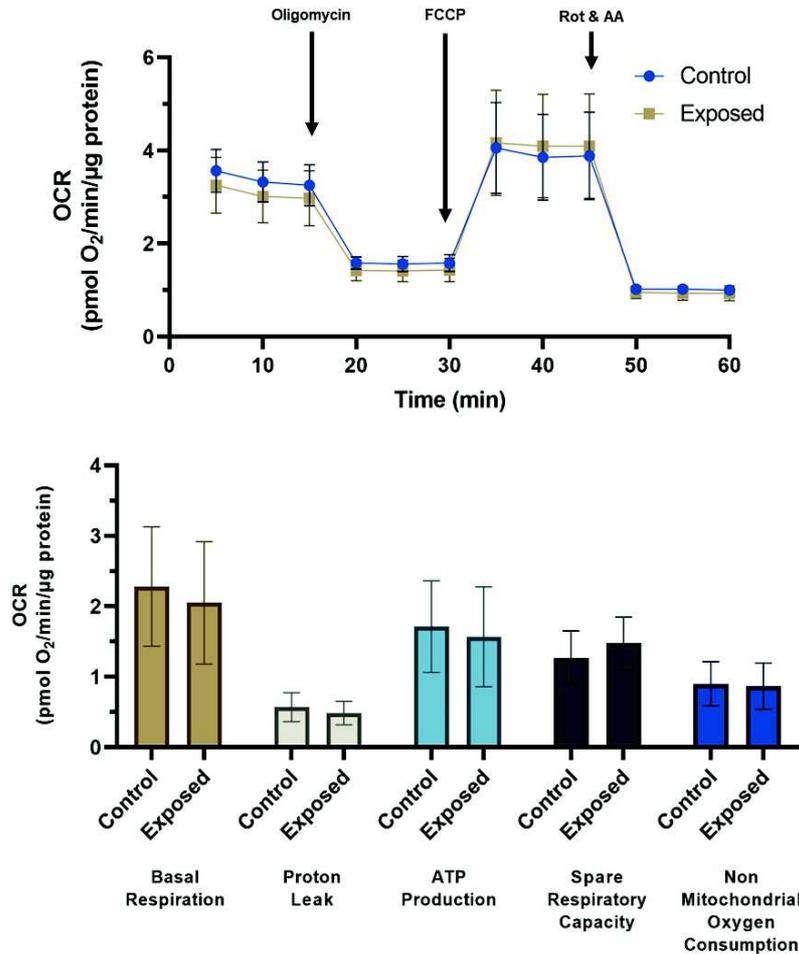


Fig. 6. Oxygen consumption rates (OCR) in human bronchial epithelial BEAS-2B cells exposed to organic aerosol particles or to filtered air. Results were expressed as mean \pm SD of 4 independent experiments.

3.3.2 Oxidative stress and inflammation parameters

As shown in Fig. 5, significant up or down regulation of oxidative stress markers genes were measured in BEAS-2B cells after particles exposure ($p < 0.05$ and $p < 0.005$). In this work, *Nrf2* was slightly up-regulated 24 h after exposure (Fig. 7A). In order to study the Nrf2 signaling pathway activation, we studied expression of two Nrf2 target genes, *NQO1* and *HO-1*. *NQO1* was slightly but significantly up regulated in both time conditions (Fig. 7B), while *HO-1* was almost 4 times up regulated at 3 h but then gets back to the control ratio at 24 h (Fig. 7C). Furthermore, *CuZnSOD* was slightly but significantly up-regulated at 24 h (Fig. 7D), contrary to *MnSOD* which was down-regulated at 3 h (Fig. 7E). *Catalase* was not significantly changed at any condition (Fig. 7F).

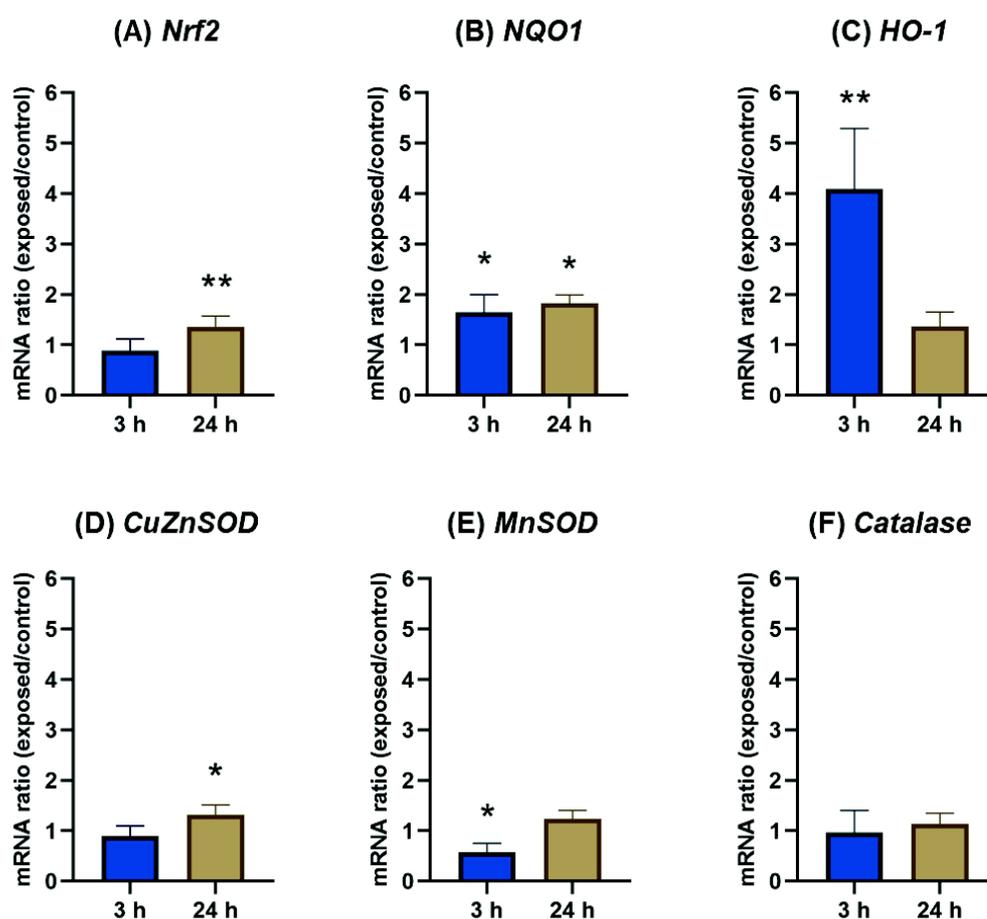


Fig. 7. Gene expression in BEAS-2B cells exposed to organic aerosol. Cells were exposed to organic aerosol (+1000V) during 35 min and incubated with particles during 3 h and 24 h. Results were expressed as mean \pm SD of 4 independent experiments. Statistically significant differences were reported with $p < 0.05$

Along with oxidative response, total glutathione was measured using a colorimetric protocol (Fig. 8). The levels were significantly reduced after 3 h exposure followed by an increased after 24 h, as compared to control.

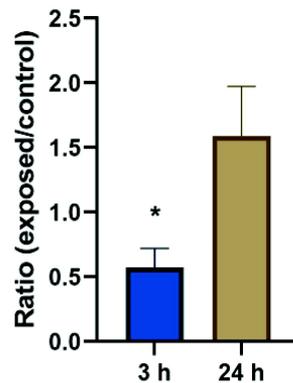


Fig. 8. Total glutathione levels in BEAS-2B cells exposed to organic aerosol. Cells were exposed to organic aerosol (+1000V) during 35 min and incubated with particles during 3 h and 24 h. Results were expressed as mean \pm SD of 4 independent experiments. Statistically significant differences were reported with $p < 0.05$

Inflammation markers, *IL-6* and *IL-8* were down-regulated only 3 h after exposure (Fig. 9).

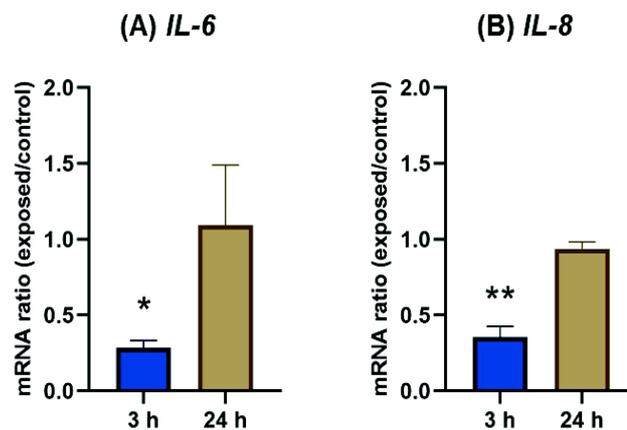


Fig. 9. Gene expression in BEAS-2B cells exposed to organic aerosol. Cells were exposed to organic aerosol (+1000V) during 35 min and incubated with particles during 3 h and 24 h. Results were expressed as mean \pm SD of 4 independent experiments. Statistically significant differences were reported with $p < 0.05$

3.3.3 Expression of genes related to xenobiotic metabolism

Gene expression of metabolizing enzymes was highly up-regulated at both time conditions (Fig. 10). *CYP1B1* was 2.5 and 4 times over expressed, while *CYP1A1* was upregulated 17- and 18-times, after 3 h or 24 h of exposures, respectively.

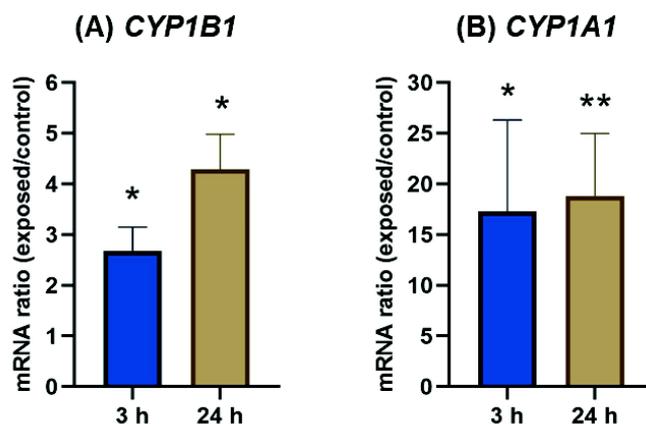


Fig. 10: Gene expression in BEAS-2B cells exposed to organic aerosol. Cells were exposed to organic aerosol (+1000V) during 35 min and incubated with particles during 3 h and 24 h. Results were expressed as mean \pm SD of 4 independent experiments. Statistically significant differences were reported with $p < 0.05$

4. DISCUSSION

In this study, we described a novel methodological approach to study biological effects of aerosols containing low doses of PAHs-rich ultrafine particles, using BEAS-2B cells at ALI and exposed with an online exposure device. Using different endpoints connected to oxidative stress, xenobiotic metabolism and mitochondrial function, the greatest responses appeared on the expression of genes related to metabolism of xenobiotics and inflammation.

We focused in this study on PAHs-rich UFPs characterized by a mobility diameter of 58.9 ± 1.53 nm, with a high content in organic compounds (OC/TC: 87 ± 5 %), as previously described (Bescond et al., 2016). The dimensions of these particles agree with those of soot particles from a variety of sources, such as diesel particles (Hawley et al., 2014a) or biomass burning (Longhin et al., 2016). In this study, non-targeted analysis provides an identification of a wide range of PAHs as seen on the DBE vs #C plot which is a powerful tool for the characterization of complex matrices and for the comparison of samples. The observed compounds were highly aromatic compounds such as PAHs and oxy-PAHs, which are readily ionizable within the LDI source. The presence of oxygenated species corresponds to the insertion of oxygen atoms by the air used for the combustion experiment. The very low levels of gaseous compounds analyzed by GC/TCD and GC/MS, as well as the short-term exposure applied in this study to the cells (35 min) indicate that the observed biological responses can be attributable only to UFPs and their associated PAHs.

In this study, BEAS-2B cell line was grown on transwell inserts during 10 days before aerosol exposure. To our knowledge, very few studies have used this approach for studying UFPs. Similar cultured conditions were previously studied, where BEAS-2B cells were cultured towards a differentiated phenotype (Stewart et al., 2012). At ALI conditions, these cells reported to express β -tubulin IV and showed localized ZO-1 and E-Cadherin staining. Compared to primary models, line cell models presented less variability between passages and experiments (Stewart et al., 2012). Moreover, these cells are metabolically active (Uppstad et al., 2010) and a previous study demonstrated their ability to take up PAHs associated to UFPs (Penn et al., 2005). Therefore, BEAS-2B cells represent an appropriate model to study toxicity of inhaled UFPs. In our study, we used this cellular model for exposures online to aerosols in the Vitrocell® system, after checking cell viability. Clean air exposure

reduced cell viability, as previously reported by Mistry et al., 2020 with clean air at flow rates of 2 and 8 mL/min for 3 hours, due to desiccation of the exposed cells (Mistry et al., 2020). Although we used a great flow rate, our time of exposure was short (35 min), in order to limit this effect. This time was sufficient to obtain a delivery dose at 1.8 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, which was among the lowest reported in the literature (Leclercq et al., 2018; Sotty et al., 2019). In these experimental conditions, MTT assay and ATP levels supported the absence of cytotoxicity, after both 3 h and 24 h of exposure to particles. Concerning the energy metabolism of the cells, we further examined mitochondrial function using the Seahorse Extracellular Flux Analyzer and confirmed the absence of effect on cellular metabolism. However, a limitation of this approach was the use of submerged conditions and seeding cells one day prior the reading that could explain this result. Other experiments are needed to confirm this observation, using a more appropriate approach to monitor the cellular metabolism of ALI epithelial cells, as recently described by Mavin et al (Mavin et al., 2020).

Overall, under these non-cytotoxic conditions and without observed cellular metabolism alteration, several biological markers were significantly altered. First, oxidative stress was studied by measuring glutathione levels (GSH) and genes expression of antioxidant enzymes. In this study, GSH levels were significantly reduced after 3 h exposure, followed by an increased after 24 h, as compared to control. GSH is the principal antioxidant in the lung and its depletion has been observed after acute cigarette smoke (CS) exposure, whereas prolonged exposure to CS induces a GSH increase due to upregulation of the expression and activity of enzymes involved in GSH production (Dalle-Donne et al., 2020). Our results are in agreement with these observations and suggest an adaptive response of BEAS-2B cells to a sustained exposure to UFPs. This hypothesis is reinforced by the induction of *HO-1*, a cytoprotective enzyme, 3 h after exposure. Induction of *HO-1* associated to GSH depletion has been shown in lung fibroblasts after CS exposure (Baglolle et al., 2008) and in BEAS-2B cells after UFPs exposure (Li et al., 2003). In this last study, the authors observed a correlation between the high organic carbon and PAHs contents of UFPs and *HO-1* expression, suggesting a role of organic agents in generating redox activity (Li et al., 2003). In parallel, we observed an upregulation of *NQO1*, this enzyme exerts cytoprotective, antioxidant and anti-inflammatory effects in lungs (Rubio et al., 2011). The induction of *NQO1* after fine and ultrafine particles exposure has been shown in several studies (Frias et al., 2020; Hawley et al., 2014b; Steerenberg et al., 1998; Yuan et al., 2019). Both *HO-1* and *NQO1* are regulated by *Nrf2*. The transcription factor *Nrf2* gene is known to have an important role in resistance to oxidative stress (Ma, 2013). Surprisingly, this gene was up-regulated only after 24 h of exposure. This could be related to a *Nrf2* degradation in cells under stress, as it has been previously shown by Leclercq et al. 2018. (Leclercq et al., 2018). We also found that copper-zinc-superoxide dismutase expression (*CuZnSOD*) was slightly up-regulated 24 h following exposure while manganese superoxide dismutase (*MnSOD*) expression was reduced 3 h following exposure to organic aerosol. Catalase expression kept stable following exposure. *CuZnSOD*, *MnSOD* and *catalase* are antioxidant defense enzymes. SODs catalyzed the redox disproportionation of superoxide into oxygen and hydrogen peroxide. The detoxification process is followed by the conversion of hydrogen peroxide to water and oxygen by catalase and other enzymes as glutathione peroxidases (Fukai and Ushio-Fukai, 2011; Palma et al., 2020). *MnSOD* plays an important role in neutralizing superoxide in the mitochondrial matrix (Hernandez-Saavedra et al., 2017). Decrease in *MnSOD* expression induced by organic aerosol may contribute to an increase of superoxide levels. Similar results have been reported by Cui et al. 2020 (Cui et al., 2020). In this study, *MnSOD* expression was importantly reduced on lymphatic endothelial cells after exposure to $\text{PM}_{2.5}$ (Cui et al., 2020).

Concerning inflammatory markers, contrary to most of *in vitro* studies of UFPs, we reported a down regulation of *IL-8* and *IL-6*, 3 h following exposure. Interestingly, a recent study showed a down-regulation of *IL-6* expression in BEAS-2B cells exposed to particulate matter emissions from gasoline fuels with varying aromatic and ethanol levels (Ahmed et al., 2020). In this study, aromatics content contributed to more significant PAH-mediated *IL-6* downregulation. Therefore, it is possible that the negative regulation of inflammatory responses induced by fuels with varying aromatic and ethanol levels is linked to PAHs and their derivatives in the PM emissions (Ahmed et al., 2020). AhR activation by PAHs and other combustion products, may suppress or induce proinflammatory response (Ahmed et al., 2020; Øvrevik et al., 2015). Regarding xenobiotic metabolism markers, expression of *CYP1B1* and *CYP1A1* were significantly increased at both time conditions. Organic compounds as PAHs can explain these results, as they can induce cytochrome P450 (CYP) metabolic enzymes. Similar results have been reported in other pulmonary cell models (Borgie et al., 2015; Hawley et al., 2014a). PAHs are reported to be

metabolized by the lungs, expressing of xenobiotic-metabolizing enzymes via the AhR signaling pathway (Castell et al., 2005; Ye et al., 2021). Overall, our study suggest that organic aerosols elicit an important cellular alteration. Antioxidant and inflammatory response were observed principally 3 h after exposure and the greatest response is related to xenobiotic metabolism at both time conditions.

5. CONCLUSION

This study presents a methodological approach to study the impact of freshly emitted organic UFPs originating from a controlled setup. For the UFPs emitted by the soot generator miniCAST, our results showed that, although no cytotoxicity nor ATP alterations were observed, the organic aerosol induced an antioxidant response and a negative regulation of inflammatory response as well as an induction of xenobiotic-metabolizing enzymes. To further this study, repeated exposures would be interesting as BEAS-2B cells represent a relevant model. Furthermore, our approach may allow scrutinizing the kinetics of inflammatory response. This approach should contribute in elucidating the role of the PM-adsorbed organic components in causing lung injuries. Moreover, the present protocol could be used to study other kind of particles or other fuels.

6. ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by ANSES (French Agency for Food, Environmental and Occupational Health and Safety; PUFBIO project, Grant number EST-2017-190), the Regional Council of Normandy and the European Union in the framework of the ERDF-ESF (CellSTEM project) and the Laboratoire d'Excellence (LabEx) SynOrg (ANR-11-LABX-0029). A. T. Juarez Facio received a PhD fellowship funded by ADEME (Agency for Ecological Transition). We gratefully acknowledge Seahorse Xfp Analyzer lending by Agilent Technologies.

REFERENCES

- Ahmed, C.M.S., Yang, J., Chen, J.Y., Jiang, H., Cullen, C., Karavalakis, G., Lin, Y.-H., 2020. Toxicological responses in human airway epithelial cells (BEAS-2B) exposed to particulate matter emissions from gasoline fuels with varying aromatic and ethanol levels. *Science of The Total Environment* 706, 135732. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135732>
- Araujo, J.A., Nel, A.E., 2009. Particulate matter and atherosclerosis: role of particle size, composition and oxidative stress. *Part Fibre Toxicol* 6, 24. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-6-24>
- Baglolle, C.J., Sime, P.J., Phipps, R.P., 2008. Cigarette smoke-induced expression of heme oxygenase-1 in human lung fibroblasts is regulated by intracellular glutathione. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 295, L624–L636. <https://doi.org/10.1152/ajplung.90215.2008>
- Bengalli, R., Longhin, E., Marchetti, S., Proverbio, M.C., Battaglia, C., Camatini, M., 2017. The role of IL-6 released from pulmonary epithelial cells in diesel UFP-induced endothelial activation. *Environ. Pollut.* 231, 1314–1321. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.08.104>
- Bengalli, R., Zerboni, A., Marchetti, S., Longhin, E., Priola, M., Camatini, M., Mantecca, P., 2019. In vitro pulmonary and vascular effects induced by different diesel exhaust particles. *Toxicol. Lett.* 306, 13–24. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2019.01.017>
- Bescond, A., Yon, J., Ouf, F.-X., Rozé, C., Coppalle, A., Parent, P., Ferry, D., Laffon, C., 2016. Soot optical properties determined by analyzing extinction spectra in the visible near-UV: Toward an optical speciation according to constituents and structure. *Journal of Aerosol Science* 101, 118–132. <https://doi.org/10.1016/j.jaerosci.2016.08.001>
- Biswas, S.K., Rahman, I., 2009. Environmental toxicity, redox signaling and lung inflammation: The role of glutathione. *Molecular Aspects of Medicine, Glutathione in Health and Disease* 30, 60–76. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2008.07.001>
- Borgie, M., Dagher, Z., Ledoux, F., Verdin, A., Cazier, F., Martin, P., Hachimi, A., Shirali, P., Greige-Gerges, H., Courcot, D., 2015. Comparison between ultrafine and fine particulate matter collected in Lebanon: Chemical characterization, in vitro cytotoxic effects and metabolizing enzymes gene expression in human bronchial epithelial cells. *Environmental Pollution* 205, 250–260. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.05.027>
- Castell, J.V., Teresa Donato, M., Gómez-Lechón, M.J., 2005. Metabolism and bioactivation of toxicants in the lung. The in vitro cellular approach. *Experimental and Toxicologic Pathology* 57, 189–204. <https://doi.org/10.1016/j.etp.2005.05.008>
- Chen, L., Deng, H., Cui, H., Fang, J., Zuo, Z., Deng, J., Li, Y., Wang, X., Zhao, L., 2017. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget* 9, 7204–7218. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.23208>

- Cho, H.-K., Park, C.-G., Shin, H.-J., Park, K.-H., Lim, H.-B., 2018. Comparison of the in vitro toxicological activity of various particulate matter. *Toxicol Ind Health* 34, 99–109. <https://doi.org/10.1177/0748233717749694>
- Cho, H.-Y., Kleeberger, S.R., 2010. Nrf2 protects against airway disorders. *Toxicol Appl Pharmacol* 244, 43–56. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2009.07.024>
- Cui, Y., Chen, G., Yang, Z., 2020. Mitochondrial superoxide mediates PM2.5-induced cytotoxicity in human pulmonary lymphatic endothelial cells. *Environmental Pollution* 263, 114423. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114423>
- Daiber, A., Kuntic, M., Hahad, O., Delogu, L.G., Rohrbach, S., Di Lisa, F., Schulz, R., Münzel, T., 2020. Effects of air pollution particles (ultrafine and fine particulate matter) on mitochondrial function and oxidative stress – Implications for cardiovascular and neurodegenerative diseases. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 696, 108662. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2020.108662>
- Dalle-Donne, I., Garavaglia, M.L., Colombo, G., Astori, E., Lionetti, M.C., La Porta, C.A.M., Santucci, A., Rossi, R., Giustarini, D., Milzani, A., 2020. Cigarette smoke and glutathione: Focus on in vitro cell models. *Toxicology in Vitro* 65, 104818. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2020.104818>
- Frias, D.P., Gomes, R.L.N., Yoshizaki, K., Carvalho-Oliveira, R., Matsuda, M., Junqueira, M. de S., Teodoro, W.R., Vasconcellos, P. de C., Pereira, D.C. de A., Conceição, P.R. da, Saldiva, P.H.N., Mauad, T., Macchione, M., 2020. Nrf2 positively regulates autophagy antioxidant response in human bronchial epithelial cells exposed to diesel exhaust particles. *Sci Rep* 10, 3704. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59930-3>
- Fukai, T., Ushio-Fukai, M., 2011. Superoxide Dismutases: Role in Redox Signaling, Vascular Function, and Diseases. *Antioxid Redox Signal* 15, 1583–1606. <https://doi.org/10.1089/ars.2011.3999>
- Hawley, B., L'Orange, C., Olsen, D.B., Marchese, A.J., Volckens, J., 2014a. Oxidative Stress and Aromatic Hydrocarbon Response of Human Bronchial Epithelial Cells Exposed to Petro- or Biodiesel Exhaust Treated with a Diesel Particulate Filter. *Toxicol Sci* 141, 505–514. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfu147>
- Hawley, B., McKenna, D., Marchese, A., Volckens, J., 2014b. Time course of bronchial cell inflammation following exposure to diesel particulate matter using a modified EAVES. *Toxicology in Vitro* 28, 829–837. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2014.03.001>
- Hernandez-Saavedra, D., Swain, K., Tuder, R., Petersen, S.V., Nozik-Grayck, E., 2017. Redox Regulation of the Superoxide Dismutases SOD3 and SOD2 in the Pulmonary Circulation, in: Wang, Y.-X. (Ed.), *Pulmonary Vasculature Redox Signaling in Health and Disease*, Advances in Experimental Medicine and Biology. Springer International Publishing, Cham, pp. 57–70. https://doi.org/10.1007/978-3-319-63245-2_5
- Hsu, C.S., Lobodin, V.V., Rodgers, R.P., McKenna, A.M., Marshall, A.G., 2011. Compositional Boundaries for Fossil Hydrocarbons. *Energy Fuels* 25, 2174–2178. <https://doi.org/10.1021/ef2004392>
- Hussar, E., Richards, S., Lin, Z.-Q., Dixon, R.P., Johnson, K.A., 2012. Human Health Risk Assessment of 16 Priority Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Soils of Chattanooga, Tennessee, USA. *Water Air Soil Pollut* 223, 5535–5548. <https://doi.org/10.1007/s11270-012-1265-7>
- Jacobson, R.S., Korte, A.R., Vertes, A., Miller, J.H., 2020. The Molecular Composition of Soot. *Angewandte Chemie International Edition* 59, 4484–4490. <https://doi.org/10.1002/anie.201914115>
- Kwon, H.-S., Ryu, M.H., Carlsten, C., 2020. Ultrafine particles: unique physicochemical properties relevant to health and disease. *Exp Mol Med* 52, 318–328. <https://doi.org/10.1038/s12276-020-0405-1>
- Låg, M., Ovrevik, J., Refsnes, M., Holme, J., 2020. Potential role of polycyclic aromatic hydrocarbons in air pollution-induced non-malignant respiratory diseases. *Respiratory Research* 21. <https://doi.org/10.1186/s12931-020-01563-1>
- Lavrich, K.S., Corteselli, E.M., Wages, P.A., Bromberg, P.A., Simmons, S.O., Gibbs-Flournoy, E.A., Samet, J.M., 2018. Investigating mitochondrial dysfunction in human lung cells exposed to redox-active PM components. *Toxicology and Applied Pharmacology* 342, 99–107. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2018.01.024>
- Leclercq, B., Kluza, J., Antherieu, S., Sotty, J., Alleman, L.Y., Perdrix, E., Loyens, A., Coddeville, P., Lo Guidice, J.-M., Marchetti, P., Garçon, G., 2018. Air pollution-derived PM2.5 impairs mitochondrial function in healthy and chronic obstructive pulmonary diseased human bronchial epithelial cells. *Environmental Pollution* 243, 1434–1449. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.09.062>
- Lee, W.-J., Wang, Y.-F., Lin, T.-C., Chen, Y.-Y., Lin, W.-C., Ku, C.-C., Cheng, J.-T., 1995. PAH characteristics in the ambient air of traffic-source. *Science of The Total Environment* 159, 185–200. [https://doi.org/10.1016/0048-9697\(95\)04323-S](https://doi.org/10.1016/0048-9697(95)04323-S)
- Li, N., Georas, S., Alexis, N., Fritz, P., Xia, T., Williams, M.A., Horner, E., Nel, A., 2016. A work group report on ultrafine particles (American Academy of Allergy, Asthma & Immunology): Why ambient ultrafine and engineered nanoparticles should receive special attention for possible adverse health outcomes in human subjects. *J. Allergy Clin. Immunol.* 138, 386–396. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.02.023>
- Li, N., Sioutas, C., Cho, A., Schmitz, D., Misra, C., Sempf, J., Wang, M., Oberley, T., Froines, J., Nel, A., 2003. Ultrafine particulate pollutants induce oxidative stress and mitochondrial damage. *Environ Health Perspect* 111, 455–460.

- Longhin, E., Gualtieri, M., Capasso, L., Bengalli, R., Mollerup, S., Holme, J.A., Øvrevik, J., Casadei, S., Di Benedetto, C., Parenti, P., Camatini, M., 2016. Physico-chemical properties and biological effects of diesel and biomass particles. *Environmental Pollution* 215, 366–375. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.05.015>
- Ma, Q., 2013. Role of Nrf2 in Oxidative Stress and Toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 53, 401–426. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-011112-140320>
- Mavin, E., Verdon, B., Carrie, S., Saint-Criq, V., Powell, J., Kuttruff, C.A., Ward, C., Garnett, J.P., Miwa, S., 2020. Real-time measurement of cellular bioenergetics in fully differentiated human nasal epithelial cells grown at air-liquid-interface. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 318, L1158–L1164. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00414.2019>
- Mistry, A., Bowen, L.E., Dzierlenga, M.W., Hartman, J.K., Slattery, S.D., 2020. Development of an in vitro approach to point-of-contact inhalation toxicity testing of volatile compounds, using organotypic culture and air-liquid interface exposure. *Toxicology in Vitro* 69, 104968. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2020.104968>
- Nebert, D.W., Dalton, T.P., Okey, A.B., Gonzalez, F.J., 2004. Role of Aryl Hydrocarbon Receptor-mediated Induction of the CYP1 Enzymes in Environmental Toxicity and Cancer*. *Journal of Biological Chemistry* 279, 23847–23850. <https://doi.org/10.1074/jbc.R400004200>
- Oberdörster, G., Oberdörster, E., Oberdörster, J., 2005. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ. Health Perspect.* 113, 823–839. <https://doi.org/10.1289/ehp.7339>
- Ohura, T., Amagai, T., Fusaya, M., Matsushita, H., 2004. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Indoor and Outdoor Environments and Factors Affecting Their Concentrations. *Environ. Sci. Technol.* 38, 77–83. <https://doi.org/10.1021/es030512o>
- Øvrevik, J., Refsnes, M., Låg, M., Holme, J.A., Schwarze, P.E., 2015. Activation of Proinflammatory Responses in Cells of the Airway Mucosa by Particulate Matter: Oxidant- and Non-Oxidant-Mediated Triggering Mechanisms. *Biomolecules* 5, 1399–1440. <https://doi.org/10.3390/biom5031399>
- Palma, F.R., He, C., Danes, J.M., Paviani, V., Coelho, D.R., Gantner, B.N., Bonini, M.G., 2020. Mitochondrial Superoxide Dismutase: What the Established, the Intriguing, and the Novel Reveal About a Key Cellular Redox Switch. *Antioxid Redox Signal* 32, 701–714. <https://doi.org/10.1089/ars.2019.7962>
- Penn, A., Murphy, G., Barker, S., Henk, W., Penn, L., 2005. Combustion-Derived Ultrafine Particles Transport Organic Toxicants to Target Respiratory Cells. *Environ Health Perspect* 113, 956–963. <https://doi.org/10.1289/ehp.7661>
- Pope, C.A., Dockery, D.W., 2006. Health effects of fine particulate air pollution: lines that connect. *J Air Waste Manag Assoc* 56, 709–742. <https://doi.org/10.1080/10473289.2006.10464485>
- Rubio, V., Zhang, J., Valverde, M., Rojas, E., Shi, Z.-Z., 2011. Essential role of Nrf2 in protection against hydroquinone- and benzoquinone-induced cytotoxicity. *Toxicology in Vitro* 25, 521–529. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2010.10.021>
- Siegmann, K., Hepp, H., Sattler, K., 1995. Reactive Dimerization: A New PAH Growth Mechanism in Flames. *Combustion Science and Technology* 109, 165–181. <https://doi.org/10.1080/00102209508951900>
- Siegmann, K., Sattler, K., 1999. Formation mechanism for polycyclic aromatic hydrocarbons in methane flames. *J. Chem. Phys.* 112, 698–709. <https://doi.org/10.1063/1.480648>
- Sies, H., Jones, D., 2007. Oxidative Stress*, in: Fink, G. (Ed.), *Encyclopedia of Stress* (Second Edition). Academic Press, New York, pp. 45–48. <https://doi.org/10.1016/B978-012373947-6.00285-3>
- Sotty, J., Kluza, J., De Sousa, C., Tardivel, M., Anthérieu, S., Alleman, L.-Y., Canivet, L., Perdrix, E., Loyens, A., Marchetti, P., Lo Guidice, J.-M., Garçon, G., 2020. Mitochondrial alterations triggered by repeated exposure to fine (PM_{2.5-0.18}) and quasi-ultrafine (PM_{0.18}) fractions of ambient particulate matter. *Environment International* 142, 105830. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.105830>
- Steenberg, P.A., Zonnenberg, J.A.J., Dormans, J.A.M.A., Joon, P.N.T., Wouters, I.M., Bree, L. van, Scheepers, P.T.J., Loveren, H.V., 1998. Diesel Exhaust Particles Induced Release of Interleukin 6 and 8 by (Primed) Human Bronchial Epithelial Cells (Beas 2b) In Vitro. *Experimental Lung Research* 24, 85–100. <https://doi.org/10.3109/01902149809046056>
- Stewart, C.E., Torr, E.E., Mohd Jamili, N.H., Bosquillon, C., Sayers, I., 2012. Evaluation of Differentiated Human Bronchial Epithelial Cell Culture Systems for Asthma Research. *J Allergy (Cairo)* 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/943982>
- Uppstad, H., Øvrebø, S., Haugen, A., Mollerup, S., 2010. Importance of CYP1A1 and CYP1B1 in bioactivation of benzo[a]pyrene in human lung cell lines. *Toxicology Letters* 192, 221–228. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2009.10.025>
- Walgraeve, C., Demeestere, K., Dewulf, J., Zimmermann, R., Van Langenhove, H., 2010. Oxygenated polycyclic aromatic hydrocarbons in atmospheric particulate matter: Molecular characterization and occurrence. *Atmospheric Environment* 44, 1831–1846. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2009.12.004>
- Wang, Y., Tang, M., 2018. Review of in vitro toxicological research of quantum dot and potentially involved mechanisms. *Science of The Total Environment* 625, 940–962. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.12.334>

Ye, G., Gao, H., Zhang, X., Liu, X., Chen, J., Liao, X., Zhang, H., Huang, Q., 2021. Aryl hydrocarbon receptor mediates benzo[a]pyrene-induced metabolic reprogramming in human lung epithelial BEAS-2B cells. *Science of The Total Environment* 756, 144130. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144130>

Yuan, Q., Chen, Y., Li, X., Zhang, Z., Chu, H., 2019. Ambient fine particulate matter (PM_{2.5}) induces oxidative stress and pro-inflammatory response via up-regulating the expression of CYP1A1/1B1 in human bronchial epithelial cells in vitro. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 839, 40–48. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2018.12.005>

SUPPLEMENTARY INFORMATION

Supplementary experimental part

Non-targeted analyses from organic particles

The non-targeted analyses from organic particles were performed using laser desorption ionization (LDI) with ultra-high-resolution mass spectrometry (FT-ICR MS). The LDI source allows the analysis of insoluble molecules by desorption then ionization using a UV laser. Organic particles were deposited on a MTP 384 ground steel target plate using a solvent free method described elsewhere (Barrère et al., 2012). A SolariX XR FTMS (Bruker Daltonics) FTICR with a 12 Tesla superconductive magnet was used. The laser used for LDI was a Nd-YAGx3 laser emitting 355 nm photon with a frequency of 1,000 Hz. A laser power of 13% was used with 100 lasers shot per scans. A number of 150 scans were accumulated in positive mode between *m/z* 110.6 and *m/z* 1200 with 8M words and a free induction decay (FID) of 2.52 s. Triplicate analyses of the sample were performed. Internal mass calibration was performed using a list of PAH found in Table S1 (with a quadratic function) resulting in a standard deviation below 50 ppb. Mass spectrometry signals were attributed to molecular formulas using Bruker DataAnalysis v5.1 (Bruker Daltonics) with an error tolerance of 0.5 ppm and molecular formula boundaries C_xH_nN₀-1O₀₋₅. The data from the triplicate analysis were merged into one table used for graphical representation.

Gaseous phase analysis

After stabilization (around 5 minutes) of propane combustion (organic aerosol), a sampling case (Model 1060 - Supelco) was used to collect the gaseous phase in 1 L Tedlar bags (RESTEK) previously purged with nitrogen. A quartz filter (PALL, 47 mm diameter and 0.3 μm pore diameter) was placed between the collection point and the Tedlar bag. Three samples with and without quartz filter were taken with separate Tedlar bags to check the mixture stability. The 3 Tedlar bags filled with the gaseous phase without filter presented some black particles. Manual injection was done with a gas syringe of 500 μl (Chromoptic). Repeatability of injection was evaluated by three successive injections of the same standard solution and variation coefficients (CV) for all compounds were comprised between 1.3 and 10% in gas chromatography thermal conductivity detection (GC/TCD) and 4.1 to 7.5% in gas chromatography coupled to a mass spectrometer (GC/MS). Standard gases were used for identification. A mixture of 10 gases was provided by Linde (carbon monoxide, carbon dioxide, hydrogen, methane, acetylene, ethylene, ethane, propadiene, propene, propane at 1% mol/mol in nitrogen). Alkane standard (hexane, octane, decane - Fisher Scientific) was prepared in methanol at 2 g/L each and 100 μl was added in a 1 L Tedlar bag previously purged and filled with nitrogen. BTEX standard (benzene and toluene – VWR and ethylbenzene and o-xylene - Merck) was prepared in methanol at 1 g/L and added in a 1 L Tedlar bag previously purged and filled with nitrogen.

The analyses were performed on 2 systems. First, a GC-TCD from Scion equipped with a Porapak Q column (Restek, 2 m x 2.1 mm I.D.; 80/100 mesh) was used for the analysis of hydrogen, oxygen, carbon dioxide, and compounds until C3 (containing 3 carbon atoms in their structure). The second was a GC/MS PERKIN ELMER Clarus 580 SQ8S equipped with a RT-Q-Bond Plot column (RESTEK, 30 m x 0.25 mm x 8 μm) and a PLOT particle trap (Restek, 2.5 m x 0.25 mm: deactivated silica). Identification of volatile compounds such as carbon dioxide, alkanes and alkenes from C1 to C10, and aromatic compounds (benzene, toluene, ethylbenzene, xylene (BTEX)) was achieved with the database NIST 2013. Identification and estimation of the concentrations were done in full scan mode (between 20-200 *m/z*). For GC-TCD, injector was set at 120°C (on-column injection), detector at 130°C, and filament at 180°C. The following temperature programming was applied: from 40°C for 2

minutes to 120°C at 10°C/min. Nitrogen was used as carrier gas at 15 mL/min and as reference gas at 14.5 mL/min. For GC/MS, injector was set at 270°C (split ratio 1/10), ion source at 150°C and transfer line at 170°C, ionization mode was electronic impact (70 eV). The following temperature program was applied: from 35°C for 5 minutes to 280°C at 10°C/min. Helium was used as carrier gas at 0.8 mL/min in constant flow mode. Limit of quantification (LQ) have been established by considering 10 times the signal to noise ratio for each standard. When standard was not available, LQ of the closest compound was considered (i.e.: LQ for C3 compounds was set as propane LQ, LQ of toluene was set as benzene LQ).

Table S1: Internal mass calibration ions for LDI FTICR MS data

| Calibrant | <i>m/z</i> | Calibrant | <i>m/z</i> | Calibrant | <i>m/z</i> |
|-------------------------------------|-------------------|-------------------------------------|-------------------|-------------------------------------|-------------------|
| C₁₄H₁₀ | 178.077702 | C₃₀H₁₄ | 374.109002 | C₅₄H₂₀ | 668.155952 |
| C₁₄H₁₁ | 179.085527 | C₃₁H₁₅ | 387.116827 | C₅₅H₂₁ | 681.163777 |
| C₁₆H₁₀ | 202.077702 | C₃₃H₁₅ | 411.116827 | C₅₆H₂₀ | 692.155952 |
| C₁₆H₁₁ | 203.085527 | C₃₄H₁₆ | 424.124652 | C₅₇H₂₁ | 705.163777 |
| C₁₇H₁₁ | 215.085527 | C₃₅H₁₅ | 435.116827 | C₅₈H₂₀ | 716.155952 |
| C₁₈H₁₂ | 228.093352 | C₃₆H₁₆ | 448.124652 | C₅₉H₂₁ | 729.163777 |
| C₁₈H₁₃ | 229.101177 | C₃₇H₁₅ | 459.116827 | C₆₀H₂₂ | 742.171602 |
| C₁₉H₁₁ | 239.085527 | C₃₈H₁₆ | 472.124652 | C₆₁H₂₁ | 753.163777 |
| C₂₀H₁₂ | 252.093352 | C₃₉H₁₇ | 485.132477 | C₆₂H₂₂ | 766.171602 |
| C₂₀H₁₃ | 253.101177 | C₄₀H₁₆ | 496.124652 | C₆₃H₂₃ | 779.179427 |
| C₂₁H₁₁ | 263.085527 | C₄₁H₁₇ | 509.132477 | C₆₄H₂₂ | 790.171602 |
| C₂₂H₁₂ | 276.093352 | C₄₂H₁₈ | 522.140302 | C₆₅H₂₃ | 803.179427 |
| C₂₂H₁₃ | 277.101177 | C₄₃H₁₇ | 533.132477 | C₆₆H₂₂ | 814.171602 |
| C₂₂H₁₄ | 278.109002 | C₄₄H₁₈ | 546.140302 | C₆₇H₂₃ | 827.179427 |
| C₂₂H₁₅ | 279.116827 | C₄₅H₁₇ | 557.132477 | C₆₈H₂₄ | 840.187252 |
| C₂₃H₁₃ | 289.101177 | C₄₆H₁₈ | 570.140302 | C₆₉H₂₃ | 851.179427 |
| C₂₄H₁₂ | 300.093352 | C₄₇H₁₉ | 583.148127 | C₇₀H₂₄ | 864.187252 |
| C₂₅H₁₃ | 313.101177 | C₄₈H₁₈ | 594.140302 | C₇₁H₂₃ | 875.179427 |
| C₂₆H₁₄ | 326.109002 | C₄₉H₁₉ | 607.148127 | C₇₂H₂₄ | 888.187252 |
| C₂₇H₁₃ | 337.101177 | C₅₁H₁₉ | 631.148127 | C₇₃H₂₅ | 901.195077 |
| C₂₈H₁₄ | 350.109002 | C₅₂H₂₀ | 644.155952 | | |
| C₂₉H₁₄ | 362.109002 | C₅₃H₁₉ | 655.148127 | | |

Table S2. Primers used for real-time quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR)

| Gene | Primers | Sequences (5'-3') |
|---------------|---------|---------------------------------|
| <i>Nrf2</i> | Forward | AGG-TTG-CCC-ACA-TTC-CCA-AA |
| | Reverse | ACG-TAG-CCG-AAG-AAA-CCT-CA |
| <i>NQO1</i> | Forward | GTC-ATT-CTC-TGG-CCA-ATT-CAG-AGT |
| | Reverse | TTC-CAG-GAT-TTG-AAT-TCG-GG |
| <i>HO1</i> | Forward | TTC-TCC-GGG-TCC-TTA-CAC |
| | Reverse | GGC-ATA-AAG-CCC-TAC-AGC-ACC-T |
| CuZnSOD | Forward | GGG-CAA-TGT-GAC-TGC-TGA-C |
| | Reverse | ACA-AGC-CAA-ACG-ACT-TCC-AG |
| MnSOD | Forward | CCT-GGA-ACC-TCA-CAT-CAA-CG |
| | Reverse | CCA-ACG-CCT-CCT-GGT-ACT-TC |
| Catalase | Forward | GCC-TTT-GGC-TAC-TTT-GAG-GTC |
| | Reverse | GAG-AAC-CGA-ACT-GCG-ATG-G |
| <i>IL-8</i> | Forward | AAG-AAA-CCA-CCG-GAA-GGA-AC |
| | Reverse | AAA-TTT-GGG-GTG-GAA-AGG-TT |
| <i>IL-6</i> | Forward | ACC-CCT-GAC-CCA-ACC-ACA-AAT |
| | Reverse | AGC-TGC-GCA-GAA-TGA-GAT-GAG-TT |
| <i>CYP1B1</i> | Forward | GGA-ATT-GAC-GCC-ACT-CAC-CG |
| | Reverse | GGA-GCG-CTT-GGA-TTG-GGA-TG |
| <i>CYP1A1</i> | Forward | CCA-CAG-CAC-AAC-AAG-AGA-CAC |
| | Reverse | GAG-AAA-CCG-TTC-AGG-TAG-GAA |
| <i>B2M</i> | Forward | GCA-TCA-TGG-AGG-TTT-GAA-GAT-G |
| | Reverse | TAA-GTT-GCC-AGC-CCT-CCT-AGA-G |

Table S3: Cata-condensed and peri-condensed PAH equation curve

| Cata-condensed PAH | | | Peri-condensed PAH | | |
|------------------------------|----|-----|-----------------------------------|----|------|
| C | H | DBE | C | H | DBE |
| 6 | 6 | 4 | 10 | 8 | 7 |
| 18 | 12 | 13 | 20 | 11 | 15.5 |
| 30 | 18 | 22 | 30 | 13 | 24.5 |
| 46 | 26 | 34 | 40 | 15 | 33.5 |
| 62 | 34 | 46 | 50 | 17 | 42.5 |
| 78 | 42 | 58 | 60 | 19 | 51.5 |
| 86 | 46 | 64 | 70 | 20 | 61 |
| 90 | 48 | 67 | 80 | 22 | 70 |
| 102 | 54 | 76 | 90 | 23 | 79.5 |
| Equation: DBE = 0.75*C - 0.5 | | | Equation: DBE = 0.9121*C - 2.7667 | | |

Table S4: Most intense ions with odd number of electron (M^+) observed in the organic aerosol sample

| <i>m/z</i> | Ion Formulas | Mean error (ppm) |
|------------|---------------------------------|------------------|
| 313.10118 | C ₂₅ H ₁₃ | -0.00 ±0.005 |
| 337.10118 | C ₂₇ H ₁₃ | 0.009±0.006 |
| 374.109 | C ₃₀ H ₁₄ | -0.035±0.011 |
| 387.11683 | C ₃₁ H ₁₅ | 0.062±0.008 |
| 411.11683 | C ₃₃ H ₁₅ | 0.013±0.007 |
| 435.11683 | C ₃₅ H ₁₅ | 0.003±0.008 |
| 472.12465 | C ₃₈ H ₁₆ | 0.008±0.007 |
| 485.13248 | C ₃₉ H ₁₇ | 0.010±0.008 |
| 509.13248 | C ₄₁ H ₁₇ | 0.006±0.006 |
| 557.13248 | C ₄₅ H ₁₇ | 0.018±0.006 |

Table S5: Estimated concentrations for the compounds detected on the gas phase, sampled with and without filter, and corresponding LQ. (/ : not detected)

| | Compounds | Molar % (with filter) | Molar % (without filter) | LQ (%) |
|---------------------------------------|---|-----------------------|--------------------------|---------|
| TCD | Dihydrogene H ₂ | 0.043 | 0.042 | 0.01 |
| | Methane CH ₄ | 0.022 | 0.022 | 0.049 |
| MS | Carbon dioxide CO ₂ | 0.5996 | 0.6444 | 0.002 |
| | Ethylene C ₂ H ₄ | 0.0083 | 0.012 | 0.0005 |
| | Acetylene C ₂ H ₂ | 0.018 | 0.0274 | 0.002 |
| | Ethane C ₂ H ₆ | / | / | 0.0007 |
| | Propene C ₃ H ₆ | 0.0002 | 0.0003 | 0.0005 |
| | Propane C ₃ H ₈ | 0.0001 | 0.0001 | 0.0006 |
| | Propadiene C ₃ H ₄ | 0.0002 | 0.0006 | 0.0006 |
| | Propyne C ₃ H ₄ | 0.0006 | 0.0007 | 0.0006 |
| | Actaldehyde C ₂ H ₄ O | / | / | 0.0006 |
| | Isobutene C ₄ H ₈ | / | / | 0.0006 |
| | 1-buten-3-yne C ₄ H ₄ | 0.0005 | 0.0005 | 0.0006 |
| | 1,3 butadiene C ₄ H ₆ | / | / | 0.0006 |
| | 1,3 butadiyne C ₄ H ₂ | 0.0004 | 0.0005 | 0.0006 |
| | Cyclopentadiene C ₅ H ₆ | / | / | 0.0006 |
| | Benzene C ₆ H ₆ | / | 0.000002 | 0.00002 |
| Toluene C ₇ H ₈ | / | / | 0.00002 | |

Figure S1: Experimental setup

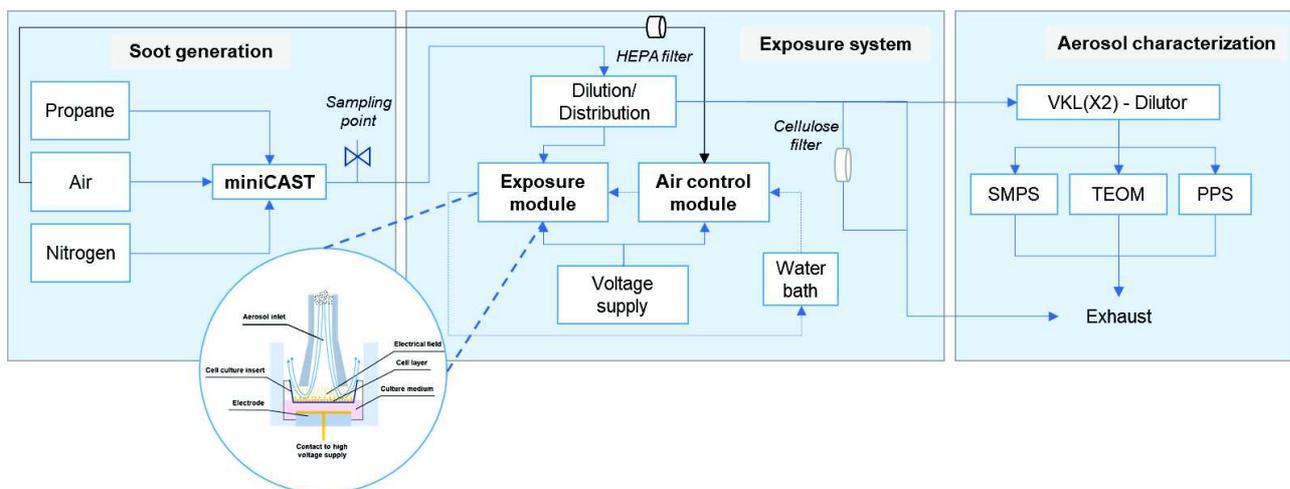


Figure S2: Venn diagram from LDI FTICR MS experiment of CAST sample

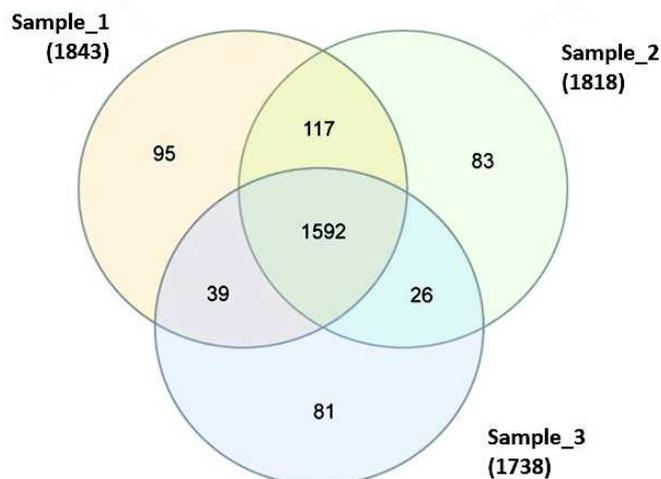
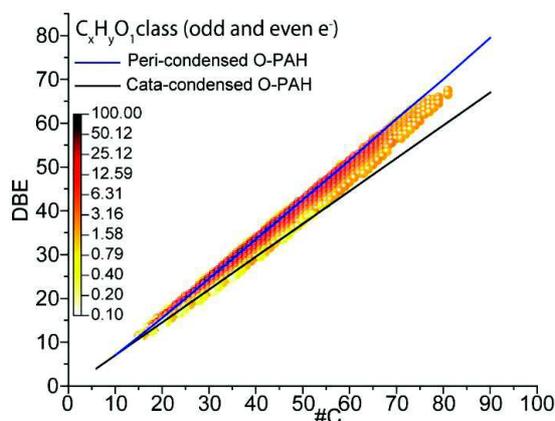


Figure S3: DBE vs #C diagrams of LDI FTICR MS data from CAST sample for C_xH_yO_z ions with odd and even number of electrons.



The colors indicate the relative intensity of the ions. The lower black line represents the expected trend of cata-condensed O-PAH and the upper blue line represents the expected trend of peri-condensed O-PAH

Article n° 3

Ultrafine particles issued from oil fuels and second-generation biofuels combustion: a comparative study of the physico-chemical and *in vitro* toxicological characteristics.

Ana Teresa Juarez Facio, Tiphaine Rogez, Clémence Meausoone, Mélanie Mignot, Christine Devouge-Boyer, Clément Castilla, Hélène Lavanant, Carlos Afonso, Christophe Morin², Nadine Merlet-Machour, Cathy Logie, Laurence Chevalier, François-Xavier Ouf, Jean-Marie Vaugeois, Jérôme Yon, Cécile Corbière, Christelle Monteil

Cet article est en préparation

Contexte

Les émissions des PM associées au trafic routier constituent un problème sanitaire important notamment dans les zones urbaines. Par ailleurs, les émissions diesel ont été classées comme cancérogènes (groupe 1) et les émissions essence comme cancérogène possible (groupe 2b) par le Centre International de Recherche sur le Rancer (CIRC). A l'heure actuelle, les transports dépendent principalement du pétrole mais leur approvisionnement est limité étant une ressource non renouvelable. C'est pourquoi, des alternatives comme les biocarburants sont nécessaires. Parmi les biocarburants, les biocarburants de deuxième génération (B2G) qui n'entrent pas en concurrence avec les usages alimentaires, représentent une option intéressante. Cependant, il existe très peu d'études s'intéressant aux effets des produits de combustion de ces nouveaux carburants. L'objectif de cette étude a été de comparer les caractéristiques physico-chimiques et toxicologiques des émissions des émissions de PF et PUF issues de la combustion d'un carburant fossile et d'un B2G sur le modèle épithélial bronchique BEAS-2B.

Principaux résultats

La génération des émissions de différents carburants a été assurée par le miniCAST adapté pour des carburants liquides. Le point de fonctionnement propane CAST1 a été utilisé comme point de référence en raison des caractéristiques proches des émissions d'essence. Concernant le carburant fossile, nous avons utilisé un substitut d'essence (surrogate) et pour le B2G, un additif permettant de modéliser le B2G, l'anisole, ajouté

dans le surrogate. Ainsi, nous avons étudié 3 aérosols du point de vue microphysique, chimique et toxicologique. Les aérosols étudiés présentent des teneurs en composés organiques proches ($OC/TC_{CAST1} : 4.1 \pm 3.5 \%$, $OC/TC_{Surrogate} : 3,5 \pm 0.4 \%$, $OC/TC_{B2G} : 5 \pm 0.6\%$). L'analyse des particules par GC-MS montre la présence de composés majoritaires comme l'acénaphthylène (B2G > surrogate > CAST1), le phénanthrène (surrogate > B2G > CAST1), le fluoranthène (Surrogate > CAST1 > B2G), le pyrène (surrogate > CAST1 > B2G). La phase gazeuse du CAST1 présente seulement du dioxyde de carbone et du propane, retrouvé aussi dans les émissions du surrogate et du B2G en plus du dihydrogène, de l'acétylène, et du méthane entre autres, à de très faibles concentrations (<1%). Concernant l'étude toxicologique, le modèle BEAS-2B été exposé à la même dose d'exposition aux 3 aérosols étudiés, soit une dose estimée de 330 ng/cm². Notre étude montre que la dose utilisée n'altère pas la viabilité cellulaire (<20%), cependant, les niveaux d'ATP sont altérés par le surrogate. L'expression génique des marqueurs du stress oxydant, de l'inflammation et du métabolisme de xénobiotiques est altérée principalement par les émissions de surrogate et du B2G aux deux temps d'exposition.

Conclusion

Dans l'ensemble, les résultats décrits dans ce travail ont confirmé que la PF et les PFU sont potentiellement nocifs pour la santé humaine. La petite taille et la teneur en matières organiques peuvent être le principal responsable de ces effets néfastes. Les aérosols générés ont induit des modifications dans les marqueurs biologiques étudiés. Ainsi, l'exposition à des niveaux élevés de PF et PUF émises par le trafic devrait être évitée. Bien que plusieurs mesures aient été mises en œuvre pour réduire la pollution particulaire, il y a encore beaucoup de travail à réaliser dans le domaine de la qualité de l'air.

Ultrafine particles issued from oil fuels and second-generation biofuels combustion: a comparative study of the physico-chemical and *in vitro* toxicological characteristics

Ana Teresa Juarez Facio¹, Tiphaine Rogez¹, Clémence Meausoone¹, Mélanie Mignot², Christine Devouge-Boyer², Clément Castilla², Hélène Lavanant², Carlos Afonso², Christophe Morin², Nadine Merlet-Machour², Cathy Logie, Laurence Chevalier³, François-Xavier Ouf⁴, Jean-Marie Vaugeois¹, Jérôme Yon⁵, Cécile Corbière¹, Christelle Monteil^{1*}

¹ Normandie Univ, UNIROUEN, UNICAEN ABTE, 76000 Rouen, France

² Normandie Univ, UNIROUEN, INSA Rouen, CNRS, COBRA, 76000 Rouen, France

³ Normandie Univ, UNIROUEN, INSA Rouen, CNRS, GPM-UMR6634, 76000 Rouen, France

⁴ Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire, PSN-RES, SCA, LPMA, Gif-sur-Yvette, France

⁵ Normandie Univ, UNIROUEN, INSA Rouen, CNRS, CORIA, 76000 Rouen, France.

* **Corresponding author:** C. Monteil

ABTE-ToxEMAC,

UFR Santé, 22 boulevard Gambetta, 76000 ROUEN

+33235148475

E-mail: christelle.monteil@univ-rouen.fr

Keys words: *In vitro*, Beas-2b, biofuels exhaust, fine particles, ultrafine particles, Air-liquid interface exposure

1. INTRODUCTION

Epidemiological and experimental studies have reported compelling evidence that pollution by airborne particulate matter (PM) is an important cause of health outcomes associated to respiratory and cardiovascular diseases as well as cancer mortalities (Chen et al., 2016; Pope et al., 1995; Rizza et al., 2019; Schraufnagel, 2020). In urban areas, the traffic sector is a major contributor of PM emissions as well as pollutants including carbon monoxide (CO) volatile organic compounds (VOCs), nitrogen oxides (NO_x), polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and PM (Kwon et al., 2020; Lin et al., 2019). Moreover, diesel exhaust has been classified as carcinogenic (Group 1) and gasoline exhaust as possibly carcinogenic (Group 2B) to humans by the International Agency of Research of Cancer (IARC) (IARC, 2013). Today's transports depend principally on fossil fuels and alternatives are needed against increasing stringent emission regulations, rising oil prices and finite supply of fossil fuels. Biofuels of second generation (B2G) represent a promising choice for partial replacements of fossil fuels since lignocellulosic biomass are used as feedstocks (Wu et al., 2017). Scientific literature highlights the importance of physicochemical characteristics of combustion emissions on biological and toxicological effects (Kwon et al., 2020). For example, particulate emissions from combustion of B2G can globally decrease (Zhang and Balasubramanian, 2014) but some studies also reported the formation of more complex compounds that could lead to greater health effects (Kohse-Höinghaus et al., 2010) probably linked to a higher oxidative potential of particles (Adenuga et al., 2016).

Oxidative potential (OP) measurement may be used to evaluate toxicity of particles. The OP can be defined as PM capacity to oxidize target molecules and induce formation of oxidizing species in the lung (Øvrevik, 2019). This evaluation may be carried out by acellular methods, as DTT assay (OP^{DTT}) or antioxidant depletion assay (OP^{AO}), which are simpler and quicker to achieve than cellular assays. Moreover, studies have established a link between OP and biological responses to particles exposure, which makes it a toxicological relevant metric (Bates et al., 2019; Crobeddu et al., 2017; Jaramillo et al., 2018). Besides chemical composition, the size is also an important factor to consider on PM assessment. Fine particles (FP) and ultrafine particles (UFPs) had attracted more attention, as they can enter deeper in the respiratory tract (Oberdörster et al., 2005), where they can trigger certain cellular pathways involved in oxidative stress and inflammation, both mechanisms implicated in PM adverse health effects (Araujo and Nel, 2009; Baulig et al., 2003; Leikauf et al., 2020; Øvrevik et al., 2015).

UFPs are also associated to lower mass concentrations compared to coarser fraction, they are also more numerous and have a higher specific area, which may significantly impact their consequences in human health (Kumar et al., 2013; Schraufnagel, 2020).

The biological and health effects of traffic emissions, from diesel and gasoline engines, have been extensively studied *in vitro*. Nevertheless, there are very few studies concerning new fuels emissions. In most of these studies, particles suspensions were used in submerged cells cultures (Frias et al., 2020; Malorni et al., 2017; Seriani et al., 2016; Shin et al., 2017); hence, new approaches to evaluate health effects from particles, and especially UFPs, are needed to support biofuels development. Then, the objective of the present study was to assess cellular responses after exposure to FP and UFPs emissions from oil fuels and B2G combustion. We evaluated the responses of bronchial epithelial BEAS-2B cells following exposure at ALI to three types of aerosols: CAST1 the aerosol reference in this study, surrogate gasoline fuel and surrogate biofuel (S+A). Cytotoxicity and biological markers associated with oxidative stress, inflammation and xenobiotic metabolism were assessed 3 h and 24 h after exposure. This approach will lead us to investigate the influence of the physicochemical composition, on the response patterns after emission exposure.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Chemicals

Unless otherwise specified, chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (St Quentin Fallavier, France).

2.2 Exposure system and operating conditions

The exposure system used have been previously described (Juarez-Facio et al., 2021a). In this study, the miniCAST soot generator, initially designed for gas fuels, was modified to burn both propane or liquid fuels (Figure S1). In gas mode, a propane flow is mixed with nitrogen and oxidation air flows to produce a stable flame, while in liquid mode, a syringe pump and an evaporator (CEM-W-102A) replace the propane flow. Syringe pump allows to control fuel flow towards the evaporator which atomize, evaporate, and transport fuel vapors through a nitrogen flow. In this studied, miniCAST soot generator was used with propane (CAST1 condition) or with liquid fuels consisting in a surrogate gasoline fuel and a surrogate B2G fuel. Surrogate gasoline fuel (S) consisted in hexane (24.31 wt%), 2,3-dimethyl-2-butene (8.15 wt%), cyclohexane (14.21 wt%), isooctane (17.75 wt%), and toluene 35.58 wt%). To model B2G, a mixture of surrogate gasoline fuel and anisole (10 v%) was used (S+10A). Table 1 shows the flow rate of the operating conditions in this study.

Table 1. Flow rates of the operating conditions studied

| | CAST1 | Surrogate | S+10A |
|-----------------------|-------|-----------|-------|
| Propane (mL/min) | 60 | 0 | 0 |
| Liquid fuel (mL/min) | 0 | 0.3 | 0.3 |
| Nitrogen (mL/min) | 7 | 7 | 7 |
| Oxidation air (L/min) | 1.5 | 1.52 | 1.46 |
| Dilution air (L/min) | 20 | 20 | 20 |

Aerosols from the miniCAST were diluted at 50 mg/m³ by the dilution column before being delivered to cells through the Vitrocell® exposure system. By this way, the same dose exposure was expected for each aerosol.

2.3 Characteristics of aerosols emission

The methods to analyze particle and gaseous phase are the same as described in previous works (Juarez-Facio et al., 2021b). Briefly, for gaseous emissions measurements samples were collected in Tedlar bags then analyzed by gas chromatography with thermoconductivity detection (GC/TCD) and gas chromatography coupled to a mass spectrometer (GC/MS). Quartz and cellulose filters containing particulate matter were used for not-targeted and targeted analysis in addition to measure of OC/TC. Not-targeted analysis were performed using direct insertion

probe with atmospheric pressure chemical ionization source (DIP APCI) coupled to ultra-high resolution mass spectrometry (FTICR MS), and targeted analysis by GC-MS/MS. Number and particle size distributions were measured with a Scanning Mobility Particle Sizer (SMPS), mass concentration was determined by Tapered Element Oscillating Microbalance (TEOM) measures. Soot particles were deposited onto several grids and observed using transmission electron microscopy. Soot images were analyzed following the method proposed by Bescond et al. 2014, to determine primary particle size (Bescond et al., 2014).

2.4 Oxidative potential

2.4.1 Particle suspension preparation

Particles were collected from cellulose filters positioned next to dilution column. Particles were suspended in ultrapure water at a concentration of 500 µg/mL and sonicated during 60 min at 40 kHz. Diesel particles were used as positive control for oxidative potential measures. Then, particle suspensions were aliquoted and stored at -20 °C.

2.4.2 Dithiothreitol (DTT) assay

The Dithiothreitol assay monitors the oxidation of DTT, a reducing agent, in presence of particles. It is one of the most common acellular assays used to evaluate the intrinsic oxidative potential of PM (Cho et al., 2018). First, particles were incubated, in a 96-well plate, with 1 mM DTT (Sigma) at 37°C. Nine concentrations of particles were tested from 0.56 to 280 µg/mL. After 1 hour of incubation, plate was centrifuged at 2100 g and 4 °C for 15 min. Then, 50 µL of supernatants were recovered and added to an equal volume of 5,5'-dithiobis-(2-nitro benzoic acid) (DTNB) (2.5 mM) (Sigma). Then, remaining reduced DTT reacted with DTNB to produce 2-Nitro-5-thiobenzoic acid (NTB), a yellow product which absorbs at 412 nm. The absorbance was measured with a plate reader (Safas Xenius, Monaco). Percentage of depletion was calculated according to the following equation:

$$\%DTT \text{ depletion} = 100 - (DTT \text{ concentration in the sample} / DTT \text{ concentration in the blank}) \times 100$$

2.4.3 Antioxidants (AO) depletion measurement

This second acellular assay measures the depletion of two antioxidants, ascorbic acid (AA) and glutathione (GSH), as well as the oxidized glutathione production, GSSG. Briefly, a range of particles concentration from 0.56 to 280 µg/mL, was prepared in a synthetic respiratory tract lining fluid (RTLFL) containing 0.9 % NaCl at pH 7.4, AA (200 µM - Sigma) and GSH (200 µM - Sigma). Solutions were incubated for 4 h at 37 °C, then centrifuged for 10 min at 15000 rpm and 4°C. An aliquot of each supernatant was diluted 1:5 in mobile phase (Potassium hydrogen phosphate, 10 mM, pH 3 - Sigma). Solutions were filtered before the injection with a Nylon 0.45 µM syringue filters (Cloup, France). Finally, samples were injected into an Agilent High Pressure Liquid Chromatography system 1260 Infinity II equipped with DAD detector (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). The chromatography was equipped with a Poroshell 120 EC-C18 (3 x 150 mm, 2.7 µm) with guard EC-C18 (3mm) maintained at 25°C. The flow rate of mobile phase (100%) was 0.6 mL/min. UV data was collected at 220 nm. This method was validated to meet the ICH requirements. Percentage of AO depletion and GSSG production was respectively calculated according to:

$$\% AO \text{ depletion} = 100 - (AO \text{ concentration in the sample} / AO \text{ concentration in blank}) \times 100$$

$$\% GSSG \text{ production} = 100 + (GSSG \text{ concentration in the sample} / GSSG \text{ concentration in blank}) \times 100$$

Cell culture and exposures

The bronchial epithelial BEAS-2B cell line (ATCC – CRL9609™) was cultivated in LHC-9 medium (GIBCO) on collagen coated Transwell™ insert as described by Juarez Facio et al. 2021 (Juarez-Facio et al., 2021b). Culture at liquid-liquid interface was maintained during 10 days before aerosol exposures, which have been performed at air-liquid interface (ALI) under standard airway epithelial cell growth conditions (37°C, 95% humidity, and 5% CO₂). All exposures were performed using BEAS-2B cells between passage 40 and passage 50.

Cells were exposed to diluted fresh aerosols during 35 min with an electrostatic field (+1000 V), while control samples were exposed to ambient HEPA-filtered laboratory air through the Vitrocell System. The response of particle-exposed cells was compared to controls cells, 3 h and 24 h after exposure.

2.6 Biological endpoints

2.6.1 Cytotoxicity

MTT assay is a common method to assess cell viability. Briefly, 3 h and 24 h after exposure, cells were incubated with MTT solution during 3 h, then formazan crystals were dissolved with SDS solution. The absorbance was measured at 570 nm (Xenius, Safas, Monaco) and normalized to the control, which was set to 100%.

2.6.2 ATP/ADP and total glutathione quantification

Cell sample preparation.

ATP and ADP levels, as well as total glutathione (GSH + GSSG) were determined on perchloric extracts. Briefly, after 3 h and 24 h exposure, inserts were gently rinsed with PBS-1X. Then, 500 μ L of perchloric acid (1 N) were added to each insert to harvest cells. The samples were centrifugated at 13500 g for 5 min and at 4 °C. Pellets were resuspended in NaOH (1 N) and used to determine proteins content by Lowry assay. Supernatant was neutralized by addition of K_2CO_3 , then, samples were centrifugated again. Supernatants were stored at -80°C until measurements.

ATP/ADP quantification

ATP and ADP quantifications were performed with Agilent High Pressure Liquid Chromatography system 1260 Infinity II equipped with DAD detector (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Stock solutions of 10 mM ATP (adenosine 5'-triphosphate disodium salt hydrate > 99 % - Sigma), ADP (adenosine 5'-diphosphate sodium salt > 98 % - Sigma) and AMP were prepared by dissolving the appropriate amounts in ultrapure water. The above stock solutions were all stored at -20 °C, the working solutions were prepared daily by appropriate dilution in mobile phase. The mobile phase consisted of 50 mM of potassium hydrogen phosphate (pH 6.80) (Sigma). Analytes were separated on a Poroshell 120 EC-C18 (3 x 150 mm, 2.7 μ m) with guard EC-C18 (3 mm) at 254 nm. The chromatographic separation was carried out at 20° C with 0.6 mL/min as flow rate. The identification of peaks was based on the comparison of retention times and diode-array spectra of chemicals standard and biological samples. Validation of the analytical method was performed by assessment of the linearity, limits of quantification and detection and accuracy to meet the ICH requirements.

Total glutathione quantification

For measurement of total glutathione, 40 μ l of sample, 200 μ l of reagent pad containing NADPH (0.4 mM), DTNB (1 mM) and methanol (10%) in buffer (160 mM NaH_2PO_4 , 8 mM EDTA, pH 7.4) and 40 μ l of glutathione reductase (8.5 U/mL) were deposited in a 96 well plate. Absorbance was measured at 405 nm for 2 min and 40 s. Amounts of total glutathione were determined from a standard curve and results were normalized to proteins content.

2.6.3 qRT-PCR

Total ARN was extracted from cells using TRI-REAGENT® (Sigma-Aldrich) and Direct-zol™ RNA MiniPrep (Ozyme). RNA concentration and purity were measured with a NanoDrop spectrophotometer (NanoDrop™ 2000 / 2000c.). Treatment for DNase was performed with DNase I, Amplification Grade (Invitrogen™). cDNA was prepared by reverse transcribing extracted RNA samples using Invitrogen™ Transcriptase inverse (M-MLV). The expression of mRNA was determined by the quantitative real time polymerase chain reaction (qRT-PCR) using Brilliant III Ultra-fast SYBR Green QPCR Master Mix (Agilent Technologies). Expression profiles of *CYP1B1*, *CYP1A1*, *NQO1*, *HO-1*, *Nrf2*, *IL-8* et *IL-6* were normalized to *B2M*.

2.7 Statistical analysis

Biological endpoints results were expressed as mean \pm SD. Statistical analysis was performed using the non-parametric Mann-Whitney U-test (GraphPad for Windows, v8.0). Statistically significant differences were reported with $p < 0.05$.

3. RESULTS

3.1 Aerosol characterization

Particle and gaseous phase from aerosol emission of different fuels combustion was characterized. Similar amounts of organic compounds were presented (% OC/TC), CAST1: $4.1 \pm 3.5\%$, S: $3.5 \pm 0.4\%$ and S+10A: $5 \pm 0.6\%$. Particle emission was fixed to 50 mg/m^3 to allow a similar deposition in all conditions. Regarding morphology, fractal aggregates, characteristic from soot particles, were produced by all combustion conditions as seen in Fig. 1.

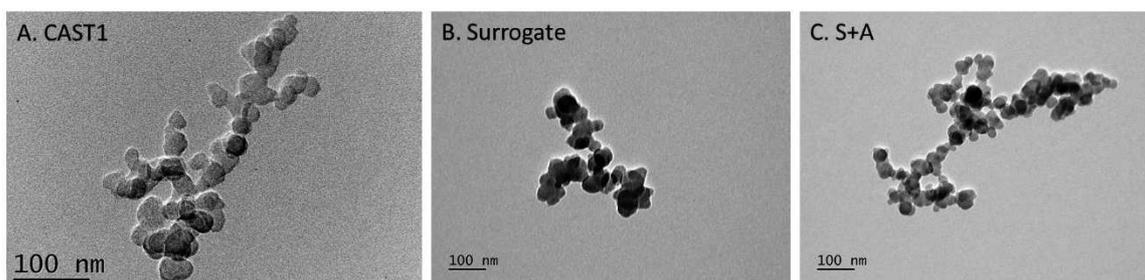


Fig. 1. Morphological characterization of studied particles. Transmission electron microscopy images of particles from (A) CAST1, (B) gasoline surrogate and (C) B2G surrogate (S+A).

Concerning gaseous phase, the estimated concentrations are reported in Table S1. The three working conditions presented different profiles. In CAST1 aerosol, only propane and carbon dioxide were detected. In surrogate and B2G condition, the main compounds were carbon dioxide (0.630% and 0.609 %), dihydrogen (0.034% and 0.35 %), methane (0.027% and 0.28 %), ethylene (0.0159% and 0.018 %) and acetylene (0.0104% and 0.012 %), respectively.

The targeted analysis tested the 16 priority PAH and 5 oxy PAH (Figure S1). With the CAST1 condition, the predominant HAP were acenaphthylene, phenanthrene, fluoranthene and pyrene, as previously published (Juarez-Facio et al., 2021b). These PAH represent around 70% of the total amount. Particles obtained from the S fuel combustion presents quite similar profile for PAH, with a predominance for phenanthrene (23% of the total amount) and acenaphthylene (25% of the total amount). This latter represents more than 80% of the total PAH quantified in particles obtained from the S+10A condition. The oxy-HAP amounts represent 2.8% for S+10A condition, 4.5% for CAST1 and 8% for S.

3.2 Oxidative potential (AO depletion measurement and DTT assay)

Oxidative potential of particles was studied by two acellular assays: dithiothreitol assay (Fig. 2) and antioxidants depletion measurement (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**). For these tests, diesel particles (DEP) were used as positive controls. Nine concentrations of PM were tested: 0.56; 1.4; 2.8; 5.6; 14; 28; 56; 140 and 280 $\mu\text{g/mL}$. The lowest concentration represents the dose exposure of BEAS-2B cells in the exposure conditions. In order to control experiments efficiency, DEP particles were used as positive control. First, a dose dependent of DTT consumption was observed for all tested particles. However, depending on aerosol condition, OP^{DTT} profiles were different. CAST1 particles induce the highest DTT loss rate with approximately 80% loss rate at the highest doses. Concerning surrogate and S+A aerosol, DTT loss rate values at 280 $\mu\text{g/mL}$ were lower, 37.6 and 22.2% respectively. Then, depletion of AA was induced by CAST1 aerosol for all tested concentrations. A lower ascorbic acid oxidation for S and S+A particles was also observed but only at the concentrations from 2.8 $\mu\text{g/mL}$ and 56 $\mu\text{g/mL}$ respectively. Moreover, AA depletion percentage in S+A particles did not exceed 6%. Finally, CAST1 and

surrogate aerosol induced depletion of GSH. Production of GSSG, which correspond to oxidized GSH, was measured only in CAST1 particles. These findings were observed at the two highest concentrations.

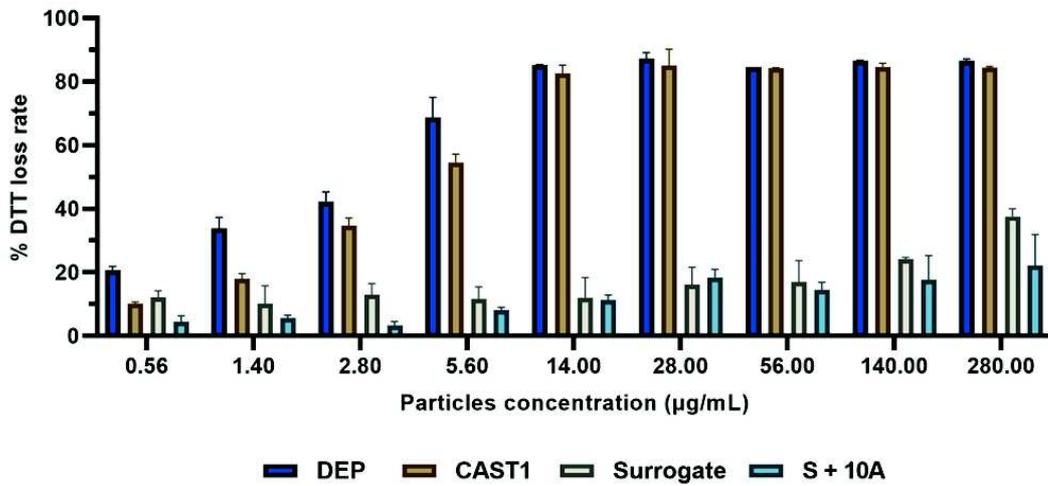


Fig. 2. Oxidative potential of particles from DEP, CAST1, surrogate and S+A by DTT assay

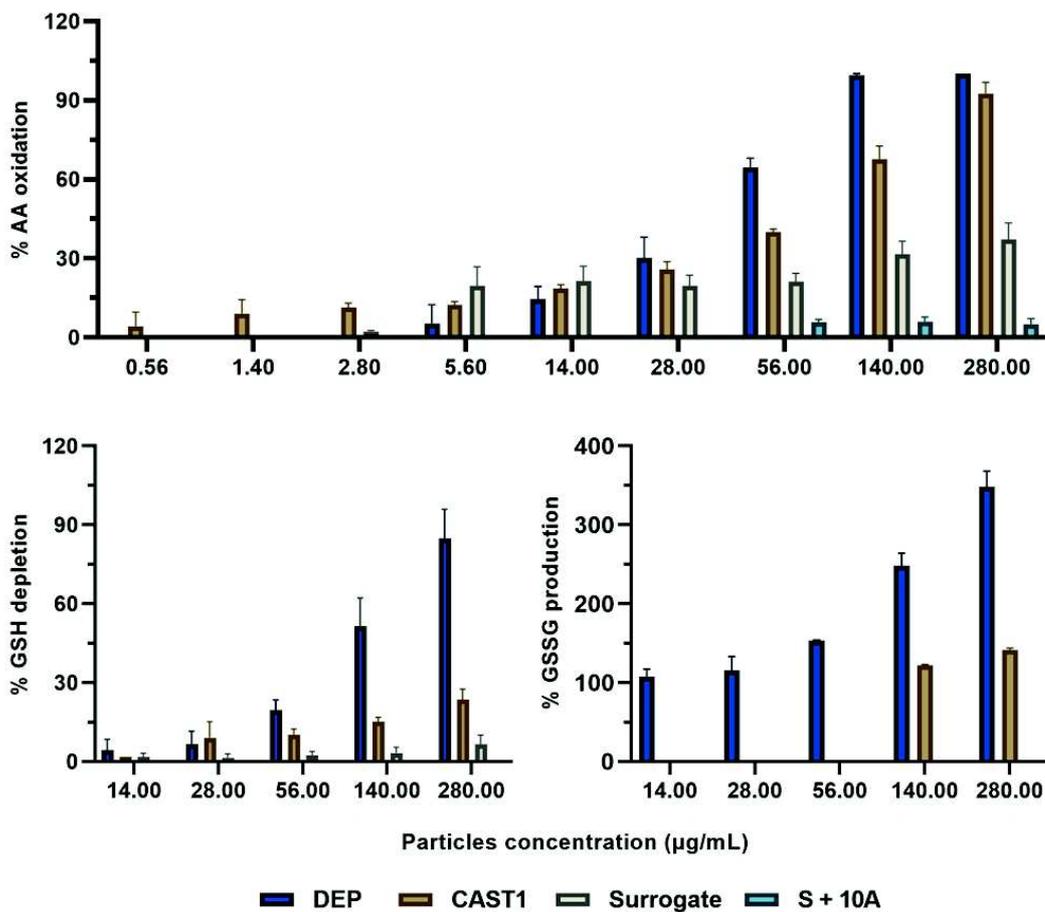


Fig. 3. Oxidative potential of particles from DEP, CAST1, surrogate and S+A characterized by antioxidants depletion measurement

3.3 Cell response after emission exposure

BEAS-2B cells were exposed to CAST1, surrogate and B2G fuel emission to filtered air at ALI. Results from MTT assays presented in Fig. 4 showed no effect on cell viability after exposure to different aerosol emission at any time after exposure.

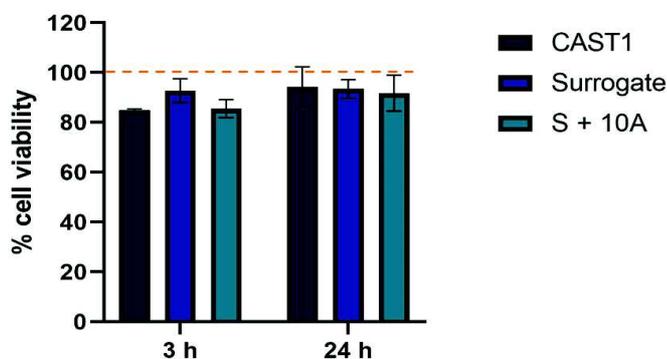


Fig. 4. Cytotoxicity evaluation determined by MTT assays after 3 h and 24 h incubation with studied aerosol emission. Data are expressed as mean \pm SD, n=4-5 independent experiments.

The effects of particle exposures on ATP and ADP levels are shown in Tableau and compared with air-exposed cells (control). Whatever the experimental conditions, the levels of ATP remained stable compared to controls. The only effect observed was after 24 h of exposures to particles generated from the S+10A fuel on the ADP levels. Fig. 5 shows the ATP/ADP ratios normalized with the corresponding control and calculated from the Table 2. Compared to air-exposed cells, the particles generated from S fuel increased this ratio after 3 h and decreased it after 24 h compared to 3 h. After exposure to particles generated from S+10A, this ratio is slight decreased after 3 h.

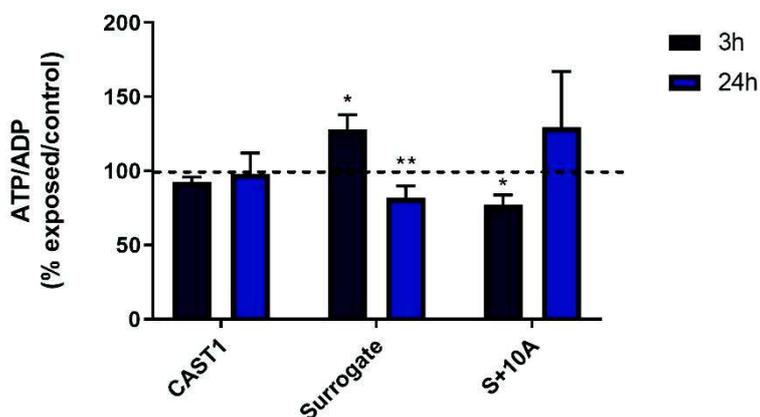


Fig. 5. ATP/ADP ratios (in percentage of air controls) in Beas-2B cells after 3 h or 24 h of exposure to particles or to air. * p<0.05 vs. controls, ** p<0.05. Data are expressed as mean \pm SD, n=4-5 independent experiments

Tableau 2. ATP and ADP levels (nmol/mg proteins) in BEAS-2B cells after 3 h or 24 h of exposure to particles or to air (control)

| | ATP | | ADP | |
|-----------|--------------|--------------|-------------|--------------|
| | 3h | 24h | 3h | 24h |
| Control | 23.60 ± 2.90 | 29.30 ± 6.29 | 2.07 ± 0.46 | 2.02 ± 0.68 |
| CAST 1 | 23.65 ± 2.74 | 23.70 ± 2.94 | 1.79 ± 0.61 | 2.64 ± 1.31 |
| Control | 37.40 ± 2.66 | 38.62 ± 0.99 | 3.10 ± 0.15 | 4.14 ± 0.57 |
| Surrogate | 38.05 ± 1.36 | 37.40 ± 6.60 | 2.49 ± 0.33 | 4.84 ± 0.39 |
| Control | 32.52 ± 5.19 | 31.07 ± 2.04 | 1.87 ± 0.44 | 4.16 ± 0.80 |
| S+10A | 29.65 ± 6.96 | 26.90 ± 4.72 | 2.19 ± 0.42 | 2.89 ± 0.69* |

As MTT assay indicated non-lethal conditions (<20%) and ATP measures showed significant difference only for surrogate aerosol, an additional evaluation to identify the potential biological markers that may be altered by aerosols was performed. Several biological markers were measured in BEAS-2B cell by qRT-PCR after exposure to different aerosol emissions. Results in **Fig. 6** show several up and down-regulations in all markers at both times after exposure compared to air control. First, *NQO1* gene (Figure 6A), an oxidative stress marker was significantly induced by particles generated from the S fuel at 3 h and the S+10A at 24 h. *HO-1* (Figure 6B), was also down-regulated by CAST1 and up-regulated by S and S+10A at 3 h. At 24 h, only surrogate reported a significant induction. Next, inflammation marker *IL-8* (Figure 6C) expression was inhibited by CAST1 and S+10A, while at 24 h the opposite response is observed, which means a significantly up-regulation after exposure to S and S+10A. Then, *IL-6* (Figure 6D) expression was only up-regulated by CAST1 at 24 h. Finally, two markers of xenobiotic metabolism were studied. *CYP1A1* and *CYP1B1* (Figure 6E) showed an up-regulation by both S and S+10A, at 3 and 24 h, whereas CAST1 condition showed a down-regulation for CYP1B1 (0.49 fold).

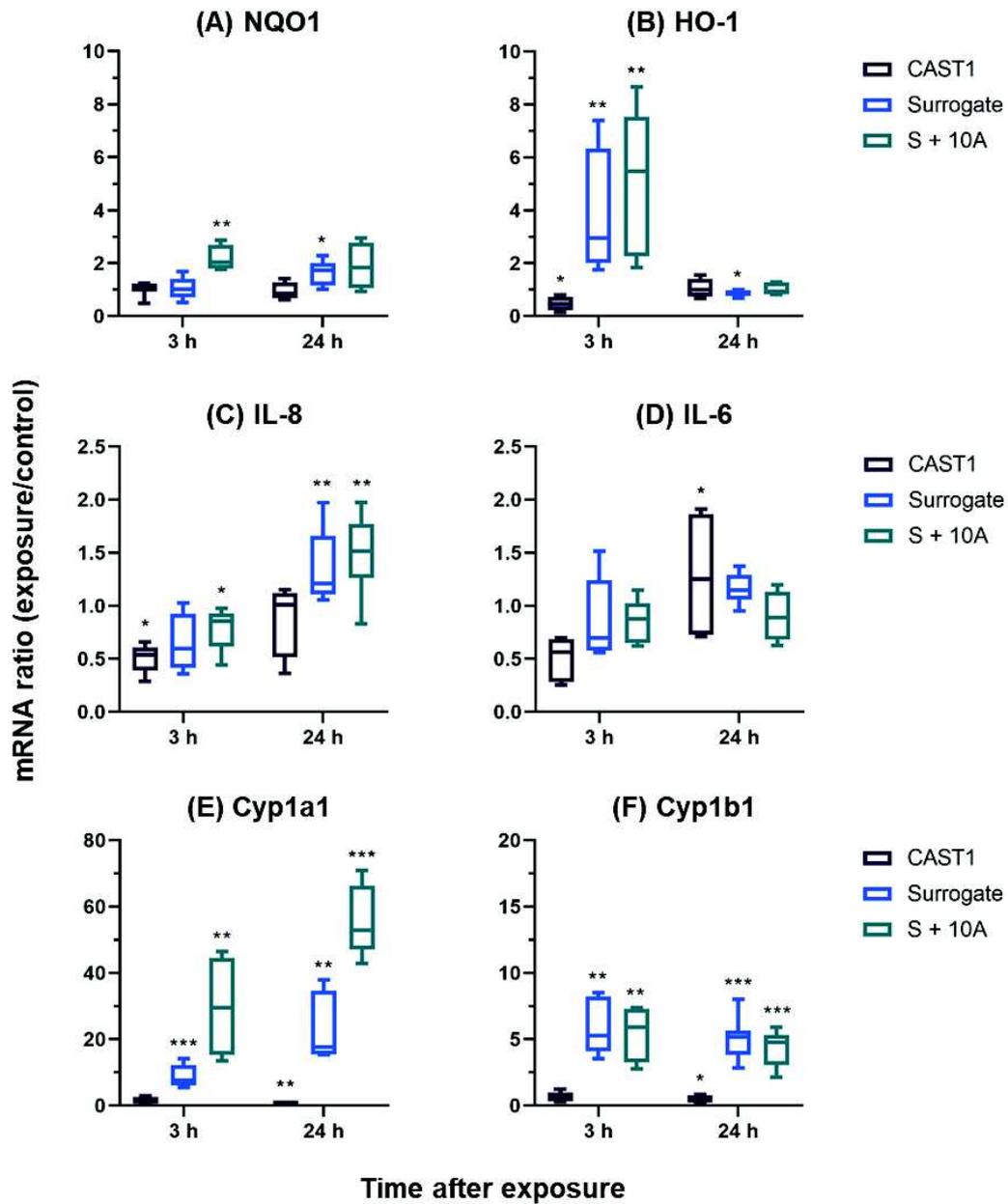


Fig. 6. Gene expression in ALI BEAS-2B cells after 3 h and 24 h exposure to fresh aerosol. (A) and (B): Oxidative stress markers NQO1 and HO-1 transcript production. (C) and (D): Inflammation markers IL-8 and IL-6 transcript production. (E) and (F) Xenobiotic metabolism markers Cyp1a1 and Cyp1b1 transcript production

4. DISCUSSION

The goal of this work was to assess the toxicological impact of different emissions from representative gasoline and B2G fuel combustions. Firstly, emissions were characterized including particulate and gaseous phase. Then, the bronchial epithelial BEAS-2B cells were exposed at similar dose exposure to different emissions and several biological markers were studied.

In “real” conditions, particulate matter from traffic emission is not uniform in terms of size shape and chemical composition. In this study, we used a soot generator and surrogate fuels in order to obtain reproducible aerosol emissions and to compare toxicological responses under controlled conditions. Gasoline comprises of a large chemical species including alkanes, alkenes and aromatic compounds. Moreover, fuel compositions may be variable between petrol stations and depending on the storage conditions. The surrogate gasoline composition was the same as Wu et al. 2017, leading to model a commercial gasoline with the principal chemical families (Wu et al., 2017). For B2G emission, anisole (10 v%) was chosen as additive to the surrogate. Anisole can be used to represent rich phenol species in surrogates during combustion. Indeed, Wagnon et al. 2018. reported that lignocellulosic biomass is transformed on a mixture of rich phenol species (Wagnon et al., 2018). Hence, anisole represents an optimal additive to model B2G. Emissions obtained from miniCAST using these fuel surrogates were compared with CAST1 condition allowing particles emissions with properties similar to those of road traffic, as previously described (Bescond et al., 2014; Juarez-Facio et al., 2021a).

We evaluated the PM oxidative potential (OP), generated by the miniCAST used with the same operating conditions and these different fuel surrogates. We clearly observed the greatest response with the CAST1 condition despite the fact that this condition does not generate particles with high organic compound levels and free of metals, given our experimental conditions. The differences observed with CAST1 and the other conditions cannot be explained by the organic levels since the OC/TC ratio were comparable between the conditions, whereas other studies suggested a link between chemical composition and OP. For example, the DTT assay is a colorimetric analysis in which DTT loss rate is linked proportionally to the redox active organic concentration in PM (Lin and Yu, 2019), or to metal sources and heavy fuel oil combustion (Moufarrej et al., 2020). Another useful method to evaluate OP is the assessment of antioxidants (AO) depletion (OP^{AA}), such as ascorbic acid (AA) and reduced glutathione (GSH) present in the respiratory tract lining fluid, which may be simulated with a synthetic lung fluid (Calas et al., 2017). Previous studies demonstrated a link between OP^{AA} and PAH at the traffic site or potassium with domestic wood burning samples (Crobeddu et al., 2020). This test was also demonstrated as the best to show strong correlations with cellular responses as intracellular EROs productions and alterations of gene expression such as proinflammatory response (Interleukin 6) as well as anti-oxidant genes (superoxide dismutase 2, heme-oxygenase-1) (Crobeddu et al., 2017). As discussed below, CAST1 condition did not allow obtaining the greatest biological responses compared to results obtained with the other experimental particles (S and S+A). This apparent discrepancy is probably due to the cell exposure concentrations, which are below of those depleting DTT or AA.

As inhaled FP and UFPs deposition occurs principally at bronchial level, the bronchial epithelial BEAS-2B cells were chosen in this work. Moreover, cells were cultured in transwell inserts and exposed at ALI, which is a representative approach to study inhaled aerosols. In this work, the dose exposure is expected to be the same for every studied aerosol. The estimated dose was 330 ng/cm² which combined with the exposure system depicted “real” dose exposure. Concerning biological endpoints, first cell viability was assessed through tetrazolium reduction assay, in which MTT is reduced to formazan, a purple colored product produced by viable cells with active metabolism (Van Meerloo et al., 2011). Here, MTT assay was reported <20%, then exposure conditions do not affect cell viability. Studies performed in similar conditions used lactate dehydrogenase release as indicator of cytotoxicity, the loss of membrane integrity during cell injury and death causes extracellular release of this enzyme (Kumar et al., 2018). Low doses exposures such as used in this work do not disrupt cell viability, even though biological markers may be modified (Hawley et al., 2014a, 2014b). This is in accordance with the ATP and ADP results, which were slightly altered in both S or S+10A conditions. Although these effects on energetic metabolism were modest, it can be assumed that this could have cellular consequences if exposures were prolonged or repeated. Indeed, reduction of ATP has effects on many essential cellular systems such as motor protein functions including ciliary motility and intracellular transport. Recent studies have shown that alveolar/endothelial barrier function, tightly regulated by intracellular ATP (Cavanaugh et al., 2001), may be disrupted by airborne particles. Jin et al

have also showed an alteration of ATP production and energy metabolism in the lungs of rats after sub-chronic PM_{2.5} exposures (Jin et al., 2019). These observations outline the usefulness of ATP assessments as an indicative biomarker of PM exposures.

Regarding the effects on oxidative stress, our results performed on glutathione (results not shown) or on *NQO1* and *HO-1* gene expression, did not show an important oxidative response. *NQO1* reported a slight up-regulation by the S+10A condition at 3 h and by surrogate at 24 h. Concerning *HO-1*, surrogate and B2G induced an important up-regulation 3 h after exposure and after 24 h, expression was restored to normal values. *NQO1* is induced by *Nrf2* and exerts cytoprotective, antioxidant and anti-inflammatory effects in the lungs (Rubio et al., 2011) against particles, which lead to its induction (Frias et al., 2020; Yuan et al., 2019). Inflammation response and more specifically *IL-8* and *IL-6* gene expression, were also studied by qRT-PCR. *IL-8* was slightly down-regulated at 3 h but the opposite response was observed at 24 h. *IL-6* showed similar results. Studies on PFs and UFPs mostly reported induction of inflammation genes (Bengalli et al., 2019, 2017; Grilli et al., 2018; Rynning et al., 2018; Tian et al., 2019) but most of these studies are carried out for long time exposures (> 24 h). Our results suggest that a down-regulation of *IL-8* and *IL-6* may be associated to an early time response. In addition, immunosuppressive effects have been seen to be related to PAHs content (Ahmed et al., 2020). The xenobiotic metabolism was also considerably disturbed. *CYP1A1* and *CYP1B1* genes were highly up-regulated by surrogate and B2G at both time conditions. These two enzymes of cytochrome P450 (CYP) may be induced by PAHs presented in particles. According to the above-reported results, *CAST1* does not display an important impact in gene expression of studied markers while surrogate and B2G do. The response was observed at both time conditions but mainly 3 h after exposure.

5. CONCLUSION

Overall, the findings of this work showed different combustion soot-induced toxicological response profiles, dependent of fuels, by using controlled and reproducible conditions. This approach represents a useful way to test novel carburant and could be appropriate to test B2G prior to commercialization. Although several measures have been implemented to reduce particle pollution, there is still a lot of work in the field of air quality.

6. ACKNOWLEDGEMENTS

This publication was supported by ANSES (French Agency for Food, Environmental and Occupational Health and Safety; PUFbio project, Grant number EST-2017-190) and co-supported by the Regional Council of Normandy and the European Union in the framework of the ERDF-ESF (CellSTEM project). Ana Teresa Juarez-Facio received a PhD fellowship funded by ADEME (Agency for Ecological Transition).

Supplementary data

Figure S1. Aerosol exposure system

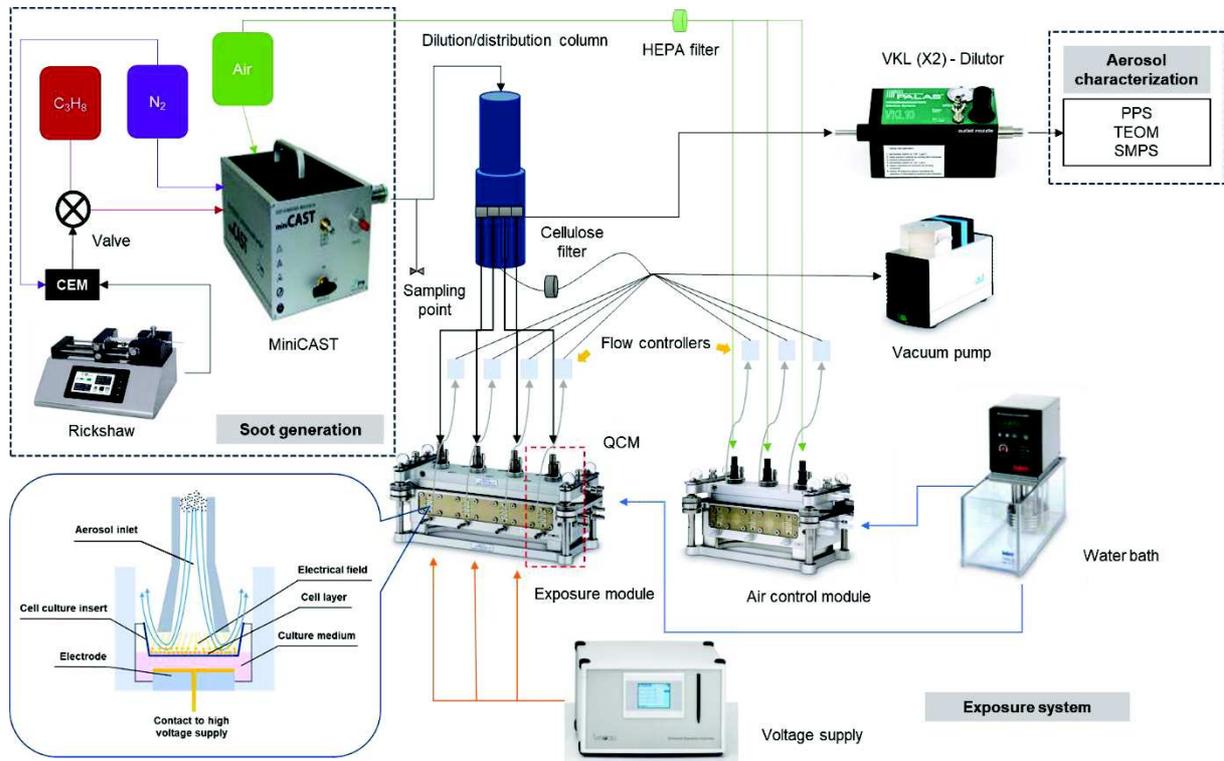


Figure S2. Amount of the different PAHs tested in the three deposits CAST1, surrogate and S+10A

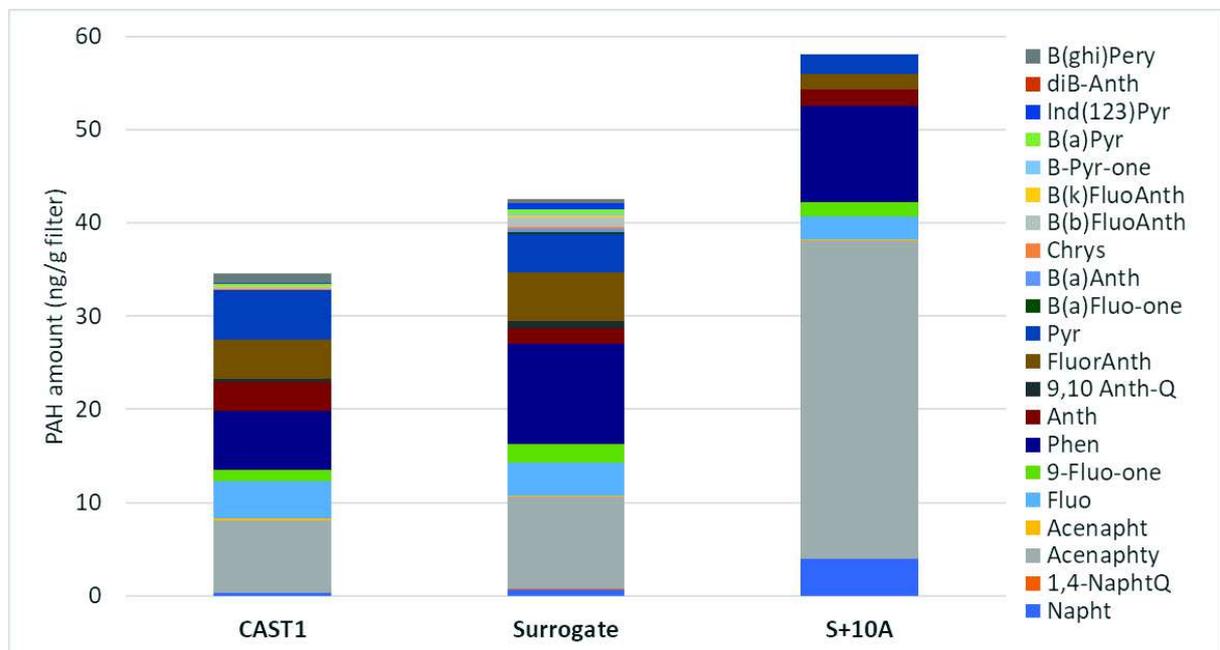


Table S1. Estimated concentrations for the compounds detected on the gas phase, sampled with and without filter (/: not detected).

| | <i>Compounds</i> | CAST1 | | Surrogate | | Surrogate + 10 % Anisole | |
|---------------------------------------|---|--------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|
| | | <i>Molar % (with filter)</i> | <i>Molar % (without filter)</i> | <i>Molar % (with filter)</i> | <i>Molar % (without filter)</i> | <i>Molar % (with filter)</i> | <i>Molar % (without filter)</i> |
| TCD | Dihydrogen H ₂ | / | / | 0,034 | 0,035 | 0,03 | 0,031 |
| | Methane CH ₄ | / | / | 0,027 | 0,028 | 0,029 | 0,03 |
| MS | Carbon dioxide CO ₂ | 1,0085 | 0,8539 | 0,6305 | 0,6097 | 0,6559 | 0,6059 |
| | Ethylene C ₂ H ₄ | / | / | 0,0159 | 0,0177 | 0,0183 | 0,0164 |
| | Acetylene C ₂ H ₂ | / | / | 0,0104 | 0,0118 | 0,0119 | 0,0105 |
| | Ethane C ₂ H ₆ | / | / | 0,0007 | 0,0008 | 0,0008 | 0,0005 |
| | Propene C ₃ H ₆ | / | / | 0,0045 | 0,0042 | 0,0035 | 0,0031 |
| | Propane C ₃ H ₈ | 0,0005 | 0,0002 | | | | |
| | Propadiene C ₃ H ₄ | / | / | 0,0012 | 0,0011 | 0,001 | 0,0009 |
| | Propyne C ₃ H ₄ | / | / | 0,0022 | 0,002 | 0,002 | 0,0017 |
| | Acetaldehyde C ₂ H ₄ O | / | / | | | | |
| | Isobutene C ₄ H ₈ | / | / | 0,0013 | 0,0013 | 0,001 | 0,0008 |
| | 1-buten-3-yne C ₄ H ₄ | / | / | 0,0007 | 0,0007 | 0,0009 | 0,0006 |
| | 1,3 butadiene C ₄ H ₆ | / | / | 0,0022 | 0,0023 | 0,0022 | 0,0019 |
| | 1,3 butadiyne C ₄ H ₂ | / | / | | | | |
| | Cyclopentadiene C ₅ H ₆ | / | / | 0,0011 | 0,0012 | 0,0023 | 0,0016 |
| | Benzene C ₆ H ₆ | / | / | 0,00004 | 0,00005 | 0,00004 | 0,00004 |
| Toluene C ₇ H ₈ | / | / | 0,00004 | 0,00006 | 0,00004 | 0,00004 | |

References

- Adenuga, A.A., Wright, M.E., Atkinson, D.B., 2016. Evaluation of the reactivity of exhaust from various biodiesel blends as a measure of possible oxidative effects: A concern for human exposure. *Chemosphere* 147, 396–403. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.12.074>
- Ahmed, C.M.S., Yang, J., Chen, J.Y., Jiang, H., Cullen, C., Karavalakis, G., Lin, Y.-H., 2020. Toxicological responses in human airway epithelial cells (BEAS-2B) exposed to particulate matter emissions from gasoline fuels with varying aromatic and ethanol levels. *Science of The Total Environment* 706, 135732. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135732>
- Araujo, J.A., Nel, A.E., 2009. Particulate matter and atherosclerosis: role of particle size, composition and oxidative stress. *Part Fibre Toxicol* 6, 24. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-6-24>
- Bates, J.T., Fang, T., Verma, V., Zeng, L., Weber, R.J., Tolbert, P.E., Abrams, J.Y., Sarnat, S.E., Klein, M., Mulholland, J.A., Russell, A.G., 2019. Review of Acellular Assays of Ambient Particulate Matter Oxidative Potential: Methods and Relationships with Composition, Sources, and Health Effects. *Environ Sci Technol* 53, 4003–4019. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b03430>
- Baulig, A., Garlatti, M., Bonvallot, V., Marchand, A., Barouki, R., Marano, F., Baeza-Squiban, A., 2003. Involvement of reactive oxygen species in the metabolic pathways triggered by diesel exhaust particles in human airway epithelial cells. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 285, L671–L679. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00419.2002>
- Bengalli, R., Longhin, E., Marchetti, S., Proverbio, M.C., Battaglia, C., Camatini, M., 2017. The role of IL-6 released from pulmonary epithelial cells in diesel UFP-induced endothelial activation. *Environ. Pollut.* 231, 1314–1321. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.08.104>
- Bengalli, R., Zerboni, A., Marchetti, S., Longhin, E., Priola, M., Camatini, M., Mantecca, P., 2019. In vitro pulmonary and vascular effects induced by different diesel exhaust particles. *Toxicol. Lett.* 306, 13–24. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2019.01.017>
- Bescond, A., Yon, J., Ouf, F.X., Ferry, D., Delhay, D., Gaffié, D., Coppalle, A., Rozé, C., 2014. Automated Determination of Aggregate Primary Particle Size Distribution by TEM Image Analysis: Application to Soot. *Aerosol Science and Technology* 48, 831–841. <https://doi.org/10.1080/02786826.2014.932896>
- Calas, A., Uzu, G., Martins, J.M.F., Voisin, D., Spadini, L., Lacroix, T., Jaffrezo, J.-L., 2017. The importance of simulated lung fluid (SLF) extractions for a more relevant evaluation of the oxidative potential of particulate matter. *Scientific Reports* 7, 11617. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11979-3>
- Cavanaugh, K.J., Oswari, J., Margulies, S.S., 2001. Role of Stretch on Tight Junction Structure in Alveolar Epithelial Cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 25, 584–591. <https://doi.org/10.1165/ajrcmb.25.5.4486>
- Chen, R., Hu, B., Liu, Y., Xu, J., Yang, G., Xu, D., Chen, C., 2016. Beyond PM_{2.5}: The role of ultrafine particles on adverse health effects of air pollution. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects, SI: Air Pollution* 1860, 2844–2855. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2016.03.019>
- Cho, H.-K., Park, C.-G., Shin, H.-J., Park, K.-H., Lim, H.-B., 2018. Comparison of the in vitro toxicological activity of various particulate matter. *Toxicol Ind Health* 34, 99–109. <https://doi.org/10.1177/0748233717749694>
- Crobeddu, B., Aragao-Santiago, L., Bui, L.-C., Boland, S., Baeza Squiban, A., 2017. Oxidative potential of particulate matter 2.5 as predictive indicator of cellular stress. *Environ. Pollut.* 230, 125–133. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.06.051>
- Crobeddu, B., Baudrimont, I., Deweirdt, J., Sciare, J., Badel, A., Camproux, A.-C., Bui, L.C., Baeza-Squiban, A., 2020. Lung Antioxidant Depletion: A Predictive Indicator of Cellular Stress Induced by Ambient Fine Particles. *Environ. Sci. Technol.* 54, 2360–2369. <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b05990>
- Frias, D.P., Gomes, R.L.N., Yoshizaki, K., Carvalho-Oliveira, R., Matsuda, M., Junqueira, M. de S., Teodoro, W.R., Vasconcellos, P. de C., Pereira, D.C. de A., Conceição, P.R. da, Saldiva, P.H.N., Mauad, T., Macchione, M., 2020. Nrf2 positively regulates autophagy antioxidant response in human bronchial epithelial cells exposed to diesel exhaust particles. *Sci Rep* 10, 3704. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59930-3>
- Grilli, A., Bengalli, R., Longhin, E., Capasso, L., Proverbio, M.C., Forcato, M., Bicciato, S., Gualtieri, M., Battaglia, C., Camatini, M., 2018. Transcriptional profiling of human bronchial epithelial cell BEAS-2B exposed to diesel and biomass ultrafine particles. *BMC Genomics* 19, 302. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-4679-9>
- Hawley, B., L'Orange, C., Olsen, D.B., Marchese, A.J., Volckens, J., 2014a. Oxidative Stress and Aromatic Hydrocarbon Response of Human Bronchial Epithelial Cells Exposed to Petro- or Biodiesel Exhaust Treated with a Diesel Particulate Filter. *Toxicol Sci* 141, 505–514. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfu147>
- Hawley, B., McKenna, D., Marchese, A., Volckens, J., 2014b. Time course of bronchial cell inflammation following exposure to diesel particulate matter using a modified EAVES. *Toxicology in Vitro* 28, 829–837. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2014.03.001>
- IARC, 2013. Diesel and Gasoline Engine Exhausts and Some Nitroarenes.

- Jaramillo, I.C., Sturrock, A., Ghiassi, H., Woller, D.J., Deering-Rice, C.E., Lighty, J.S., Paine, R., Reilly, C., Kelly, K.E., 2018. Effects of fuel components and combustion particle physicochemical properties on toxicological responses of lung cells. *Journal of Environmental Science and Health, Part A* 53, 295–309. <https://doi.org/10.1080/10934529.2017.1400793>
- Jin, X., Su, H., Ding, G., Sun, Z., Li, Z., 2019. Exposure to ambient fine particles causes abnormal energy metabolism and ATP decrease in lung tissues. *Chemosphere* 224, 29–38. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.02.116>
- Juarez-Facio, A.T., Castilla, C., Corbière, C., Lavanant, H., Afonso, C., Morin, C., Merlet-Machour, N., Chevalier, L., Vaugeois, J.-M., Yon, J., Monteil, C., 2021a. Development of a standardized in vitro approach to evaluate microphysical, chemical, and toxicological properties of combustion-derived fine and ultrafine particles. *Journal of Environmental Sciences*.
- Juarez-Facio, A.T., Yon, J., Corbière, C., Rogez-Florent, T., Castilla, C., Lavanant, H., Mignot, M., Devouge-Boyer, C., Logie, C., Chevaillier, L., Vaugeois, J.-M., Monteil, C., 2021b. Toxicological impact of organic ultrafine particles (UFPs) in human bronchial epithelial BEAS-2B cells at air-liquid interface. (soumis)
- Kohse - Höinghaus, K., Oßwald, P., Cool, T.A., Kasper, T., Hansen, N., Qi, F., Westbrook, C.K., Westmoreland, P.R., 2010. Biofuel Combustion Chemistry: From Ethanol to Biodiesel. *Angewandte Chemie International Edition* 49, 3572–3597. <https://doi.org/10.1002/anie.200905335>
- Kumar, P., Nagarajan, A., Uchil, P.D., 2018. Analysis of Cell Viability by the Lactate Dehydrogenase Assay. *Cold Spring Harb Protoc* 2018. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot095497>
- Kumar, S., Verma, M.K., Srivastava, A.K., 2013. Ultrafine particles in urban ambient air and their health perspectives. *Rev Environ Health* 28, 117–128. <https://doi.org/10.1515/reveh-2013-0008>
- Kwon, H.-S., Ryu, M.H., Carlsten, C., 2020. Ultrafine particles: unique physicochemical properties relevant to health and disease. *Exp Mol Med* 52, 318–328. <https://doi.org/10.1038/s12276-020-0405-1>
- Leikauf, G.D., Kim, S.-H., Jang, A.-S., 2020. Mechanisms of ultrafine particle-induced respiratory health effects. *Exp Mol Med* 52, 329–337. <https://doi.org/10.1038/s12276-020-0394-0>
- Lin, M., Yu, J.Z., 2019. Dithiothreitol (DTT) concentration effect and its implications on the applicability of DTT assay to evaluate the oxidative potential of atmospheric aerosol samples. *Environmental Pollution* 251, 938–944. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.05.074>
- Lin, Y.-C., Li, Y.-C., Amesho, K.T.T., Chou, F.-C., Cheng, P.-C., 2019. Characterization and quantification of PM_{2.5} emissions and PAHs concentration in PM_{2.5} from the exhausts of diesel vehicles with various accumulated mileages. *Science of The Total Environment* 660, 188–198. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.01.007>
- Malorni, L., Guida, V., Sirignano, M., Genovese, G., Petrarca, C., Pedata, P., 2017. Exposure to sub-10nm particles emitted from a biodiesel-fueled diesel engine: In vitro toxicity and inflammatory potential. *Toxicol. Lett.* 270, 51–61. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2017.02.009>
- Moufarrej, L., Courcot, D., Ledoux, F., 2020. Assessment of the PM_{2.5} oxidative potential in a coastal industrial city in Northern France: Relationships with chemical composition, local emissions and long range sources. *Science of The Total Environment* 748, 141448. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141448>
- Oberdörster, G., Oberdörster, E., Oberdörster, J., 2005. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ. Health Perspect.* 113, 823–839. <https://doi.org/10.1289/ehp.7339>
- Øvrevik, J., 2019. Oxidative Potential Versus Biological Effects: A Review on the Relevance of Cell-Free/Abiotic Assays as Predictors of Toxicity from Airborne Particulate Matter. *Int J Mol Sci* 20. <https://doi.org/10.3390/ijms20194772>
- Øvrevik, J., Refsnes, M., Låg, M., Holme, J.A., Schwarze, P.E., 2015. Activation of Proinflammatory Responses in Cells of the Airway Mucosa by Particulate Matter: Oxidant- and Non-Oxidant-Mediated Triggering Mechanisms. *Biomolecules* 5, 1399–1440. <https://doi.org/10.3390/biom5031399>
- Pope, C.A., Bates, D.V., Raizenne, M.E., 1995. Health effects of particulate air pollution: time for reassessment? *Environ Health Perspect* 103, 472–480.
- Rizza, V., Stabile, L., Vistocco, D., Russi, A., Pardi, S., Buonanno, G., 2019. Effects of the exposure to ultrafine particles on heart rate in a healthy population. *Sci. Total Environ.* 650, 2403–2410. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.09.385>
- Rubio, V., Zhang, J., Valverde, M., Rojas, E., Shi, Z.-Z., 2011. Essential role of Nrf2 in protection against hydroquinone- and benzoquinone-induced cytotoxicity. *Toxicology in Vitro* 25, 521–529. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2010.10.021>
- Rynning, I., Neca, J., Vrbova, K., Libalova, H., Rossner, P., Holme, J.A., Gützkow, K.B., Afanou, A.K.J., Arnoldussen, Y.J., Hrubá, E., Skare, Ø., Haugen, A., Topinka, J., Machala, M., Møllerup, S., 2018. In Vitro Transformation of Human Bronchial Epithelial Cells by Diesel Exhaust Particles: Gene Expression Profiling and Early Toxic Responses. *Toxicol Sci* 166, 51–64. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfy183>
- Schraufnagel, D.E., 2020. The health effects of ultrafine particles. *Exp Mol Med* 52, 311–317. <https://doi.org/10.1038/s12276-020-0403-3>

Seriani, R., de Souza, C.E.C., Krempel, P.G., Frias, D.P., Matsuda, M., Correia, A.T., Ferreira, M.Z.J., Alencar, A.M., Negri, E.M., Saldiva, P.H.N., Mauad, T., Macchione, M., 2016. Human bronchial epithelial cells exposed in vitro to diesel exhaust particles exhibit alterations in cell rheology and cytotoxicity associated with decrease in antioxidant defenses and imbalance in pro- and anti-apoptotic gene expression. *Environ Sci Pollut Res Int* 23, 9862–9870. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6228-x>

Shin, H.-J., Cho, H.G., Park, C.K., Park, K.H., Lim, H.B., 2017. Comparative In Vitro Biological Toxicity of Four Kinds of Air Pollution Particles. *Toxicol Res* 33, 305–313. <https://doi.org/10.5487/TR.2017.33.4.305>

Tian, L., Shang, Y., Chen, R., Bai, R., Chen, C., Inthavong, K., Tu, J., 2019. Correlation of regional deposition dosage for inhaled nanoparticles in human and rat olfactory. *Part Fibre Toxicol* 16, 6. <https://doi.org/10.1186/s12989-019-0290-8>

Wagnon, S.W., Thion, S., Nilsson, E.J.K., Mehl, M., Serinyel, Z., Zhang, K., Dagaut, P., Konnov, A.A., Dayma, G., Pitz, W.J., 2018. Experimental and modeling studies of a biofuel surrogate compound: laminar burning velocities and jet-stirred reactor measurements of anisole. *Combustion and Flame* 189, 325–336. <https://doi.org/10.1016/j.combustflame.2017.10.020>

Wu, Y., Rossow, B., Modica, V., Yu, X., Wu, L., Grisch, F., 2017. Laminar flame speed of lignocellulosic biomass-derived oxygenates and blends of gasoline/oxygenates. *Fuel* 202, 572–582. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2017.04.085>

Yuan, Q., Chen, Y., Li, X., Zhang, Z., Chu, H., 2019. Ambient fine particulate matter (PM_{2.5}) induces oxidative stress and pro-inflammatory response via up-regulating the expression of CYP1A1/1B1 in human bronchial epithelial cells in vitro. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 839, 40–48. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2018.12.005>

Zhang, Z.-H., Balasubramanian, R., 2014. Influence of butanol–diesel blends on particulate emissions of a non-road diesel engine. *Fuel* 118, 130–136. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2013.10.059>

Discussion générale

L'objectif de mon projet de thèse a été d'évaluer la toxicité de particules fines et ultrafines produites lors de la combustion de carburants pétroliers et de B2G pour des conditions de combustion et d'exposition parfaitement contrôlées, représentatives de l'exposition humaine. Pour réaliser cet objectif, une grande partie de ce travail a consisté au développement et à la caractérisation d'un système d'exposition en ligne de cellules épithéliales pulmonaires à des particules de combustion générées de façon expérimentale et standardisée.

1. Génération de particules de combustion et exposition en ligne

Le développement du protocole a compris d'une part l'optimisation du système d'exposition et d'autre part les mises au point des conditions de culture des modèles cellulaires utilisés. Tout d'abord la mise en place du système d'exposition a nécessité plusieurs réglages afin de trouver des conditions permettant de mieux connaître le comportement de particules dans le système d'étude. Le dispositif expérimental comprend différentes parties décrites dans l'**Annexe 1**.

Ces mises au point ont été réalisées avec le carburant propane à différentes conditions de combustion. En raison de la complexité physico-chimique (taille, nombre, morphologie, et composition chimique) que les PF et les PUF présentent, des dispositifs qui assurent une génération stable et reproductible sont nécessaires. Ainsi, nous avons opté pour utiliser un générateur de particules (suies) miniCAST (5021c) qui produit une flamme de diffusion grâce à un débit de carburant gazeux (propane ou liquide évaporé) (dilué ou non à de l'azote) et à de l'air d'oxydation. Les particules produites sont maintenues dans leurs états en sortie de chambre de combustion en figeant les réactions chimiques avec l'azote et en le diluant avec de l'air afin de limiter les phénomènes d'agrégation. Plusieurs études se sont intéressées à la caractérisation des suies produites par ce dispositif (Bescond et al., 2014; Ess and Vasilatou, 2019; Mamakos et al., 2013; Marhaba et al., 2019; Moore et al., 2014). En effet, le miniCAST peut produire des particules de différentes tailles et avec différentes teneurs en composés organiques.

Dans un premier temps, nous avons utilisé 3 conditions de fonctionnement/combustion (CAST1, CAST2 et CAST3). Les suies produites ont fait l'objet au préalable, d'une exhaustive caractérisation par le laboratoire CORIA. Ainsi, ces trois points de fonctionnement permettent une génération des suies avec des sphérules

primaires de taille qui vont de 26.6 à 36.3 nm et des teneurs en composés organiques (OC/TC) de 4.1 ± 3.5 à $87 \pm 5\%$ (Bescond et al., 2014). Pendant ma thèse, les particules ont été caractérisées d'un point de vue microphysique et chimique (analyses non ciblées et ciblées des HAP). Concernant l'analyse microphysique, plusieurs paramètres ont été étudiés dont la distribution granulométrique à l'aide d'un SMPS et la concentration massique à l'aide d'une microbalance TEOM afin de vérifier la reproductibilité de la génération de ces particules, quel que soit le point de fonctionnement étudié. L'analyse chimique a été réalisée sur la phase gazeuse par GC-MS et sur la phase particulaire avec une approche non ciblée et une approche ciblée, afin d'identifier les composés organiques caractérisant ces différentes conditions de combustion. Seules les conditions CAST1 et CAST3 ont été présentées dans ce manuscrit, choisies pour leur différence en composés organiques, la condition CAST1 permettant de générer des particules de type « suie carbone » (ou « black carbone ») moins riches en composés organiques que la condition CAST3 permettant d'obtenir des PUF riches en HAP. La première condition permet ainsi d'obtenir des particules plus représentatives du trafic routier (type essence), que les particules de CAST3, représentatives de combustions incomplètes. La condition CAST2, quant à elle, permettait d'obtenir des particules intermédiaires qui, d'un point de vue toxicologique, ne nous semblait pas nécessaire à retenir pour la réalisation des mises au point sur cellules mais que nous avons tout de même caractérisée et étudiée dans le système Vitrocell®. Le « comportement » de ces trois types de particules dans le système Vitrocell® a en effet été étudié, afin de déterminer leur efficacité de dépôt. Cette étape a été indispensable pour les explorations biologiques, car l'intérêt de notre étude était de travailler à des doses proches des conditions d'exposition réelles. Premièrement, nous avons déterminé l'efficacité du dépôt, c'est-à-dire le pourcentage de masse déposée sur le tapis cellulaire, à partir des mesures réalisées avec la microbalance incluse dans le module d'exposition. Le calcul du dépôt est détaillé dans l'**Annexe 2**. Globalement, l'efficacité du dépôt est restée modeste pour l'ensemble des conditions. Elle a été plus importante avec le CAST3 (1,3%) qu'avec le CAST1 (0,291%) et intermédiaire pour le point de fonctionnement CAST2 (0,64%).

2. Choix des modèles cellulaires

Deux modèles cellulaires broncho-pulmonaires ont été mis en place lors de ce travail de thèse : le modèle primaire NHBE et la lignée BEAS-2B. D'abord, des tests de

différenciation ont été réalisés sur le modèle primaire NHBE dans le but de trouver les conditions de culture permettant la reconstitution d'un épithélium pseudostratifié. Les cellules en culture à l'IAL ont été récupérées à 0, 7, 14 et 21 jours et l'expression des gènes impliqués dans la différenciation tels que *MUC5AC*, *FOXJ1*, *ZO-1*, *OCLN* a été mesurée. Au vu des résultats de l'expression de ces marqueurs, les cellules ont été cultivées 14 jours à l'IAL avant d'être exposées aux différents aérosols. Le modèle a également été étudié par microscopie, confirmant qu'à 14 jours les conditions de culture permettent une bonne reconstitution d'un pseudo-épithélium bronchique. Des résultats similaires ont été obtenus par d'autres études utilisant le même modèle (Boublil et al., 2013). Rayner et al., 2019 par exemple, montrent que l'épithélium reconstitué développé dépend étroitement du passage ainsi que du donneur (Rayner et al., 2019). Afin de s'affranchir de cette contrainte, nous avons utilisé le même donneur et toutes les expositions ont été réalisées au même passage, soit un passage 4.

La même démarche de caractérisation a été réalisée pour la lignée BEAS-2B. Etant donné que c'est un modèle qui ne se différencie pas, nous avons décidé de le garder en culture 7 jours. Ce modèle est moins représentatif d'un épithélium pseudo-stratifié que les cellules NHBE différenciées mais il est largement utilisé dans l'étude des particules (Ahmed et al., 2020; Badran et al., 2020; Frias et al., 2020; George et al., 2020; Mistry et al., 2020; Platel et al., 2020; Rossner et al., 2019; Sotty et al., 2020). Il a par ailleurs été montré que sous certaines conditions de culture, il peut exprimer des gènes de différenciation comme la β -tubulin IV (Stewart et al., 2012b). Par rapport aux modèles primaires, les lignées peuvent être utilisées pendant plusieurs passages, sans perdre leur phénotype, et présentent moins de variabilité. De plus, ce modèle a une forte capacité de métabolisation des HAP (Uppstad et al., 2010) par rapport au modèle NHBE. Ces dernières, dans nos conditions d'exposition, n'expriment pas les gènes du métabolisme de xénobiotiques testés (*CYP1A1*, *CYP1B1*). Ainsi, la lignée BEAS-2 représente aussi un modèle approprié à l'étude de PUF.

3. Doses d'exposition

Des expositions aux points de fonctionnement CAST1 et CAST3 ont été réalisées sur le modèle NHBE à des faibles doses, 80 et 230 ng, respectivement (35 min d'exposition). Ces résultats correspondent à l'efficacité de dépôt tel que décrit

précédemment. Ensuite, la viabilité cellulaire ainsi que plusieurs marqueurs du stress oxydant et de l'inflammation ont été étudiés. Aucune modification a été observée (résultats non montrés). Cette réponse est due certainement à la faible dose d'exposition. Nous avons donc décidé d'augmenter l'efficacité du dépôt à l'aide d'un système électrostatique (SE), dispositif qui a été utilisé dans de nombreuses études sans altérer la viabilité cellulaire ni d'autres marqueurs biologiques (Bruijne et al., 2009; Frijns et al., 2017; Ning et al., 2008; Sillanpää et al., 2008). Etant donné que l'augmentation du taux de dépôt ne pouvait pas être calculée avec la microbalance, nous avons utilisé des mesures granulométriques avec le SPMS, avec et sans le SE, en aval et en amont du module d'exposition. D'autres méthodes existent pour estimer le dépôt induit par le SE, par exemple Mülhopt et al. 2016 a utilisé un aérosol particulaire de fluorescéine sodée et le dépôt a été calculé en analysant la fluorescence obtenue après exposition et lavage de la membrane de l'insert (Mülhopt et al., 2016). Nous avons estimé pour une induction de +1000 V, un taux d'augmentation de dépôt de 7.4 et 7.7 pour les points de fonctionnement, CAST1, et CAST3 respectivement. Donc, pour une exposition de 35 min à l'aérosol du CAST3, la dose d'exposition est de 230 ng sans le système électrostatique et de 1.8 µg avec une induction de +1000 V. Ces résultats montrent que l'utilisation du SE représente ainsi une alternative intéressante pour augmenter la dose d'exposition en gardant des expositions de courte durée. Nous avons donc gardé ces conditions pour les explorations biologiques (cf. article 1).

La détermination de la dose déposée dans l'arbre respiratoire dans des « conditions d'exposition réelles » est très difficile. L'utilisation des modèles informatiques est souvent utilisée. Par exemple le modèle « Multiple-path particle dosimetry » (MPPD) (Applied Research Associates Inc., Raleigh, NC) (Miller et al., 2016) permet de déterminer cette dose sous différents scénarios d'exposition (concentration et distribution de PM, genre, pathologies, âges, conditions atmosphériques). Manojkumar et al. 2019 ont estimé que pour une exposition de 24 h aux PM₁ la dose déposée dans la région trachéobronchique était de 0.10-0.13 ng/cm² (Manojkumar et al., 2019). Une étude réalisée dans des conditions similaires par Gualtieri et al. 2018 a estimé un dépôt de 0.015-0.025 ng/cm² (Gualtieri et al., 2018). Ainsi, des « doses d'exposition réelles » sont très variables dans la littérature car différents facteurs vont participer à leur estimation. Même si les doses d'exposition utilisées pendant mon travail de thèse sont élevées comparées aux conditions

d'exposition réelles, elles sont parmi les plus faibles retrouvées dans la littérature (Leclercq et al., 2018; Platel et al., 2020; Sotty et al., 2019).

4. Etude de la toxicité des particules de CAST3

Les deux modèles ont été étudiés dans les mêmes conditions d'exposition (cf. article 1 pour les NHBE et article 2 pour les BEAS-2B) montrant des avantages spécifiques dans l'étude des PF et PUF. En effet, le modèle primaire NHBE peut se différencier permettant ainsi la reconstitution d'un épithélium pseudostratifié qui, avec l'exposition à l'interface air-liquide permet une évaluation proche des conditions physiologiques réelles. Cependant, le modèle NHBE est un modèle très robuste et des concentrations élevées sont nécessaires afin d'induire une réponse cellulaire. En présence des particules, un système de défense est activé par les différents types cellulaires, ainsi, la production du mucus ou bien le battement ciliaire protégeraient les cellules des effets néfastes (Boublil et al., 2013). De plus, nous avons opté pour un modèle primaire d'un patient sain, qui pourrait avoir une influence sur la réponse comme il avait été montré par l'équipe de Leclercq et al., 2018. Des cellules NHBE différenciées saines et d'un patient atteint de broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO) ont été exposées en pseudo-ALI pendant 24 et 72 h à des PM_4 à une concentration de $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. Leur étude montre que, suite à l'exposition aux PM_4 , les cellules pathologiques présentent une réponse inflammatoire et antioxydante plus importantes par rapport aux cellules saines (Leclercq et al., 2018). La sensibilité des modèles cellulaires utilisés pour l'étude des PF et PUF a été également soulignée par Sotty et al., 2019 qui ont étudié les réponses cytotoxique, inflammatoire, épigénétique et transcriptomique induite par des $PM_{2.5-0.18}$ et les $PM_{0.18}$ sur des cellules épithéliales bronchiques humaines saines, atteintes d'asthme et de BPCO. Leurs résultats montrent une plus forte sensibilité des modèles pathologiques comparés au modèle sain (Sotty et al., 2019).

Après exposition au point de fonctionnement CAST3, des PUF avec une haute teneur en composés organiques, la viabilité de cellules NHBE et des cellules BEAS-2B n'a pas été modifiée. Cependant, certains marqueurs biologiques ont été altérés sur les deux modèles. 3 h après exposition, une induction significative du marqueur du stress oxydant NQO1 a été observée. Ces résultats sont concordant avec plusieurs études menées sur les PUF (Frias et al., 2020; Hawley et al., 2014a; Steerenberg et al., 1998; Yuan et al., 2019).

Concernant le marqueur de l'inflammation $IL-8$, une réponse opposée est observée, c'est-à-dire, sur le modèle NHBE ce marqueur est significativement exprimé alors que sur la lignée BEAS-2B il est inhibé. Cette différence est sûrement attribuable au modèle cellulaire comme il a été montré par Platel et al. 2020. Dans cette étude, deux lignées bronchiques, BEAS-2B et NCI-H292, ainsi que le modèle primaire NHBE ont été exposés à différentes fractions de particules dont des PF et PUF. Ensuite, la réponse génotoxique a été étudiée par des tests de comètes montrant seulement des effets sur les lignées (Platel et al., 2020). Cette étude montre clairement que des réponses divergentes entre les modèles bronchiques peuvent avoir lieu après exposition aux PM, ceci étant lié aux mécanismes de défense propres aux modèles.

Pour approfondir l'étude de ces particules, d'autres marqueurs ont été étudiés sur la lignée BEAS-2B après 3 h et 24 h d'exposition. D'abord, nous nous sommes intéressés à la mitochondrie car elle joue un rôle critique dans l'énergétique cellulaire par la synthèse d'adenosine triphosphate (ATP). Elles sont également des régulateurs importants du stress oxydant via la génération d'EROs. Les niveaux d'ATP n'ont pas été modifiés dans nos conditions d'exposition. Il faut souligner que la méthode de quantification de ces adénines phosphate a fait l'objet d'un développement par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) au laboratoire, adaptée aux échantillons cellulaires pendant ma thèse. L'énergétique cellulaire a été également étudiée à l'aide du dispositif Seahorse Extracellular Flux Analyser (Agilent). Les résultats obtenus avec ce dispositif ne montrent pas d'altération sur la fonction mitochondriale, cependant, la réponse pourrait être « noyée » due aux conditions immergées où les cellules se trouvaient avant et pendant l'analyse. Des analyses supplémentaires seraient donc nécessaires afin d'approfondir ce paramètre. En effet, il a été montré que les PUF pourraient avoir un impact sur la fonction mitochondriale (Sotty et al., 2020). Dans l'étude de Sotty et al. 2020, la lignée BEAS-2B a été exposée de façon aiguë ou répétée à $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de PF ou quasi-PUF montrant une augmentation de la phosphorylation oxydative ainsi que de la masse mitochondriale qui a donné lieu par la suite à une augmentation de l'anion superoxyde dans la mitochondrie. Ensuite, nous nous sommes intéressés à d'autres marqueurs du stress oxydant tels que le GSH, un antioxydant, dont les niveaux ont été significativement réduits 3 h alors qu'à 24 h ces niveaux ont augmenté par rapport au contrôle. A des faibles niveaux de stress oxydant la transcription des enzymes anti-oxydantes est induite par le facteur de transcription Nrf2

(cf. **Figure 19**) résultant en la production d'enzymes antioxydantes. Ainsi, l'expression d'*HO-1*, une enzyme ayant des fonctions antioxydantes et cyto-protectrices, a été significativement induite 3 h après exposition. NQO1 et HO-1 sont deux enzymes régulées par Nrf2. L'expression de ce dernier a été supprimée à 24 h dans nos conditions d'exposition. Concernant les superoxyde dismutases cytosoliques (*CuZnSOD*) et mitochondriales (*MnSOD*), la première a été significativement exprimée à 24 h alors que l'expression de *MnSOD* a été inhibée après 3 h. Des résultats similaires aux nôtres ont été observés dans diverses études (Cui et al., 2020; Frias et al., 2020; Hawley et al., 2014a; Li et al., 2003b). L'étude de la réponse antioxydante est complexe, il serait donc intéressant d'étudier la réponse cellulaire en cinétique à des temps d'incubation plus courts (et/ou plus longs). Ensuite, l'inflammation est caractérisée par l'activation de diverses voies de signalisation comprenant des médiateurs anti- et pro-inflammatoires résultant en l'expression des cytokines ainsi que des facteurs de transcription. Il a été montré que les HAP présents dans les particules étaient responsables d'une production d'EROs intracellulaires conduisant à l'activation des voies de signalisation de facteurs pro-inflammatoires (Baulig et al., 2003). Ainsi, dans nos conditions d'exposition, l'expression des deux marqueurs, *IL-6* et *IL-8*, a été significativement inhibée après 3 h d'exposition. Ces résultats pourraient s'expliquer par la présence d'HAP dans les particules comme montré par (Ahmed et al., 2020; Øvrevik et al., 2015). Enfin, les mécanismes préalablement discutés peuvent également être initiés par l'activation par les HAP du facteur de transcription AhR (aryl hydrocarbon receptor) qui régule l'expression d'enzymes du métabolisme de xénobiotiques (*CYP1A1*, *CYP1B1* etc.) (Beischlag et al., 2008). Contrairement aux BEAS-2B qui est un modèle métaboliquement actif (Uppstad et al., 2010), les cellules NHBE n'expriment pas les deux marqueurs métaboliques *CYP1A1* et *CYP1B1* étudiés. Ces marqueurs ont été fortement induits sur les BEAS-2B dans les deux temps d'exposition. Des résultats similaires ont été observés par d'autres études (Borgie et al., 2015; Hawley et al., 2014a). Vu dans leur ensemble, les particules du CAST3 induisent une réponse antioxydante et inflammatoire, à différents niveaux, sur les deux modèles cellulaires utilisés. De plus, le métabolisme de xénobiotiques a été fortement induit sur la lignée BEAS-2B. La remise à niveau de l'expression des certains marqueurs à 24 h indiquerait une réponse « adaptative » des cellules.

5. Etude comparative de la toxicité de particules issues de la combustion de différents carburants

Le développement d'approches discutées dans les études préalables a abouti à cette étude comparative. Cette étude se porte sur la comparaison physicochimique et les effets toxicologiques des émissions produites par un carburant pétrolier (essence) et un B2G. Toutefois, l'essence est constituée de plusieurs centaines d'espèces, incluant des alcanes, des alcènes et des aromatiques (Lemaire et al., 2010). De plus, la composition varie en fonction des distributeurs ou des lieux de production. Afin de s'affranchir de ces contraintes et de pouvoir comparer de façon répétable les émissions en particules d'essence et du B2G, nous avons opté pour l'utilisation d'un surrogate (substitut d'essence). Un surrogate est un mélange d'hydrocarbures qui vise à reproduire les propriétés de l'essence et est constitué de moins d'espèces ce qui facilite son étude (Lemaire et al., 2010). Pour notre étude nous avons utilisé la composition proposée par Wu et al., 2017 qui permet de modéliser une essence commerciale. L'intérêt aussi de ce mélange est que le CORIA l'a déjà utilisé pour des études dans le passé. La composition du surrogate de Wu et al. 2017, présente en wt% (% massique) : Hexane (24,31 wt%), 2,3-dimethylbut-2-ene (8,15 wt%), cyclohexane (14,21 wt%), iso-octane (17,75 wt%) et toluène (35,58 wt%). Ainsi, nous constatons que les principales familles chimiques de l'essence (alcanes, alcènes et les aromatiques) sont présentes dans cette composition. Ensuite, nous avons sélectionné deux additifs (composés oxygénés) afin de modéliser le B2G. Le premier a été l'éthanol, qui est déjà présent sur le marché avec par exemple l'E10 (10% d'éthanol et 90% d'essence en volume). Le deuxième a été l'anisole qui représente les espèces riches en phénol présentes dans la biomasse lignocellulosique. L'anisole se décompose aisément en phénol dû à une faible liaison chimique entre l'oxygène et le groupe méthyl et d'après Wagon et al., 2018, la biomasse lignocellulosique est convertie en un mélange d'espèces riches en phénol par pyrolyse ou combustion (Wagnon et al., 2018). De ce fait, l'anisole permet de bien modéliser les B2G car ceux-ci sont issus de la biomasse lignocellulosique. Ainsi, nous avons utilisé un mélange de surrogate et d'éthanol (10% volume) et un mélange de surrogate et d'anisole (10% volume). Pour cette partie, toutefois, l'étude toxicologique avec l'éthanol est en cours et les résultats n'ont pas été inclus dans le manuscrit.

La génération des suies a été assurée par le miniCAST, comme dans les études précédentes, cependant, il a été modifié par le CORIA afin de brûler du carburant liquide (**cf. Annexe 1**). Nous avons donc utilisé le miniCAST en mode propane (CAST1), qui permet d'obtenir des particules représentatives du trafic routier (type essence) tel que décrit et utilisé dans les études précédentes (**cf. Articles 1 et 2**), et en mode vapeur (carburant liquide évaporé) pour modéliser les émissions d'essence et du B2G.

Les différents aérosols ont été caractérisés avec la même approche que celle décrite dans l'article 1 et l'article 2. Les aérosols étudiés présentent des teneurs en composés organiques proches ($OC/TC_{CAST1} : 4.1 \pm 3.5 \%$, $OC/TC_{Surrogate} : 3,5 \pm 0.4 \%$, $OC/TC_{B2G} : 5 \pm 0.6\%$). L'analyse des particules par GC-MS montre la présence de composés majoritaires comme l'acénaphthylène (B2G > surrogate > CAST1), le phénanthrène (surrogate > B2G > CAST1), le fluoranthène (surrogate > CAST1 > B2G), le pyrène (surrogate > CAST1 > B2G). La phase gazeuse du CAST1 présente seulement du dioxyde de carbone et du propane, retrouvé aussi dans les émissions du surrogate et du B2G en plus du dihydrogène, de l'acétylène, et du méthane entre autres, à de très faibles concentrations (<1%). Concernant le potentiel oxydant, les particules de CAST1 ont montré les plus fortes valeurs de PO par rapport aux autres conditions étudiées (Surrogate et S+10A). Cependant, dans nos concentrations d'exposition (1,4 – 2,8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ équivalent à 250 – 500 ng/cm^2), les valeurs de PO restent faibles (<40%). Bien que de nombreuses études suggèrent un lien entre la composition chimique et l'OP (Crobeddu et al., 2017; Lin and Yu, 2019; Moufarrej et al., 2020), les différences observées dans notre étude ne peuvent pas être expliquées par les teneurs en composés organiques puisque le rapport OC/TC était similaires entre les différentes conditions (3,5% - 5,1%). D'autres facteurs pourraient être impliqués dans les résultats obtenus, tels que des facteurs liés à la méthode d'analyse utilisée. En effet, la mise en suspension de particules par sonication associée aux propriétés de surface de particules, permettrait davantage le relargage d'espèces chimiques montrant une sensibilité de détection par certains tests (Bates et al., 2019). La mesure du PO des particules peut être utilisée comme un indicateur complémentaire du stress oxydant (Borm et al., 2007), cependant, les conditions utilisées dans notre étude ne permettent pas d'associer les réponses biologiques obtenues au PO de particules.

L'évaluation toxicologique des trois aérosols a été réalisée à la même dose d'exposition (soit une dose estimée de 330 ng/cm²) sur la lignée BEAS-2B cultivée sur insert et exposée à l'IAL pendant 35 min (+1000 V). La dose d'exposition représente une dose proche des conditions réelles, comme estimée par (Gangwar et al., 2020) sur une durée d'exposition de 24 h. L'article 2 a permis de cibler les marqueurs biologiques les plus pertinents sur le modèle BEAS-2B. Concernant le stress oxydant, nous avons étudié l'expression d'HO1 et NQO1. Le CAST1 n'induit pas des modifications importantes alors que le surrogate et le B2G induisent une modification sur ces marqueurs principalement après 3 h d'exposition. En ce qui concerne la réponse inflammatoire, les émissions de CAST1 et du B2G inhibent légèrement l'expression d'*IL-8* à 3 h alors qu'après 24 h elle est augmentée. L'expression d'*IL-6* est seulement augmentée après 24 h avec les particules du CAST1. Cette tendance de remise à niveau après 24 h d'exposition a été également observée par Hawley et al., 2014 sur des cellules NHBE différenciées exposées à l'IAL à des émissions diesel dans des doses d'exposition similaires aux nôtres. Ils ont étudié l'expression de plusieurs marqueurs dont *IL-8* pour l'inflammation, *HO-1* pour le stress oxydant et le *CYP1A1* pour le métabolisme de xénobiotiques après plusieurs temps d'incubations avec des particules de diesel (1 h, 3 h, 6 h, 9 h et 24 h). Une augmentation de l'expression des marqueurs biologiques a été observée principalement 1 h et 3 h après exposition puis l'expression redescend au même niveau que le contrôle (Hawley et al., 2014b). Contrairement à cette étude, nous avons observé une forte expression des marqueurs du métabolisme de xénobiotiques par les deux carburants liquides, surtout le *CYP1A1*, et cette réponse est maintenue même après 24 h d'exposition. Ces résultats sont liés au modèle BEAS-2B qui a une forte capacité de métabolisation des HAP comme il a été discuté dans l'article 2.

Conclusion et perspectives

Ce travail de thèse avait comme objectif d'évaluer la toxicité de particules fines et ultrafines produites lors de la combustion de carburants pétroliers et des B2G. Ainsi, nous avons développé un protocole d'exposition de PF et PUF et nous avons étudié différents aérosols dans des conditions contrôlées et représentatives de l'exposition humaine. Les différents aérosols étudiés présentent des caractéristiques physico-chimiques variables (distribution granulométrique, morphologie, composition organique, potentiel oxydant) et induisent des réponses biologiques très diverses en fonction du modèle cellulaire utilisé. Nous avons étudié les PM à des doses non cytotoxiques et nous nous sommes intéressés à la réponse antioxydante, inflammatoire et métabolique 3 h et 24 h après exposition. Globalement, sur le modèle BEAS-2B, les particules du CAST3, du surrogate ainsi que du B2G induisent une réponse plus importante sur les marqueurs étudiés, et cette réponse est observée surtout 3 h après exposition. En raison de leur forte capacité métabolique, ce modèle est adapté à l'étude des HAP. Concernant le modèle NHBE, il a été exposé aux particules du CAST1 et CAST3 et seules ces dernières ont activé la réponse inflammatoire et antioxydante après 3 h d'exposition.

L'ensemble de mon travail de thèse est valorisé sous forme de trois articles scientifiques (dont un accepté, un soumis et un en rédaction) ainsi que plusieurs communications à des congrès nationaux et internationaux. Les résultats obtenus confirment les données de la littérature qui associent les effets sanitaires de PF et PUF aux caractéristiques physico-chimiques de celles-ci. Par ailleurs, l'ensemble de mon travail de thèse soulève l'importance de la transdisciplinarité dans la recherche. En effet, les diverses collaborations ont permis une meilleure compréhension des résultats obtenus car la complexité physico-chimique que les PF et les PUF présentent rend difficile l'étude des PM. L'étude comparative sera complétée avec les résultats physico-chimiques et toxicologiques du mélange surrogate et éthanol (S+10E) qui sont en cours d'analyse. Les données obtenues dans l'étude comparative de carburants, pourront contribuer dans le futur, à la prise de décisions relatives à l'avenir des biocarburants.

Le protocole d'exposition développé pourrait être adapté à l'étude de carburants utilisés dans l'aéronautique ainsi que dans le transport maritime ou bien dans n'importe quel contexte induisant un risque sanitaire où une combustion puisse être générée de façon contrôlée (par exemple un incendie). Enfin, pour approfondir notre étude, il serait intéressant d'étudier l'inhibition de la réponse inflammatoire sur le modèle BEAS-2B et la

relation avec la présence de composés organiques tels que les HAP. Finalement, d'autres modèles cellulaires pourraient être utilisés par exemple, des modèles pathologiques pour évaluer l'impact de particules sur une population ciblée (asthme, BPCO) ou bien des modèles comme le MucilAir™ qui peut être gardé pendant plusieurs semaines permettant des expositions répétées et donc une évaluation à long terme.

Communications scientifiques

Publications soumises ou en cours de soumission

1. **Development of a standardized in vitro approach to evaluate microphysical, chemical, and toxicological properties of combustion-derived fine and ultrafine particles** (Journal of Environmental Sciences 113, 104–117. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2021.06.001>)

Juarez-Facio A. T., Castilla C., Corbière C., Lavanant H., Afonso C., Morin C., Merlet-Machour N., Chevalier L., Vaugeois J.-M., Yon J., Monteil C.

2. **Toxicological impact of organic UFPs in human bronchial epithelial BEAS-2B cells** (*soumis*)

Juarez Facio A. T., Yon J., Corbière C., Rogez-Florent T., Castilla C., Lavanant H., Mignot M., Devouge-Boyer C., Chevalier L., Vaugeois J.-M., Monteil C.

3. **Ultrafine particles issued from oil fuels and second-generation biofuels combustion: a comparative study of the physico-chemical and *in vitro* toxicological characteristics** (*en préparation*)

Juarez Facio A. T., Rogez-Florent T., Meausoone C., Mignot M., Devouge-Boyer C., Castilla C., Lavanant H., Afonso C., Morin C., Merlet-Machour N., Chevalier L., Ouf F.-X., Vaugeois J.-M., Yon J., Corbière C., Monteil C.

4. **Particles from pyrotechnic red signaling smoke induced cytotoxicity and mutagenicity in vitro** (*en préparation*)

Corbière C., Mekki M., **Juarez Facio A. T.**, Rozay C., Cazier F., Dewaele D., Logie C., Vaugeois J.-M., André V., Monteil C.

5. **Validation of a fast and simple HPLC-PDA method for the quantification of adenosine phosphate in bronchial cells** (*en préparation*)

Juarez Facio A. T., Martin De la Garde V., Corbière C., Christelle C., Rogez-Florent T.

Communications affichées

1. **Particules fines et ultrafines issues de la combustion de carburants pétroliers et biocarburants de seconde génération : Etude comparative des caractéristiques physico-chimiques et toxicologiques *in vitro***

Juarez Facio A. T.

Nom et lieux des congrès :

- Journées Doctorants ADEME : les 15 et 16 mars 2018 à Sophia Antipolis

- Journée de l'Ecole Doctorale Normande – Biologie Intégrative Santé Environnement : 22 et 23 mars 2018 à Rouen

2. Fine and ultrafine particles issued from oil fuels and second-generation biofuels combustion: comparative study of the physico-chemical and in vitro toxicological characteristics

Juarez Facio A. T., Malleter M., Rüger C., Vaugeois J.-M., Yon J., Monteil C.

Nom et lieux des congrès :

- Forum Scientifique de la Fédération IEPE : Les nouveaux carburants, quelles alternatives ? : le 16 novembre 2018 au CORIA, Saint-Etienne-du-Rouvray
- Congrès Annuel de la Société Française de Toxicologie : les 27 et 28 novembre 2018
- Journées Plénières du GDR Suies : les 3, 4 et 5 décembre 2018 à Lille – Prix du meilleur poster

3. Fine and ultrafine particles issued from oil fuels and second-generation biofuels combustion: development of a standardized tool to evaluate particles toxicity

Juarez Facio A. T., Malleter M., Rüger C., Vaugeois J.-M., Yon J., Monteil C.

Nom et lieux du congrès :

- Congress of the European Societies of Toxicology EUROTOX : du 8 au 11 Septembre 2019 à Helsinki, Finlande.

Communications orales :

1. Particules fines et ultrafines issues de la combustion de carburants pétroliers et biocarburants de seconde génération : Étude comparative des caractéristiques physico-chimiques et toxicologiques in vitro

Auteurs : Ana Teresa Juárez Facio

Nom et lieux du congrès :

- Forum Scientifique de la Fédération IEPE : Les nouveaux carburants, quelles alternatives ? : le 16 novembre 2018 au CORIA, Saint-Etienne-du-Rouvray.

2. Toxicité de particules ultrafines organiques sur les cellules épithéliales bronchiques humaines Beas-2b.

A.T. Juarez Facio, J. Yon, C. Corbière, L. Chevalier, J.-M. Vaugeois, C. Monteil

Nom et lieux du congrès : Congrès Français sur les aérosols : les 26, 27 et 28 janvier 2021 par visioconférence.

Annexes

Annexe 1. Description du dispositif expérimental

Le système d'étude de particules, comprend principalement deux parties. La première qui concerne la génération contrôlée de particules à l'aide d'un miniCAST et la deuxième qui concerne l'exposition de cellules pulmonaires à l'Interface Air-Liquide (IAL) en utilisant un système d'exposition Vitrocell®. En parallèle, différents dispositifs sont mis en place pour prélever des particules et mener une caractérisation chimique et microphysique. L'ensemble des dispositifs utilisés sont décrits ci-dessous.

1.1 Production de suies et caractérisation de suies

1.1.1 MiniCAST

L'aérosol de particules sont générées à partir du MiniCAST (5201c). Initialement cet appareil alimente de façon contrôlée une flamme à partir d'un mélange d'azote, de propane et d'air. Néanmoins, il a été modifié par le CORIA afin d'accepter des carburants liquides. Il fonctionne donc en deux modes : mode vapeur (propane) et mode liquide.



Figure 1. MiniCAST 5201c

Mode vapeur

Ce mode fonctionne avec 4 débits principaux :

- A : Débit du propane (ml/min)
- B : Débit d'air d'oxydation (L/min)
- C : Débit d'air de dilution (L/min)
- D : Débit d'azote (L/min)

Mode liquide

Afin de travailler avec des carburants liquides, différents dispositifs ont été ajoutés au miniCAST :

- Un pousse seringue contrôlé (QPS en ml/min) ;
- Un évaporateur (CEM W-100A) dont la température (TCEM en ° C) peut être modulée en fonction du carburant utilisé ;
- Un débitmètre d'azote (QN2CEM en ml/min) ;
- Un débitmètre d'air (QAIR en l/min) utilisé pour diluer les suies ;
- Une ligne chauffante (TLIGNE en ° C) utilisé dans le but de garder les vapeurs de carburant en phase gazeuse jusqu'à la chambre de combustion du MiniCAST.

1.1.2 Système de dilution VKL

La concentration en suies produites par le miniCAST est très élevée pour les appareils de mesure qui suivent le dispositif expérimental. Afin de diluer l'aérosol, deux VKL (**Figure 2**) en série sont installés et réglés sur $1 \pm 0,1$ bar. Chaque VKL permet une dilution d'environ 10 et le facteur de deux VKL ensemble est de 97,4.

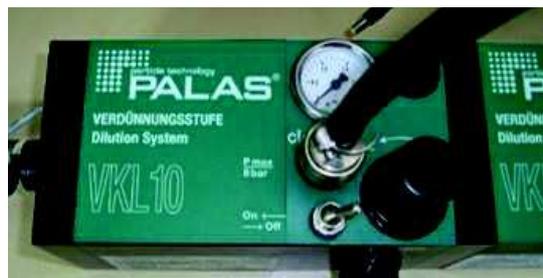


Figure 2. VKL PALAS

1.1.3 Pegasor Particle Sensor (PPS)

Cet appareil permet le suivi en temps réel de la concentration massique en particules en phase aérosol. Il est composé d'un chargeur qui confère un état de charge aux particules et il exploite la mesure du courant induit (mesure d'un courant de fuite) par la circulation de l'aérosol au travers du dispositif. Le courant mesuré est lié à la concentration massique (**Figure 3**).



Figure 3. Pegasor Particle Sensor (PPS)

1.1.4 SMPS (Scanning Mobility Particle Sizer)

Il permet de déterminer la distribution en taille des aérosols submicroniques. Il est composé d'une source à rayons X afin de conférer une loi de charge électrique maîtrisée, d'un Differential Mobility Analyzer (DMA) afin de classifier les particules en taille et d'un Condensation Particle Counter (CPC) pour comptabiliser les particules (**Figure 4**).

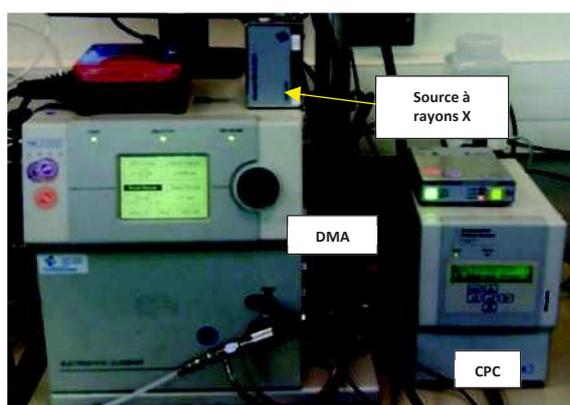


Figure 4. Scanning Mobility Particle Sizer (SMPS)

1.1.5 TEOM (Tapered Element Oscillating Microbalance)

Cette microbalance permet de mesurer la concentration massique de particules dans une atmosphère donnée. Elle est composée d'un élément conique oscillant à sa fréquence naturelle. L'élément conique creux est fixe à sa base. Le filtre de collection est monté sur le haut de la partie effilée. L'ensemble oscille à sa fréquence naturelle (environ 200 Hz), déterminée par les caractéristiques physiques de l'élément conique et par la masse du filtre. L'air atmosphérique est aspiré par une pompe connectée à la base de la microbalance. Les particules en suspension, retenues par le filtre, augmentent la masse du système oscillant, produisant une décroissance de la fréquence naturelle de vibration.

Cette variation de fréquence est mesurée en continu et convertie en variation de masse (Figure 5).



Figure 5. Tapered Element Oscillating Microbalance (TEOM)

1.2 Système d'exposition Vitrocell®

Le système d'exposition VITROCELL® est placé en aval du MiniCAST. Il s'agit d'un dispositif commercial conçu pour étudier l'exposition de cellules de mammifère en culture à l'Interface Air-Liquide (IAL). Les cultures sont préparées préalablement dans des inserts avec des membranes semi-perméables. Pendant l'exposition aux particules, le pôle basal permet une alimentation du milieu tandis que l'aérosol de particules est distribué au pôle apical (Figure 6). La zone d'exposition est thermostatée à 37° C par un bain circulant d'eau.

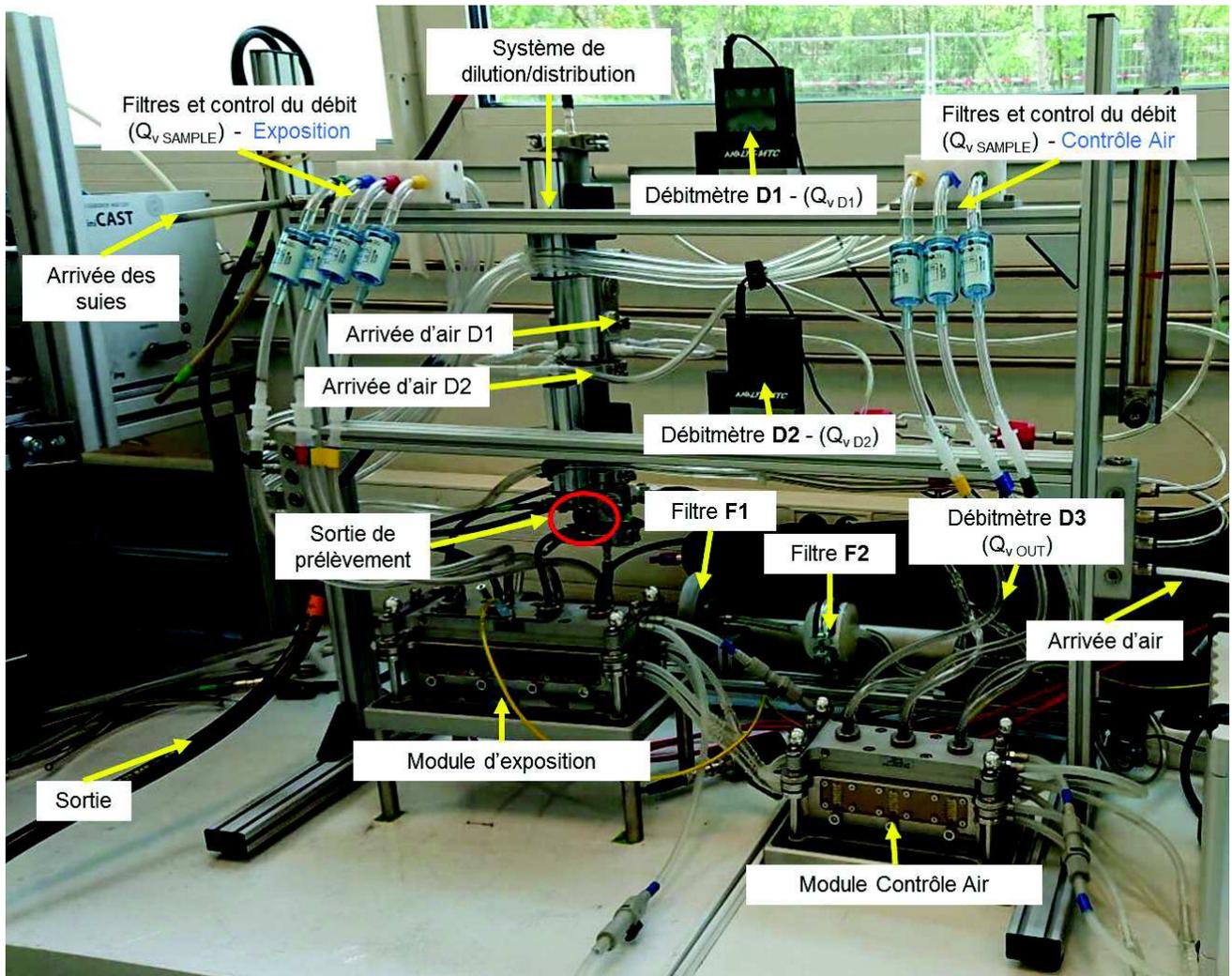


Figure 6. Chambre d'exposition Vitrocell®

1.2.1 Colonne de distribution et dilution de l'aérosol

L'effluent de particules arrive au système Vitrocell® par la colonne de dilution/distribution (système de dilution/distribution). Ici, une dilution peut être apportée à l'aérosol grâce à l'apport d'air contrôlé par deux débitmètres (D1 et D2). Cette colonne distribue l'aérosol sur le module où les cellules sont exposées aux particules. Un point de prélèvement des aérosols est placé au niveau de la colonne. L'excès de l'aérosol traverse d'abord un filtre en cellulose (F1) où les particules sont retenues (ce filtre est utilisé pour l'analyse ciblée). L'air porteur traverse un deuxième filtre (F2) en verre pour après être dirigé vers la sortie (EXT). Le débit de sortie ($Q_{v,OUT}$) est contrôlé par le débitmètre D3.

1.2.2 Module d'exposition

Le module comprend trois puits où les inserts sont disposés et un quatrième puits attribué à la microbalance (**Figure 7**). L'aérosol arrive par le dessus grâce aux tuyaux

provenant de la colonne de distribution. Le débit de l'aérosol qui arrive sur les puits ($Q_{v, \text{sample}} : ml/min$) est contrôlé à partir de vannes qui se trouvent après les filtres sortant du module d'exposition.

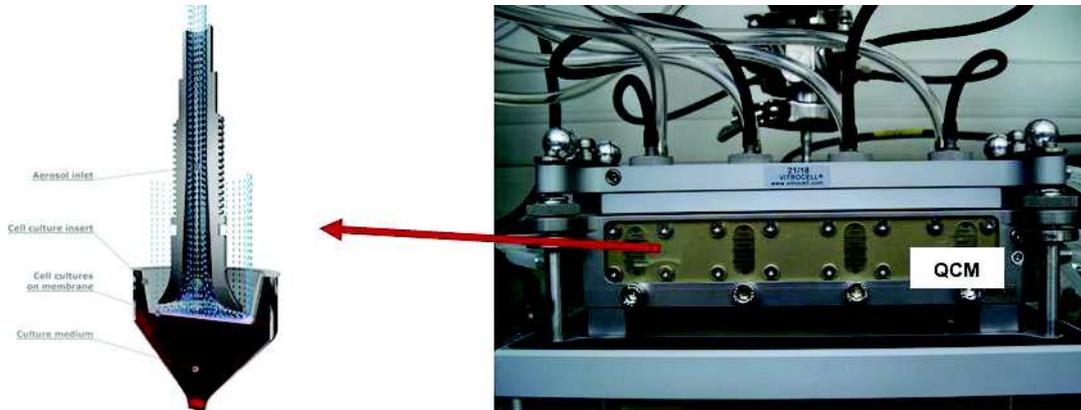


Figure 7. Module d'exposition

Figure 8. Microbalance Vitrocell ®

Microbalance

Sur le quatrième puits se trouve la microbalance - Quartz Crystal Microbalance (QCM) (Figure 8).

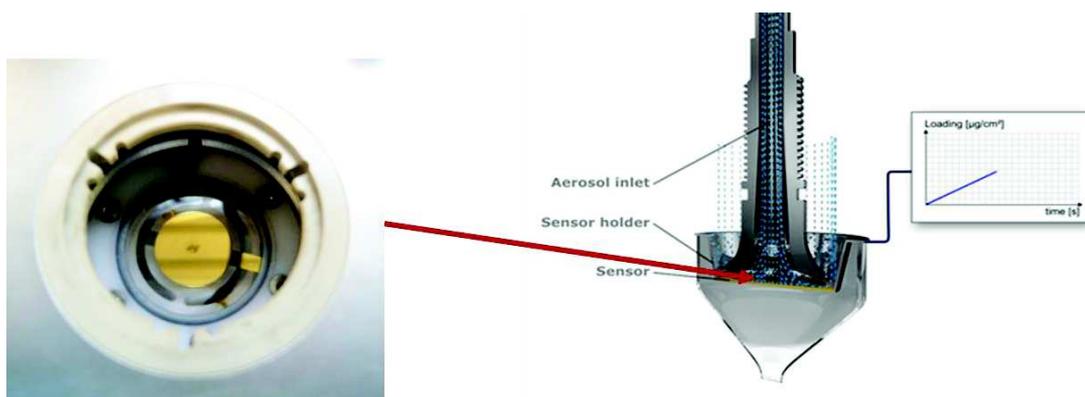


Figure 8. Microbalance Vitrocell ®

Le principe de mesure est basé sur la modification de la fréquence d'oscillation d'un cristal piézoélectrique, provoquée par une surcharge en masse. En effet, lorsqu'une

fine couche de matière est déposée à la surface d'un cristal de quartz, sa fréquence de résonance varie de façon proportionnelle à la masse de la couche déposée.

1.2.3 Module contrôle air

Afin d'évaluer l'effet du flux d'air sur le tapis cellulaire, un module contrôle air est installé en parallèle du module d'exposition. Celui-ci est réglé aux mêmes débits d'air que le module d'exposition mais il ne dispose que de trois puits. Les deux modules sont thermostatés grâce au chauffe-eau permettant le maintien des cellules à 37° C pendant les expositions.

Annexe 2. Calcul de l'efficacité du dépôt

Afin d'évaluer l'efficacité du dépôt de particules des trois points de fonctionnement, des mesures de l'aérosol à différentes dilutions ont été réalisées avec la microbalance (QCM) couplée au PPS. Ces mesures permettent par la suite de calculer l'efficacité du dépôt qui est le pourcentage de masse de particules déposée sur la microbalance lors du passage d'un flux d'aérosol dans le système. Cette masse est équivalente à celle qui se dépose sur les tapis cellulaires lors des expositions. L'ensemble des mesures est présenté sur la **Figure 1**.

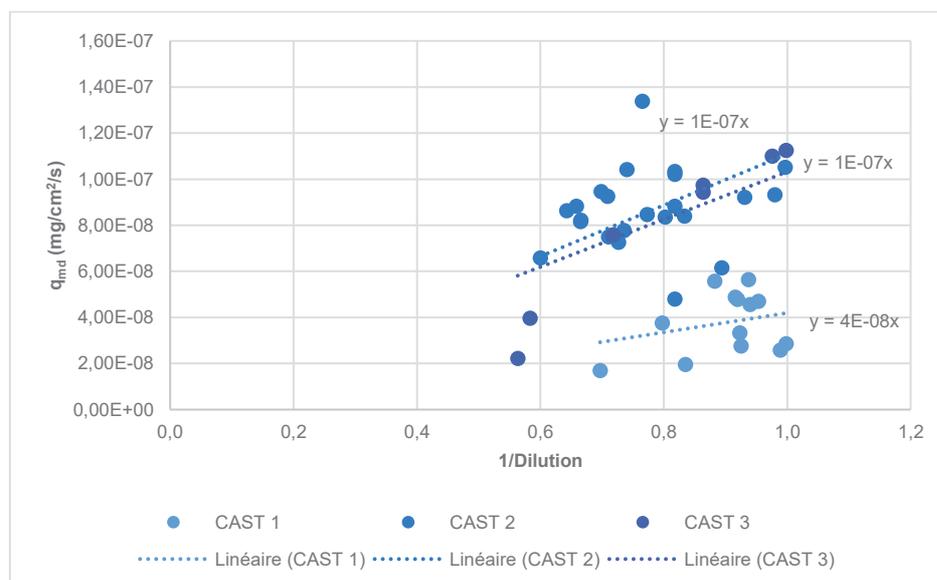


Figure 1. Dépôt de particules de différents points de fonctionnement

1/dilution : Dilution apportée, q_{md} : flux de masse déposée sur la microbalance QCM en mg/cm²/s

L'efficacité du dépôt (E) est calculée à partir de la formule suivante :

$$E = \frac{Pente * Sd}{q_{v\ sample} * C_s}$$

Où

E : Efficacité du dépôt (%)

Sd : Surface de l'insert (cm²)

C_s : Concentration massique (Kg/m³)

$q_{v\ sample}$: Débit volumique des échantillons (m³/s)

La **Figure 2** montre l'efficacité de dépôt (%) de particules de chaque point de fonctionnement ainsi calculé. L'efficacité du dépôt est plus importante avec le CAST3 (1,3%) qu'avec le CAST1 (0,291%). Le dépôt du point de fonctionnement CAST2 se trouve entre les deux (0,64 %). De façon plus générale, on remarque que l'efficacité reste modeste dans ces conditions.

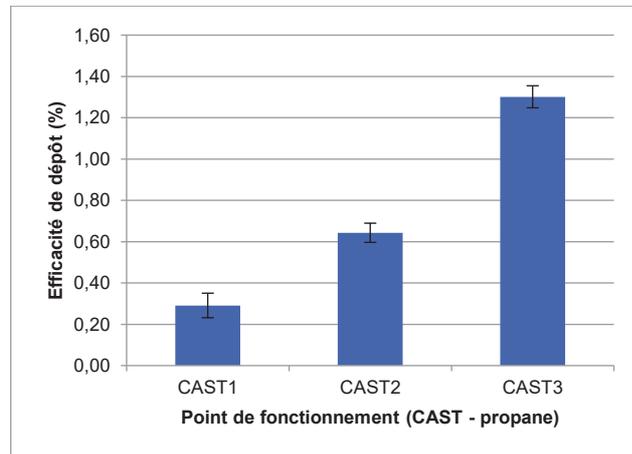


Figure 2. Efficacité du dépôt des différents points de fonctionnement du CAST-propane

Références

- ADEME, 2018. Émissions de particules et de NOx par les véhicules routiers [WWW Document]. ADEME. URL <https://www.ademe.fr/emissions-particules-nox-vehicules-routiers> (accessed 11.2.20).
- Adenuga, A.A., Wright, M.E., Atkinson, D.B., 2016. Evaluation of the reactivity of exhaust from various biodiesel blends as a measure of possible oxidative effects: A concern for human exposure. *Chemosphere* 147, 396–403. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.12.074>
- Adler, K.B., Tuvim, M.J., Dickey, B.F., 2013. Regulated Mucin Secretion from Airway Epithelial Cells. *Front. Endocrinol.* 4. <https://doi.org/10.3389/fendo.2013.00129>
- Ahmed, C.M.S., Yang, J., Chen, J.Y., Jiang, H., Cullen, C., Karavalakis, G., Lin, Y.-H., 2020. Toxicological responses in human airway epithelial cells (BEAS-2B) exposed to particulate matter emissions from gasoline fuels with varying aromatic and ethanol levels. *Sci. Total Environ.* 706, 135732. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135732>
- AIRPARIF, 2020. Airparif - Réglementation - Normes européennes [WWW Document]. URL <https://www.airparif.asso.fr/reglementation/normes-europeennes> (accessed 11.24.20).
- American Cancer Society, 2019. Lung Cancer Risk Factors | Smoking & Lung Cancer [WWW Document]. URL <https://www.cancer.org/cancer/lung-cancer/causes-risks-prevention/risk-factors.html> (accessed 5.29.20).
- ANSES, 2019. AVIS et RAPPORT révisé de l'Anses relatif à l'état des connaissances sur les particules de l'air ambiant (effets sanitaires associés à la composition chimique, émissions du trafic routier) | Anses - Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail [WWW Document]. URL <https://www.anses.fr/fr/content/avis-et-rapport-r%C3%A9vis%C3%A9-de-lanses-relatif-%C3%A0-l%E2%80%99%C3%A9tat-des-connaissances-sur-les-particules-de-l> (accessed 3.23.21).
- ANSES, 2013. AVIS de l'Anses relatif à la demande de dérogation au titre de l'article 15 de la Directive 98/8/CE pour l'utilisation du dioxyde de soufre (SO₂) en France pour un usage antiparasitaire. | Anses - Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail [WWW Document]. URL <https://www.anses.fr/fr/content/avis-de-lanses-relatif-%C3%A0-la-demande-de-d%C3%A9rogation-au-titre-de-l%E2%80%99article-15-de-la-directive> (accessed 11.13.20).
- ANSES, 2007. Avis et rapport de l'Afsset relatif à : la proposition de valeurs guides de qualité de l'air intérieur pour le monoxyde de carbone | Anses - Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail [WWW Document]. URL <https://www.anses.fr/fr/content/avis-et-rapport-de-lafsset-relatif-%C3%A0-la-proposition-de-valeurs-guides-de-qualit%C3%A9-de-lair> (accessed 11.13.20).
- Araujo, J.A., Nel, A.E., 2009. Particulate matter and atherosclerosis: role of particle size, composition and oxidative stress. *Part. Fibre Toxicol.* 6, 24. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-6-24>

- Associations between ultrafine and fine particles and mortality in five central European cities — Results from the UFIREG study, 2016. *Environ. Int.* 88, 44 – 52. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2015.12.006>
- Badran, G., Ledoux, F., Verdin, A., Abbas, I., Roumie, M., Genevray, P., Landkocz, Y., Lo Guidice, J.-M., Garçon, G., Courcot, D., 2020. Toxicity of fine and quasi-ultrafine particles: Focus on the effects of organic extractable and non-extractable matter fractions. *Chemosphere* 243, 125440. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125440>
- Baeza, A., Marano, F., 2007. Air pollution and respiratory diseases: a central role for oxidative stress. *Med. Sci. MS* 23, 497–501. <https://doi.org/10.1051/medsci/2007235497>
- Baeza-Squiban, A., 2014. [Physio-pathological impacts of inhaled nanoparticles]. *Biol. Aujourd'hui* 208, 151–158. <https://doi.org/10.1051/jbio/2014019>
- Baeza-Squiban, A., Lanone, S., 2011. Exposure, Uptake, and Barriers, in: Houdy, P., Lahmani, M., Marano, F. (Eds.), *Nanoethics and Nanotoxicology*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 37–61. https://doi.org/10.1007/978-3-642-20177-6_2
- Baglole, C.J., Sime, P.J., Phipps, R.P., 2008. Cigarette smoke-induced expression of heme oxygenase-1 in human lung fibroblasts is regulated by intracellular glutathione. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* 295, L624 – L636. <https://doi.org/10.1152/ajplung.90215.2008>
- Bai, L., Weichenthal, S., Kwong, J.C., Burnett, R.T., Hatzopoulou, M., Jerrett, M., van Donkelaar, A., Martin, R.V., Van Ryswyk, K., Lu, H., Kopp, A., Chen, H., 2019. Associations of Long-Term Exposure to Ultrafine Particles and Nitrogen Dioxide With Increased Incidence of Congestive Heart Failure and Acute Myocardial Infarction. *Am. J. Epidemiol.* 188, 151–159. <https://doi.org/10.1093/aje/kwy194>
- Barraud, C., Corbière, C., Pottier, I., Estace, E., Blanchard, K., Logie, C., Lagadu, S., Kéravec, V., Pottier, D., Dionnet, F., Morin, J.P., Préterre, D., André, V., Monteil, C., Sichel, F., 2017. Impact of after-treatment devices and biofuels on diesel exhausts genotoxicity in A549 cells exposed at air-liquid interface. *Toxicol. In Vitro, Safety Assessment invitro* 45, 426–433. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2017.04.025>
- Barrère, C., Hubert-Roux, M., Lange, C.M., Rejaibi, M., Kebir, N., Désilles, N., Lecamp, L., Burel, F., Loutelier-Bourhis, C., 2012. Solvent-based and solvent-free characterization of low solubility and low molecular weight polyamides by mass spectrometry: a complementary approach. *Rapid Commun. Mass Spectrom. RCM* 26, 1347 – 1354. <https://doi.org/10.1002/rcm.6231>
- Bates, J.T., Fang, T., Verma, V., Zeng, L., Weber, R.J., Tolbert, P.E., Abrams, J.Y., Sarnat, S.E., Klein, M., Mulholland, J.A., Russell, A.G., 2019. Review of Acellular Assays of Ambient Particulate Matter Oxidative Potential: Methods and Relationships with Composition, Sources, and Health Effects. *Environ. Sci. Technol.* 53, 4003 – 4019. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b03430>

- Bates, J.T., Weber, R.J., Abrams, J., Verma, V., Fang, T., Klein, M., Strickland, M.J., Sarnat, S.E., Chang, H.H., Mulholland, J.A., Tolbert, P.E., Russell, A.G., 2015. Reactive Oxygen Species Generation Linked to Sources of Atmospheric Particulate Matter and Cardiorespiratory Effects. *Environ. Sci. Technol.* 49, 13605–13612. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b02967>
- Baulig, A., Garlatti, M., Bonvallot, V., Marchand, A., Barouki, R., Marano, F., Baeza-Squiban, A., 2003. Involvement of reactive oxygen species in the metabolic pathways triggered by diesel exhaust particles in human airway epithelial cells. *Am. J. Physiol.-Lung Cell. Mol. Physiol.* 285, L671–L679. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00419.2002>
- Beischlag, T.V., Morales, J.L., Hollingshead, B.D., Perdew, G.H., 2008. The Aryl Hydrocarbon Receptor Complex and the Control of Gene Expression. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* 18, 207–250.
- Bell, M.L., Davis, D.L., 2001. Reassessment of the lethal London fog of 1952: novel indicators of acute and chronic consequences of acute exposure to air pollution. *Environ. Health Perspect.* 109, 389–394.
- Bengalli, R., Longhin, E., Marchetti, S., Proverbio, M.C., Battaglia, C., Camatini, M., 2017. The role of IL-6 released from pulmonary epithelial cells in diesel UFP-induced endothelial activation. *Environ. Pollut. Barking Essex* 1987 231, 1314 – 1321. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.08.104>
- Bengalli, R., Zerboni, A., Marchetti, S., Longhin, E., Priola, M., Camatini, M., Mantecca, P., 2019. In vitro pulmonary and vascular effects induced by different diesel exhaust particles. *Toxicol. Lett.* 306, 13–24. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2019.01.017>
- Bentayeb, M., Wagner, V., Stempfelet, M., Zins, M., Goldberg, M., Pascal, M., Larrieu, S., Beaudeau, P., Cassadou, S., Eilstein, D., Filleul, L., Le Tertre, A., Medina, S., Pascal, L., Prouvost, H., Quénel, P., Zeghnoun, A., Lefranc, A., 2015. Association between long-term exposure to air pollution and mortality in France: A 25-year follow-up study. *Environ. Int.* 85, 5–14. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2015.08.006>
- Berend, N., 2016. Contribution of air pollution to COPD and small airway dysfunction. *Respirol. Carlton Vic* 21, 237–244. <https://doi.org/10.1111/resp.12644>
- Berger, M.M., 2006. Manipulations nutritionnelles du stress oxydant : état des connaissances. *Nutr. Clin. Métabolisme* 20, 48–53. <https://doi.org/10.1016/j.nupar.2005.12.005>
- BéruBé, K., Prytherch, Z., Job, C., Hughes, T., 2010. Human primary bronchial lung cell constructs: The new respiratory models. *Toxicology, Highlights of the 2010 Annual Congress of The British Toxicology Society. Includes the Abstracts of the British Toxicology Society, Spring 2010* 278, 311–318. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2010.04.004>
- Bescond, A., Yon, J., Ouf, F.X., Ferry, D., Delhayé, D., Gaffié, D., Coppalle, A., Rozé, C., 2014. Automated Determination of Aggregate Primary Particle Size Distribution by TEM Image Analysis: Application to Soot. *Aerosol Sci. Technol.* 48, 831 – 841. <https://doi.org/10.1080/02786826.2014.932896>

- Bescond, A., Yon, J., Ouf, F.-X., Rozé, C., Coppalle, A., Parent, P., Ferry, D., Laffon, C., 2016. Soot optical properties determined by analyzing extinction spectra in the visible near-UV: Toward an optical speciation according to constituents and structure. *J. Aerosol Sci.* 101, 118–132. <https://doi.org/10.1016/j.jaerosci.2016.08.001>
- Bhowmick, R., Gappa-Fahlenkamp, H., 2016. Cells and Culture Systems Used to Model the Small Airway Epithelium. *Lung* 194, 419–428. <https://doi.org/10.1007/s00408-016-9875-2>
- Bishop, A.E., Polak, J.M., 2007. Chapter Seventy-Four - Lungs, in: Lanza, R., Langer, R., Vacanti, J. (Eds.), *Principles of Tissue Engineering (Third Edition)*. Academic Press, Burlington, pp. 1125–1133. <https://doi.org/10.1016/B978-012370615-7/50078-0>
- Bisig, C., Comte, P., Güdel, M., Czerwinski, J., Mayer, A., Müller, L., Petri-Fink, A., Rothen-Rutishauser, B., 2018. Assessment of lung cell toxicity of various gasoline engine exhausts using a versatile in vitro exposure system. *Environ. Pollut.* 235, 263 – 271. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.12.061>
- Bisig, C., Roth, M., Müller, L., Comte, P., Heeb, N., Mayer, A., Czerwinski, J., Petri-Fink, A., Rothen-Rutishauser, B., 2016. Hazard identification of exhausts from gasoline-ethanol fuel blends using a multi-cellular human lung model. *Environ. Res.* 151, 789 – 796. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2016.09.010>
- Biswas, S.K., Rahman, I., 2009. Environmental toxicity, redox signaling and lung inflammation: The role of glutathione. *Mol. Aspects Med., Glutathione in Health and Disease* 30, 60–76. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2008.07.001>
- Boldo, E., Medina, S., LeTertre, A., Hurley, F., Mücke, H.-G., Ballester, F., Aguilera, I., Eilstein, D., Apeis Group, 2006. Apeis: Health impact assessment of long-term exposure to PM(2.5) in 23 European cities. *Eur. J. Epidemiol.* 21, 449–458. <https://doi.org/10.1007/s10654-006-9014-0>
- Borgie, M., Dagher, Z., Ledoux, F., Verdin, A., Cazier, F., Martin, P., Hachimi, A., Shirali, P., Greige-Gerges, H., Courcot, D., 2015. Comparison between ultrafine and fine particulate matter collected in Lebanon: Chemical characterization, in vitro cytotoxic effects and metabolizing enzymes gene expression in human bronchial epithelial cells. *Environ. Pollut.* 205, 250–260. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.05.027>
- Borlaza, L.J.S., Cosep, E.M.R., Kim, S., Lee, K., Joo, H., Park, M., Bate, D., Cayetano, M.G., Park, K., 2018. Oxidative potential of fine ambient particles in various environments. *Environ. Pollut.* 243, 1679–1688. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.09.074>
- Borm, P.J.A., Kelly, F., Künzli, N., Schins, R.P.F., Donaldson, K., 2007. Oxidant generation by particulate matter: from biologically effective dose to a promising, novel metric. *Occup. Environ. Med.* 64, 73–74. <https://doi.org/10.1136/oem.2006.029090>
- Boublil, L., Assémat, E., Borot, M.-C., Boland, S., Martinon, L., Sciare, J., Baeza-Squiban, A., 2013. Development of a repeated exposure protocol of human bronchial epithelium in vitro to

- study the long-term effects of atmospheric particles. *Toxicol. Vitro Int. J. Publ. Assoc. BIBRA* 27, 533–542. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2012.11.008>
- Boucher, R.C., 2019. Muco-Obstructive Lung Diseases. *N. Engl. J. Med.* <https://doi.org/10.1056/NEJMra1813799>
- Bowatte, G., Lodge, C.J., Knibbs, L.D., Erbas, B., Perret, J.L., Jalaludin, B., Morgan, G.G., Bui, D.S., Giles, G.G., Hamilton, G.S., Wood-Baker, R., Thomas, P., Thompson, B.R., Matheson, M.C., Abramson, M.J., Walters, E.H., Dharmage, S.C., 2018. Traffic related air pollution and development and persistence of asthma and low lung function. *Environ. Int.* 113, 170–176. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.01.028>
- Brand, M.D., Nicholls, D.G., 2011. Assessing mitochondrial dysfunction in cells. *Biochem. J.* 435, 297–312. <https://doi.org/10.1042/BJ20110162>
- Bräuner, E.V., Forchhammer, L., Møller, P., Barregard, L., Gunnarsen, L., Afshari, A., Wåhlin, P., Glasius, M., Dragsted, L.O., Basu, S., Raaschou-Nielsen, O., Loft, S., 2008. Indoor Particles Affect Vascular Function in the Aged. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 177, 419–425. <https://doi.org/10.1164/rccm.200704-632OC>
- Brook, R.D., Rajagopalan, S., Pope, C.A., Brook, J.R., Bhatnagar, A., Diez-Roux, A.V., Holguin, F., Hong, Y., Luepker, R.V., Mittleman, M.A., Peters, A., Siscovick, D., Smith, S.C., Whitsel, L., Kaufman, J.D., American Heart Association Council on Epidemiology and Prevention, Council on the Kidney in Cardiovascular Disease, and Council on Nutrition, Physical Activity and Metabolism, 2010. Particulate matter air pollution and cardiovascular disease: An update to the scientific statement from the American Heart Association. *Circulation* 121, 2331–2378. <https://doi.org/10.1161/CIR.0b013e3181dbee1>
- Broust, F., Girard, P., Steene, L.V.D., 2013. Biocarburants de seconde génération et bioraffinerie [WWW Document]. Ref TIP958WEB - Innov. Technol. URL <https://www.techniques-ingenieur.fr/base-documentaire/innovation-th10/innovations-en-energie-et-environnement-42503210/biocarburants-de-seconde-generation-et-bioraffinerie-re110/> (accessed 5.7.20).
- Bruijne, K. de, Ebersviller, S., Sexton, K.G., Lake, S., Leith, D., Goodman, R., Jetters, J., Walters, G.W., Doyle-Eisele, M., Woodside, R., Jeffries, H.E., Jaspers, I., 2009. Design and Testing of Electrostatic Aerosol In Vitro Exposure System (EAVES): An Alternative Exposure System for Particles. *Inhal. Toxicol.* 21, 91–101. <https://doi.org/10.1080/08958370802166035>
- Calas, A., Uzu, G., Martins, J.M.F., Voisin, D., Spadini, L., Lacroix, T., Jaffrezo, J.-L., 2017. The importance of simulated lung fluid (SLF) extractions for a more relevant evaluation of the oxidative potential of particulate matter. *Sci. Rep.* 7, 11617. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11979-3>
- Castell, J.V., Teresa Donato, M., Gómez-Lechón, M.J., 2005. Metabolism and bioactivation of toxicants in the lung. The in vitro cellular approach. *Exp. Toxicol. Pathol.* 57, 189–204. <https://doi.org/10.1016/j.etp.2005.05.008>

- Cavanaugh, K.J., Oswari, J., Margulies, S.S., 2001. Role of Stretch on Tight Junction Structure in Alveolar Epithelial Cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 25, 584 – 591. <https://doi.org/10.1165/ajrcmb.25.5.4486>
- Chen, L., Deng, H., Cui, H., Fang, J., Zuo, Z., Deng, J., Li, Y., Wang, X., Zhao, L., 2017. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget* 9, 7204–7218. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.23208>
- Chen, L., Gao, K., Zhang, C., Lang, W., 2019. Chapter 2 - Alternative fuels for IC engines and jet engines and comparison of their gaseous and particulate matter emissions, in: Azad, A.K., Rasul, M. (Eds.), *Advanced Biofuels*, Woodhead Publishing Series in Energy. Woodhead Publishing, pp. 17–64. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102791-2.00002-7>
- Chen, R., Hu, B., Liu, Y., Xu, J., Yang, G., Xu, D., Chen, C., 2016. Beyond PM2.5: The role of ultrafine particles on adverse health effects of air pollution. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj., SI: Air Pollution* 1860, 2844–2855. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2016.03.019>
- Cho, C.-H., Chiu, N.-C., Ho, C.-S., Peng, C.-C., 2008. Carbon Monoxide Poisoning in Children. *Pediatr. Neonatol.* 49, 121–5. [https://doi.org/10.1016/S1875-9572\(08\)60026-1](https://doi.org/10.1016/S1875-9572(08)60026-1)
- Cho, H.-K., Park, C.-G., Shin, H.-J., Park, K.-H., Lim, H.-B., 2018. Comparison of the in vitro toxicological activity of various particulate matter. *Toxicol. Ind. Health* 34, 99 – 109. <https://doi.org/10.1177/0748233717749694>
- Cho, H.-Y., Kleeberger, S.R., 2010. Nrf2 protects against airway disorders. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 244, 43–56. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2009.07.024>
- Choi, B., Jiang, X., 2015. Individual hydrocarbons and particulate matter emission from a turbocharged CRDI diesel engine fueled with n-butanol/diesel blends. *Fuel* 154, 188–195. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2015.03.084>
- Choudhary, M., Malek, G., 2020. The Aryl Hydrocarbon Receptor: A Mediator and Potential Therapeutic Target for Ocular and Non-Ocular Neurodegenerative Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 6777. <https://doi.org/10.3390/ijms21186777>
- Churg, A., Brauer, M., del Carmen Avila-Casado, M., Fortoul, T.I., Wright, J.L., 2003. Chronic exposure to high levels of particulate air pollution and small airway remodeling. *Environ. Health Perspect.* 111, 714–718.
- CITEPA, 2020. Secten [WWW Document]. Citepa. URL <https://www.citepa.org/fr/secten/> (accessed 11.2.20).
- Clippinger, A.J., Allen, D., Jarabek, A.M., Corvaro, M., Gaça, M., Gehen, S., Hotchkiss, J.A., Patlewicz, G., Melbourne, J., Hinderliter, P., Yoon, M., Huh, D., Lowit, A., Buckley, B., Bartels, M., BéruBé, K., Wilson, D.M., Indans, I., Vinken, M., 2018. Alternative approaches for acute inhalation toxicity testing to address global regulatory and non-regulatory data requirements: An international workshop report. *Toxicol. In Vitro* 48, 53 – 70. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2017.12.011>

- Costabile, F., Gualtieri, M., Ancona, C., Canepari, S., Decesari, S., 2020. Ultrafine Particle Features Associated with Pro-Inflammatory and Oxidative Responses: Implications for Health Studies. *Atmosphere* 11, 414. <https://doi.org/10.3390/atmos11040414>
- Coumoul, X., 2017. *Toxicologie*. Dunod.
- Crobeddu, B., Aragao-Santiago, L., Bui, L.-C., Boland, S., Baeza Squiban, A., 2017. Oxidative potential of particulate matter 2.5 as predictive indicator of cellular stress. *Environ. Pollut. Barking Essex* 1987 230, 125–133. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.06.051>
- Crobeddu, B., Baudrimont, I., Deweirdt, J., Sciare, J., Badel, A., Camproux, A.-C., Bui, L.C., Baeza-Squiban, A., 2020. Lung Antioxidant Depletion: A Predictive Indicator of Cellular Stress Induced by Ambient Fine Particles. *Environ. Sci. Technol.* 54, 2360 – 2369. <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b05990>
- Croft, D.P., Cameron, S.J., Morrell, C.N., Lowenstein, C.J., Ling, F., Zareba, W., Hopke, P.K., Utell, M.J., Thurston, S.W., Thevenet-Morrison, K., Evans, K.A., Chalupa, D., Rich, D.Q., 2017. Associations between ambient wood smoke and other particulate pollutants and biomarkers of systemic inflammation, coagulation and thrombosis in cardiac patients. *Environ. Res.* 154, 352–361. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2017.01.027>
- Cui, Y., Chen, G., Yang, Z., 2020. Mitochondrial superoxide mediates PM2.5-induced cytotoxicity in human pulmonary lymphatic endothelial cells. *Environ. Pollut.* 263, 114423. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114423>
- Dai, X., He, X., Zhou, Z., Chen, J., Wei, S., Chen, R., Yang, B., Feng, W., Shan, A., Wu, T., Guo, H., 2015. Short-term effects of air pollution on out-of-hospital cardiac arrest in Shenzhen, China. *Int. J. Cardiol.* 192, 56–60. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2015.05.016>
- Daiber, A., Kuntic, M., Hahad, O., Delogu, L.G., Rohrbach, S., Di Lisa, F., Schulz, R., Münzel, T., 2020. Effects of air pollution particles (ultrafine and fine particulate matter) on mitochondrial function and oxidative stress – Implications for cardiovascular and neurodegenerative diseases. *Arch. Biochem. Biophys.* 696, 108662. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2020.108662>
- Dalle-Donne, I., Garavaglia, M.L., Colombo, G., Astori, E., Lionetti, M.C., La Porta, C.A.M., Santucci, A., Rossi, R., Giustarini, D., Milzani, A., 2020. Cigarette smoke and glutathione: Focus on in vitro cell models. *Toxicol. In Vitro* 65, 104818. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2020.104818>
- Dalton, T.P., Puga, A., Shertzer, H.G., 2002. Induction of cellular oxidative stress by aryl hydrocarbon receptor activation. *Chem. Biol. Interact.* 141, 77 – 95. [https://doi.org/10.1016/S0009-2797\(02\)00067-4](https://doi.org/10.1016/S0009-2797(02)00067-4)
- Dieselnet, 2019. Emission Standards: Europe: Cars and Light Trucks [WWW Document]. URL <https://dieselnet.com/standards/eu/ld.php> (accessed 11.25.20).
- Dijkema, M.B.A., van Strien, R.T., van der Zee, S.C., Mallant, S.F., Fischer, P., Hoek, G., Brunekreef, B., Gehring, U., 2016. Spatial variation in nitrogen dioxide concentrations and cardiopulmonary hospital admissions. *Environ. Res.* 151, 721 – 727. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2016.09.008>

- Directive 2009/28/CE, n.d. Directive 2009/28/CE du Parlement européen et du Conseil du 23 avril 2009 relative à la promotion de l'utilisation de l'énergie produite à partir de sources renouvelables et modifiant puis abrogeant les directives 2001/77/CE et 2003/30/CE.
- Doğan, O., 2011. The influence of n-butanol/diesel fuel blends utilization on a small diesel engine performance and emissions. *Fuel*. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2011.02.033>
- Dunican, E.M., Elicker, B.M., Gierada, D.S., Nagle, S.K., Schiebler, M.L., Newell, J.D., Raymond, W.W., Lachowicz-Scroggins, M.E., Di Maio, S., Hoffman, E.A., Castro, M., Fain, S.B., Jarjour, N.N., Israel, E., Levy, B.D., Erzurum, S.C., Wenzel, S.E., Meyers, D.A., Bleecker, E.R., Phillips, B.R., Mauger, D.T., Gordon, E.D., Woodruff, P.G., Peters, M.C., Fahy, J.V., 2018. Mucus plugs in patients with asthma linked to eosinophilia and airflow obstruction. *J. Clin. Invest.* 128, 997–1009. <https://doi.org/10.1172/JCI95693>
- Epithelix, Innovative In Vitro Solutions for Respiratory Diseases and Chemical Testing [WWW Document], n.d. URL <https://www.epithelix.com/> (accessed 8.5.20).
- Ess, M.N., Vasilatou, K., 2019. Characterization of a new miniCAST with diffusion flame and premixed flame options: Generation of particles with high EC content in the size range 30 nm to 200 nm. *Aerosol Sci. Technol.* 53, 29 – 44. <https://doi.org/10.1080/02786826.2018.1536818>
- Falcon-Rodriguez, C.I., Osornio-Vargas, A.R., Sada-Ovalle, I., Segura-Medina, P., 2016. Aeroparticles, Composition, and Lung Diseases. *Front. Immunol.* 7. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00003>
- Farina, F., Lonati, E., Milani, C., Massimino, L., Ballarini, E., Donzelli, E., Crippa, L., Marmiroli, P., Botto, L., Corsetto, P.A., Sancini, G., Bulbarelli, A., Palestini, P., 2019. In Vivo Comparative Study on Acute and Sub-acute Biological Effects Induced by Ultrafine Particles of Different Anthropogenic Sources in BALB/c Mice. *Int. J. Mol. Sci.* 20. <https://doi.org/10.3390/ijms20112805>
- Favier, A., 2003. Le stress oxydant : intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique - L'Actualité Chimique [WWW Document]. URL <https://www.lactualitechimique.org/Le-stress-oxydant-interet-conceptuel-et-experimental-dans-la-comprehension-des-mecanismes-des> (accessed 12.7.20).
- Fenger, J., 2009. Air pollution in the last 50 years – From local to global. *Atmos. Environ., Atmospheric Environment - Fifty Years of Endeavour* 43, 13 – 22. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2008.09.061>
- First choice for in vitro toxicology at the air-liquid interface [WWW Document], n.d. . Cultex. URL <https://www.cultex-technology.com/> (accessed 8.7.20).
- Fizeşan, I., Chary, A., Cambier, S., Moschini, E., Serchi, T., Nelissen, I., Kiss, B., Pop, A., Loghin, F., Gutleb, A.C., 2018. Responsiveness assessment of a 3D tetra-culture alveolar model

- exposed to diesel exhaust particulate matter. *Toxicol. In Vitro* 53, 67 – 79.
<https://doi.org/10.1016/j.tiv.2018.07.019>
- Frias, D.P., Gomes, R.L.N., Yoshizaki, K., Carvalho-Oliveira, R., Matsuda, M., Junqueira, M. de S., Teodoro, W.R., Vasconcellos, P. de C., Pereira, D.C. de A., Conceição, P.R. da, Saldiva, P.H.N., Mauad, T., Macchione, M., 2020. Nrf2 positively regulates autophagy antioxidant response in human bronchial epithelial cells exposed to diesel exhaust particles. *Sci. Rep.* 10, 3704.
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-59930-3>
- Frijns, E., Verstraelen, S., Stoehr, L.C., Van Laer, J., Jacobs, A., Peters, J., Tirez, K., Boyles, M.S.P., Geppert, M., Madl, P., Nelissen, I., Duschl, A., Himly, M., 2017. A Novel Exposure System Termed NAVETTA for In Vitro Laminar Flow Electrodeposition of Nanoaerosol and Evaluation of Immune Effects in Human Lung Reporter Cells. *Environ. Sci. Technol.* 51, 5259–5269. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b00493>
- Fuchs, P., Perez-Pinzon, M.A., Dave, K.R., 2014. Chapter 2 - Cerebral Ischemia in Diabetics and Oxidative Stress, in: Preedy, V.R. (Ed.), *Diabetes: Oxidative Stress and Dietary Antioxidants*. Academic Press, San Diego, pp. 15 – 23. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-405885-9.00002-4>
- Fujii, T., Hayashi, S., Hogg, J.C., Vincent, R., Van Eeden, S.F., 2001. Particulate Matter Induces Cytokine Expression in Human Bronchial Epithelial Cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 25, 265–271. <https://doi.org/10.1165/ajrcmb.25.3.4445>
- Fukai, T., Ushio-Fukai, M., 2011. Superoxide Dismutases: Role in Redox Signaling, Vascular Function, and Diseases. *Antioxid. Redox Signal.* 15, 1583 – 1606.
<https://doi.org/10.1089/ars.2011.3999>
- Furue, M., Takahara, M., Nakahara, T., Uchi, H., 2014. Role of AhR/ARNT system in skin homeostasis. *Arch. Dermatol. Res.* 306, 769–779. <https://doi.org/10.1007/s00403-014-1481-7>
- Gagnepain, B., 2016. Biocarburants [WWW Document]. Ref TIP202WEB - Ressour. Énergétiques Stock. URL <https://www.techniques-ingenieur.fr/base-documentaire/energies-th4/energies-renouvelables-42594210/biocarburants-be8550/> (accessed 5.6.20).
- Gangwar, R.S., Bevan, G.H., Palanivel, R., Das, L., Rajagopalan, S., 2020. Oxidative stress pathways of air pollution mediated toxicity: Recent insights. *Redox Biol.* 34, 101545.
<https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101545>
- Gao, D., Ripley, S., Weichenthal, S., Godri Pollitt, K.J., 2020. Ambient particulate matter oxidative potential: Chemical determinants, associated health effects, and strategies for risk management. *Free Radic. Biol. Med., Air Pollution: Consequences for Cellular Redox Signaling, Antioxidant Defenses and Disease* 151, 7 – 25.
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.04.028>
- Gauderman, W.J., Avol, E., Gilliland, F., Vora, H., Thomas, D., Berhane, K., McConnell, R., Kuenzli, N., Lurmann, F., Rappaport, E., Margolis, H., Bates, D., Peters, J., 2004. The Effect of Air

- Pollution on Lung Development from 10 to 18 Years of Age. *N. Engl. J. Med.* 351, 1057–1067.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa040610>
- Gautheron, D.C., 1984. Mitochondrial Oxidative Phosphorylation and Respiratory Chain: Review, in: Addison, G.M., Chalmers, R.A., Divry, P., Harkness, R.A., Pollitt, R.J. (Eds.), *Organic Acidurias: Proceedings of the 21st Annual Symposium of the SSIEM, Lyon, September 1983* The Combined Supplements 1 and 2 of *Journal of Inherited Metabolic Disease* Volume 7 (1984). Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 57–61. https://doi.org/10.1007/978-94-009-5612-4_13
- George, S., Chua, M.L., ZheWei, D.Z., Das, R., Bijin, V.A., Connolly, J.E., Lee, K.P., Yung, C.F., Teoh, O.H., Thomas, B., 2020. Personal level exposure and hazard potential of particulate matter during haze and non-haze periods in Singapore. *Chemosphere* 243, 125401. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125401>
- Ghio, A.J., Carraway, M.S., Madden, M.C., 2012. Composition of air pollution particles and oxidative stress in cells, tissues, and living systems. *J. Toxicol. Environ. Health B Crit. Rev.* 15, 1–21. <https://doi.org/10.1080/10937404.2012.632359>
- Graber, M., Mohr, S., Baptiste, L., Duloquin, G., Blanc-Labarre, C., Mariet, A.S., Giroud, M., Béjot, Y., 2019. Air pollution and stroke. A new modifiable risk factor is in the air. *Rev. Neurol. (Paris)* 175, 619–624. <https://doi.org/10.1016/j.neurol.2019.03.003>
- Grice, S., Stedman, J., Kent, A., Hobson, M., Norris, J., Abbott, J., Cooke, S., 2009. Recent trends and projections of primary NO₂ emissions in Europe. *Atmos. Environ.* 43, 2154 – 2167. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2009.01.019>
- Grilli, A., Bengalli, R., Longhin, E., Capasso, L., Proverbio, M.C., Forcato, M., Bicciato, S., Gualtieri, M., Battaglia, C., Camatini, M., 2018. Transcriptional profiling of human bronchial epithelial cell BEAS-2B exposed to diesel and biomass ultrafine particles. *BMC Genomics* 19, 302. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-4679-9>
- Gualtieri, M., Grollino, M.G., 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., 2018. 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* 207, 552 – 564. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.05.130>
- Haleng, J., Pincemail, J., Defraigne, J.-O., Charlier, C., Chapelle, J.-P., 2007. Le stress oxydant. *Rev. Médicale Liège* 62.
- Hameed, S., Zhao, J., Zare, R.N., 2020. Ambient PM particles reach mouse brain, generate ultrastructural hallmarks of neuroinflammation, and stimulate amyloid deposition, tangles, and plaque formation. *Talanta Open* 2, 100013. <https://doi.org/10.1016/j.talo.2020.100013>
- Hamra, G.B., Guha, N., Cohen, A., Laden, F., Raaschou-Nielsen, O., Samet, J.M., Vineis, P., Forastiere, F., Saldiva, P., Yorifuji, T., Loomis, D., 2014. Outdoor particulate matter exposure

- and lung cancer: a systematic review and meta-analysis. *Environ. Health Perspect.* 122, 906–911. <https://doi.org/10.1289/ehp/1408092>
- Harmon, A.C., Hebert, V.Y., Cormier, S.A., Subramanian, B., Reed, J.R., Backes, W.L., Dugas, T.R., 2018. Particulate matter containing environmentally persistent free radicals induces AhR-dependent cytokine and reactive oxygen species production in human bronchial epithelial cells. *PLOS ONE* 13, e0205412. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205412>
- Hawley, B., L'Orange, C., Olsen, D.B., Marchese, A.J., Volckens, J., 2014a. Oxidative Stress and Aromatic Hydrocarbon Response of Human Bronchial Epithelial Cells Exposed to Petro- or Biodiesel Exhaust Treated with a Diesel Particulate Filter. *Toxicol. Sci.* 141, 505–514. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfu147>
- Hawley, B., McKenna, D., Marchese, A., Volckens, J., 2014b. Time course of bronchial cell inflammation following exposure to diesel particulate matter using a modified EAVES. *Toxicol. In Vitro* 28, 829–837. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2014.03.001>
- Hernandez-Saavedra, D., Swain, K., Tuder, R., Petersen, S.V., Nozik-Grayck, E., 2017. Redox Regulation of the Superoxide Dismutases SOD3 and SOD2 in the Pulmonary Circulation, in: Wang, Y.-X. (Ed.), *Pulmonary Vasculature Redox Signaling in Health and Disease*, *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer International Publishing, Cham, pp. 57–70. https://doi.org/10.1007/978-3-319-63245-2_5
- Hiura, T.S., Kaszubowski, M.P., Li, N., Nel, A.E., 1999. Chemicals in diesel exhaust particles generate reactive oxygen radicals and induce apoptosis in macrophages. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 163, 5582–5591.
- Hsu, C.S., Lobodin, V.V., Rodgers, R.P., McKenna, A.M., Marshall, A.G., 2011. Compositional Boundaries for Fossil Hydrocarbons. *Energy Fuels* 25, 2174 – 2178. <https://doi.org/10.1021/ef2004392>
- Huang, F., Pan, B., Wu, J., Chen, E., Chen, L., 2017. Relationship between exposure to PM_{2.5} and lung cancer incidence and mortality: A meta-analysis. *Oncotarget* 8, 43322 – 43331. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.17313>
- Hunt, A., Abraham, J.L., Judson, B., Berry, C.L., 2003. Toxicologic and epidemiologic clues from the characterization of the 1952 London smog fine particulate matter in archival autopsy lung tissues. *Environ. Health Perspect.* 111, 1209–1214.
- Hussain, M.R.M., Asfour, H., Yasir, M., Khan, A., Mohamoud, H.S.A., Al-Aama, J.Y., 2013. The Microbial Pathology of Neu5Ac and Gal Epitopes. *J. Carbohydr. Chem.* 32, 169–183. <https://doi.org/10.1080/07328303.2013.793773>
- Hussain, M.R.M., Hoessli, D.C., Fang, M., 2016. N -acetylgalactosaminyltransferases in cancer. *Oncotarget* 7, 54067–54081. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.10042>
- Hussar, E., Richards, S., Lin, Z.-Q., Dixon, R.P., Johnson, K.A., 2012. Human Health Risk Assessment of 16 Priority Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Soils of Chattanooga, Tennessee, USA. *Water. Air. Soil Pollut.* 223, 5535–5548. <https://doi.org/10.1007/s11270-012-1265-7>

- IARC, 2013. Diesel and Gasoline Engine Exhausts and Some Nitroarenes.
- IARC, n.d. Outdoor Air Pollution.
- Ibald-Mulli, A., Wichmann, H.-E., Kreyling, W., Peters, A., 2002. Epidemiological Evidence on Health Effects of Ultrafine Particles. *J. Aerosol Med.* 15, 189 – 201. <https://doi.org/10.1089/089426802320282310>
- INERIS, 2011. INERIS - Dioxyde de soufre [WWW Document]. URL <https://substances.ineris.fr/fr/substance/nom/dioxyde-de-soufre> (accessed 11.13.20).
- INRS, 2020. Oxydes d'azote (FT 133). Généralités - Fiche toxicologique - INRS [WWW Document]. URL http://www.inrs.fr/publications/bdd/fichetox/fiche.html?refINRS=FICHETOX_133 (accessed 11.3.20).
- INRS, 2006. Dioxyde de soufre (FT 41). Généralités - Fiche toxicologique - INRS [WWW Document]. URL http://www.inrs.fr/publications/bdd/fichetox/fiche.html?refINRS=FICHETOX_41 (accessed 11.3.20).
- INSERM, 2015. Asthme [WWW Document]. Inserm - Sci. Pour Santé. URL <https://www.inserm.fr/information-en-sante/dossiers-information/asthme> (accessed 2.6.21).
- Iqbal, H.M.N., Kyazze, G., Keshavarz, T., 2013. Advances in the Valorization of Lignocellulosic Materials by Biotechnology: An Overview. *BioResources* 8, 3157–3176.
- Jacobson, R.S., Korte, A.R., Vertes, A., Miller, J.H., 2020. The Molecular Composition of Soot. *Angew. Chem. Int. Ed.* 59, 4484–4490. <https://doi.org/10.1002/anie.201914115>
- Jancic, S.A., Stosic, B.Z., 2014. Chapter Fourteen - Cadmium Effects on the Thyroid Gland, in: Litwack, G. (Ed.), *Vitamins & Hormones, Endocrine Disrupters*. Academic Press, pp. 391–425. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800095-3.00014-6>
- Jaramillo, I.C., Sturrock, A., Ghiassi, H., Woller, D.J., Deering-Rice, C.E., Lighty, J.S., Paine, R., Reilly, C., Kelly, K.E., 2018. Effects of fuel components and combustion particle physicochemical properties on toxicological responses of lung cells. *J. Environ. Sci. Health Part A* 53, 295–309. <https://doi.org/10.1080/10934529.2017.1400793>
- Ji, J., Upadhyay, S., Xiong, X., Malmlöf, M., Sandström, T., Gerde, P., Palmberg, L., 2018. Multi-cellular human bronchial models exposed to diesel exhaust particles: assessment of inflammation, oxidative stress and macrophage polarization. *Part. Fibre Toxicol.* 15. <https://doi.org/10.1186/s12989-018-0256-2>
- Jin, X., Su, H., Ding, G., Sun, Z., Li, Z., 2019. Exposure to ambient fine particles causes abnormal energy metabolism and ATP decrease in lung tissues. *Chemosphere* 224, 29 – 38. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.02.116>
- Jin, X., Xue, B., Zhou, Q., Su, R., Li, Z., 2018. Mitochondrial damage mediated by ROS incurs bronchial epithelial cell apoptosis upon ambient PM_{2.5} exposure. *J. Toxicol. Sci.* 43, 101 – 111. <https://doi.org/10.2131/jts.43.101>

- Jinhui, X., Lee, F.S.C., 2000. Quantification of nitrated polynuclear aromatic hydrocarbons in atmospheric particulate matter. *Anal. Chim. Acta* 416, 111 – 115. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(00\)00745-5](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(00)00745-5)
- Juarez-Facio, A.T., Castilla, C., Corbière, C., Lavanant, H., Afonso, C., Morin, C., Merlet-Machour, N., Chevalier, L., Vaugeois, J.-M., Yon, J., Monteil, C., 2021a. Development of a standardized in vitro approach to evaluate microphysical, chemical, and toxicological properties of combustion-derived fine and ultrafine particles. *J. Environ. Sci.*
- Juarez-Facio, A.T., Yon, J., Corbière, C., Rogez-Florent, T., Castilla, C., Lavanant, H., Mignot, M., Devouge-Boyer, C., Logie, C., Chevaillier, L., Vaugeois, J.-M., Monteil, C., 2021b. Toxicological impact of organic ultrafine particles (UFPs) in human bronchial epithelial BEAS-2B cells at air-liquid interface. *Vitro Toxicol.*
- Karoui, A., Crochemore, C., Harouki, N., Corbière, C., Preterre, D., Vendeville, C., Richard, V., Fardel, O., Lecureur, V., Vaugeois, J.-M., Sichel, F., Mulder, P., Monteil, C., 2020. Nitrogen Dioxide Inhalation Exposures Induce Cardiac Mitochondrial Reactive Oxygen Species Production, Impair Mitochondrial Function and Promote Coronary Endothelial Dysfunction. *Int. J. Environ. Res. Public. Health* 17, 5526. <https://doi.org/10.3390/ijerph17155526>
- Kazmi, H.R., Avadhani, N.G., 2020. Role of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Aryl Hydrocarbon Receptor Activation in Bone Loss, in: Zaidi, M. (Ed.), *Encyclopedia of Bone Biology*. Academic Press, Oxford, pp. 311–318. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.11198-5>
- Kelly, F., 2003. Oxidative stress: its role in air pollution and adverse health effects. *Occup. Environ. Med.* 60, 612–616. <https://doi.org/10.1136/oem.60.8.612>
- Khaniabadi, Y.O., Goudarzi, G., Daryanoosh, S.M., Borgini, A., Tittarelli, A., De Marco, A., 2017. Exposure to PM10, NO2, and O3 and impacts on human health. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 24, 2781–2789. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-8038-6>
- Klein, S.G., Cambier, S., Hennen, J., Legay, S., Serchi, T., Nelissen, I., Chary, A., Moschini, E., Krein, A., Blömeke, B., Gutleb, A.C., 2017. Endothelial responses of the alveolar barrier in vitro in a dose-controlled exposure to diesel exhaust particulate matter. *Part. Fibre Toxicol.* 14. <https://doi.org/10.1186/s12989-017-0186-4>
- Knebel, J.W., Ritter, D., Aufderheide, M., 2002. Exposure of human lung cells to native diesel motor exhaust— development of an optimized in vitro test strategy. *Toxicol. In Vitro* 16, 185–192. [https://doi.org/10.1016/S0887-2333\(01\)00110-2](https://doi.org/10.1016/S0887-2333(01)00110-2)
- Kohse - Höinghaus, K., Oßwald, P., Cool, T.A., Kasper, T., Hansen, N., Qi, F., Westbrook, C.K., Westmoreland, P.R., 2010. Biofuel Combustion Chemistry: From Ethanol to Biodiesel. *Angew. Chem. Int. Ed.* 49, 3572–3597. <https://doi.org/10.1002/anie.200905335>
- Kooter, I.M., Alblas, M.J., Jedynska, A.D., Steenhof, M., Houtzager, M.M.G., Ras, M. van, 2013. Alveolar epithelial cells (A549) exposed at the air–liquid interface to diesel exhaust: First

- study in TNO ' s powertrain test center. *Toxicol. In Vitro* 27, 2342 – 2349. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2013.10.007>
- Kravchenko, J., Akushevich, I., Abernethy, A.P., Holman, S., Ross, W.G., Lyster, H.K., 2014. Long-term dynamics of death rates of emphysema, asthma, and pneumonia and improving air quality. *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.* 9, 613 – 627. <https://doi.org/10.2147/COPD.S59995>
- Kreyling, W.G., Semmler-Behnke, M., Seitz, J., Scymczak, W., Wenk, A., Mayer, P., Takenaka, S., Oberdörster, G., 2009. Size dependence of the translocation of inhaled iridium and carbon nanoparticle aggregates from the lung of rats to the blood and secondary target organs. *Inhal. Toxicol.* 21 Suppl 1, 55–60. <https://doi.org/10.1080/08958370902942517>
- Kumar, P., Nagarajan, A., Uchil, P.D., 2018. Analysis of Cell Viability by the Lactate Dehydrogenase Assay. *Cold Spring Harb. Protoc.* 2018. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot095497>
- Kumar, S., Verma, M.K., Srivastava, A.K., 2013. Ultrafine particles in urban ambient air and their health perspectives. *Rev. Environ. Health* 28, 117–128. <https://doi.org/10.1515/reveh-2013-0008>
- Künzi, L., Krapf, M., Daher, N., Dommen, J., Jeannet, N., Schneider, S., Platt, S., Slowik, J.G., Baumlin, N., Salathe, M., Prévôt, A.S.H., Kalberer, M., Strähl, C., Dübgen, L., Sioutas, C., Baltensperger, U., Geiser, M., 2015. Toxicity of aged gasoline exhaust particles to normal and diseased airway epithelia. *Sci. Rep.* 5. <https://doi.org/10.1038/srep11801>
- Kwon, H.-S., Ryu, M.H., Carlsten, C., 2020. Ultrafine particles: unique physicochemical properties relevant to health and disease. *Exp. Mol. Med.* 52, 318 – 328. <https://doi.org/10.1038/s12276-020-0405-1>
- Låg, M., Ovrevik, J., Refsnes, M., Holme, J., 2020. Potential role of polycyclic aromatic hydrocarbons in air pollution-induced non-malignant respiratory diseases. *Respir. Res.* 21. <https://doi.org/10.1186/s12931-020-01563-1>
- Lai, H.-K., Tsang, H., Wong, C.-M., 2013. Meta-analysis of adverse health effects due to air pollution in Chinese populations. *BMC Public Health* 13, 360. <https://doi.org/10.1186/1471-2458-13-360>
- Langrish, J.P., Li, X., Wang, S., Lee, M.M.Y., Barnes, G.D., Miller, M.R., Cassee, F.R., Boon, N.A., Donaldson, K., Li, J., Li, L., Mills, N.L., Newby, D.E., Jiang, L., 2012. Reducing Personal Exposure to Particulate Air Pollution Improves Cardiovascular Health in Patients with Coronary Heart Disease. *Environ. Health Perspect.* 120, 367 – 372. <https://doi.org/10.1289/ehp.1103898>
- Langrish, J.P., Mills, N.L., Chan, J.K., Leseman, D.L., Aitken, R.J., Fokkens, P.H., Cassee, F.R., Li, J., Donaldson, K., Newby, D.E., Jiang, L., 2009. Beneficial cardiovascular effects of reducing exposure to particulate air pollution with a simple facemask. *Part. Fibre Toxicol.* 6, 8. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-6-8>

- Lapuerta, M., Armas, O., Rodríguez-Fernández, J., 2008. Effect of biodiesel fuels on diesel engine emissions. *Prog. Energy Combust. Sci.* 34, 198 – 223. <https://doi.org/10.1016/j.pecs.2007.07.001>
- Lavrich, K.S., Corteselli, E.M., Wages, P.A., Bromberg, P.A., Simmons, S.O., Gibbs-Flournoy, E.A., Samet, J.M., 2018. Investigating mitochondrial dysfunction in human lung cells exposed to redox-active PM components. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 342, 99 – 107. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2018.01.024>
- Leclercq, B., Kluza, J., Antherieu, S., Sotty, J., Alleman, L.Y., Perdrix, E., Loyens, A., Coddeville, P., Lo Guidice, J.-M., Marchetti, P., Garçon, G., 2018. Air pollution-derived PM_{2.5} impairs mitochondrial function in healthy and chronic obstructive pulmonary diseased human bronchial epithelial cells. *Environ. Pollut.* 243, 1434 – 1449. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.09.062>
- Lee, W.-J., Wang, Y.-F., Lin, T.-C., Chen, Y.-Y., Lin, W.-C., Ku, C.-C., Cheng, J.-T., 1995. PAH characteristics in the ambient air of traffic-source. *Sci. Total Environ.* 159, 185–200. [https://doi.org/10.1016/0048-9697\(95\)04323-S](https://doi.org/10.1016/0048-9697(95)04323-S)
- Leikauf, G.D., Kim, S.-H., Jang, A.-S., 2020. Mechanisms of ultrafine particle-induced respiratory health effects. *Exp. Mol. Med.* 52, 329–337. <https://doi.org/10.1038/s12276-020-0394-0>
- Lelieveld, J., Klingmüller, K., Pozzer, A., Pöschl, U., Fnais, M., Daiber, A., Münzel, T., 2019. Cardiovascular disease burden from ambient air pollution in Europe reassessed using novel hazard ratio functions. *Eur. Heart J.* 40, 1590 – 1596. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehz135>
- Lemaire, R., Therssen, E., Desgroux, P., 2010. Effect of ethanol addition in gasoline and gasoline–surrogate on soot formation in turbulent spray flames. *Fuel* 89, 3952 – 3959. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2010.06.031>
- Li, N., Georas, S., Alexis, N., Fritz, P., Xia, T., Williams, M.A., Horner, E., Nel, A., 2016. A work group report on ultrafine particles (American Academy of Allergy, Asthma & Immunology): Why ambient ultrafine and engineered nanoparticles should receive special attention for possible adverse health outcomes in human subjects. *J. Allergy Clin. Immunol.* 138, 386–396. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.02.023>
- Li, N., Sioutas, C., Cho, A., Schmitz, D., Misra, C., Sempf, J., Wang, M., Oberley, T., Froines, J., Nel, A., 2003. Ultrafine particulate pollutants induce oxidative stress and mitochondrial damage. *Environ. Health Perspect.* 111, 455–460.
- Li Ning, Sioutas Constantinos, Cho Arthur, Schmitz Debra, Misra Chandan, Sempf Joan, Wang Meiying, Oberley Terry, Froines John, Nel Andre, 2003. Ultrafine particulate pollutants induce oxidative stress and mitochondrial damage. *Environ. Health Perspect.* 111, 455–460. <https://doi.org/10.1289/ehp.6000>

- Lin, M., Yu, J.Z., 2019. Dithiothreitol (DTT) concentration effect and its implications on the applicability of DTT assay to evaluate the oxidative potential of atmospheric aerosol samples. *Environ. Pollut.* 251, 938–944. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.05.074>
- Lin, Y.-C., Li, Y.-C., Amesho, K.T.T., Chou, F.-C., Cheng, P.-C., 2019. Characterization and quantification of PM2.5 emissions and PAHs concentration in PM2.5 from the exhausts of diesel vehicles with various accumulated mileages. *Sci. Total Environ.* 660, 188–198. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.01.007>
- Lipka, J., Semmler-Behnke, M., Sperling, R.A., Wenk, A., Takenaka, S., Schleh, C., Kissel, T., Parak, W.J., Kreyling, W.G., 2010. Biodistribution of PEG-modified gold nanoparticles following intratracheal instillation and intravenous injection. *Biomaterials* 31, 6574 – 6581. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.05.009>
- Liu, J.-Y., Hsiao, T.-C., Lee, K.-Y., Chuang, H.-C., Cheng, T.-J., Chuang, K.-J., 2018. Association of ultrafine particles with cardiopulmonary health among adult subjects in the urban areas of northern Taiwan. *Sci. Total Environ.* 627, 211 – 215. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.01.218>
- Liu, N.M., Miyashita, L., Maher, B.A., McPhail, G., Jones, C.J.P., Barratt, B., Thangaratinam, S., Karloukovski, V., Ahmed, I.A., Aslam, Z., Grigg, J., 2021. Evidence for the presence of air pollution nanoparticles in placental tissue cells. *Sci. Total Environ.* 751, 142235. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142235>
- Loi n° 96-1236 du 30 décembre 1996 sur l'air et l'utilisation rationnelle de l'énergie, n.d.
- Longhin, E., Gualtieri, M., Capasso, L., Bengalli, R., Mollerup, S., Holme, J.A., Øvrevik, J., Casadei, S., Di Benedetto, C., Parenti, P., Camatini, M., 2016. Physico-chemical properties and biological effects of diesel and biomass particles. *Environ. Pollut. Barking Essex* 1987 215, 366–375. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.05.015>
- Loret, T., 2017. Capacité de modèles in vitro de complexité différente à prédire les réponses toxiques pulmonaires observées in vivo après exposition aiguë à des nanoparticules de TiO2 et de CeO2 226.
- Loret, T., Peyret, E., Dubreuil, M., Aguerre-Chariol, O., Bressot, C., le Bihan, O., Amodeo, T., Trouiller, B., Braun, A., Egles, C., Lacroix, G., 2016. Air-liquid interface exposure to aerosols of poorly soluble nanomaterials induces different biological activation levels compared to exposure to suspensions. *Part. Fibre Toxicol.* 13, 58. <https://doi.org/10.1186/s12989-016-0171-3>
- Lundqvist, M., Stigler, J., Cedervall, T., Berggård, T., Flanagan, M.B., Lynch, I., Elia, G., Dawson, K., 2011. The evolution of the protein corona around nanoparticles: a test study. *ACS Nano* 5, 7503–7509. <https://doi.org/10.1021/nn202458g>
- Ma, Q., 2013. Role of Nrf2 in Oxidative Stress and Toxicity. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 53, 401–426. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-011112-140320>
- Malorni, L., Guida, V., Sirignano, M., Genovese, G., Petrarca, C., Pedata, P., 2017. Exposure to sub-10nm particles emitted from a biodiesel-fueled diesel engine: In vitro toxicity and

- inflammatory potential. *Toxicol. Lett.* 270, 51 – 61.
<https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2017.02.009>
- Mamakos, A., Khalek, I., Giannelli, R., Spears, M., 2013. Characterization of Combustion Aerosol Produced by a Mini-CAST and Treated in a Catalytic Stripper. *Aerosol Sci. Technol.* 47, 927–936. <https://doi.org/10.1080/02786826.2013.802762>
- Mannucci, P.M., Harari, S., Martinelli, I., Franchini, M., 2015. Effects on health of air pollution: a narrative review. *Intern. Emerg. Med.* 10, 657–662. <https://doi.org/10.1007/s11739-015-1276-7>
- Manojkumar, N., Srimuruganandam, B., Shiva Nagendra, S.M., 2019. Application of multiple-path particle dosimetry model for quantifying age specified deposition of particulate matter in human airway. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 168, 241 – 248.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.10.091>
- Marhaba, I., Ferry, D., Laffon, C., Regier, T.Z., Ouf, F.-X., Parent, P., 2019. Aircraft and MiniCAST soot at the nanoscale. *Combust. Flame* 204, 278 – 289.
<https://doi.org/10.1016/j.combustflame.2019.03.018>
- MatTek Corporation | Biotechnology Company [WWW Document], n.d. . MatTek Life Sci. URL <https://www.mattek.com/> (accessed 8.5.20).
- Mavin, E., Verdon, B., Carrie, S., Saint-Criq, V., Powell, J., Kuttruff, C.A., Ward, C., Garnett, J.P., Miwa, S., 2020. Real-time measurement of cellular bioenergetics in fully differentiated human nasal epithelial cells grown at air-liquid-interface. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* 318, L1158–L1164. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00414.2019>
- Miller, F.J., Asgharian, B., Schroeter, J.D., Price, O., 2016. Improvements and additions to the Multiple Path Particle Dosimetry model. *J. Aerosol Sci., Inhaled Particle Dosimetry* 99, 14–26. <https://doi.org/10.1016/j.jaerosci.2016.01.018>
- Mistry, A., Bowen, L.E., Dzierlenga, M.W., Hartman, J.K., Slattery, S.D., 2020. Development of an in vitro approach to point-of-contact inhalation toxicity testing of volatile compounds, using organotypic culture and air-liquid interface exposure. *Toxicol. In Vitro* 69, 104968.
<https://doi.org/10.1016/j.tiv.2020.104968>
- Mohamed, A.-M.O., Maraqa, M.A., Howari, F.M., Paleologos, E.K., 2021. Chapter 9 - Outdoor air pollutants: sources, characteristics, and impact on human health and the environment, in: Mohamed, A.-M.O., Paleologos, E.K., Howari, F.M. (Eds.), *Pollution Assessment for Sustainable Practices in Applied Sciences and Engineering*. Butterworth-Heinemann, pp. 491–554. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809582-9.00009-8>
- Møller, P., Danielsen, P.H., Karotki, D.G., Jantzen, K., Roursgaard, M., Klingberg, H., Jensen, D.M., Christophersen, D.V., Hemmingsen, J.G., Cao, Y., Loft, S., 2014. Oxidative stress and inflammation generated DNA damage by exposure to air pollution particles. *Mutat. Res. Mutat. Res.* 762, 133–166. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2014.09.001>

- Moore, R.H., Ziemba, L.D., Dutcher, D., Beyersdorf, A.J., Chan, K., Crumeyrolle, S., Raymond, T.M., Thornhill, K.L., Winstead, E.L., Anderson, B.E., 2014. Mapping the Operation of the Miniature Combustion Aerosol Standard (Mini-CAST) Soot Generator. *Aerosol Sci. Technol.* 48, 467–479. <https://doi.org/10.1080/02786826.2014.890694>
- Moufarrej, L., Courcot, D., Ledoux, F., 2020. Assessment of the PM_{2.5} oxidative potential in a coastal industrial city in Northern France: Relationships with chemical composition, local emissions and long range sources. *Sci. Total Environ.* 748, 141448. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141448>
- Mülhopt, S., Dilger, M., Diabaté, S., Schlager, C., Krebs, T., Zimmermann, R., Buters, J., Oeder, S., Wäscher, T., Weiss, C., Paur, H.-R., 2016. Toxicity testing of combustion aerosols at the air–liquid interface with a self-contained and easy-to-use exposure system. *J. Aerosol Sci.* 96, 38–55. <https://doi.org/10.1016/j.jaerosci.2016.02.005>
- Mülhopt, S., Paur, H.-R., Diabaté, S., Krug, H.F., 2008. In Vitro Testing of Inhalable Fly Ash at the Air Liquid Interface, in: Kim, Y.J., Platt, U. (Eds.), *Advanced Environmental Monitoring*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 402–414. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6364-0_31
- Mullins, J.T., n.d. Pollution de l'air et asthme : ce que nous révèle le grand smog de Londres de 1952 [WWW Document]. *The Conversation*. URL <http://theconversation.com/pollution-de-lair-et-asthme-ce-que-nous-revele-le-grand-smog-de-londres-de-1952-65179> (accessed 4.7.20).
- Munawer, M.E., 2018. Human health and environmental impacts of coal combustion and post-combustion wastes. *J. Sustain. Min.* 17, 87–96. <https://doi.org/10.1016/j.jsm.2017.12.007>
- Murphy Elizabeth, Ardehali Hossein, Balaban Robert S., DiLisa Fabio, Dorn Gerald W., Kitsis Richard N., Otsu Kinya, Ping Peipei, Rizzuto Rosario, Sack Michael N., Wallace Douglas, Youle Richard J., 2016. Mitochondrial Function, Biology, and Role in Disease. *Circ. Res.* 118, 1960–1991. <https://doi.org/10.1161/RES.000000000000104>
- Nebert, D.W., Dalton, T.P., Okey, A.B., Gonzalez, F.J., 2004. Role of Aryl Hydrocarbon Receptor-mediated Induction of the CYP1 Enzymes in Environmental Toxicity and Cancer*. *J. Biol. Chem.* 279, 23847–23850. <https://doi.org/10.1074/jbc.R400004200>
- Nemery, B., Hoet, P.H., Nemmar, A., 2001. The Meuse Valley fog of 1930: an air pollution disaster. *The Lancet* 357, 704–708. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)04135-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)04135-0)
- Niemann, B., Rohrbach, S., Miller, M.R., Newby, D.E., Fuster, V., Kovacic, J.C., 2017. Oxidative Stress and Obesity, Diabetes, Smoking, and Pollution: Part 3 of a 3-Part Series. *J. Am. Coll. Cardiol.* 70, 230–251. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2017.05.043>
- Ning, Z., Sillanpää, M., Pakbin, P., Sioutas, C., 2008. Field evaluation of a new particle concentrator-electrostatic precipitator system for measuring chemical and toxicological properties of particulate matter. *Part. Fibre Toxicol.* 5, 15. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-5-15>

- Nolfi-Donagan, D., Braganza, A., Shiva, S., 2020. Mitochondrial electron transport chain: Oxidative phosphorylation, oxidant production, and methods of measurement. *Redox Biol.* 101674. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101674>
- Nuvolone, D., Petri, D., Voller, F., 2018. The effects of ozone on human health. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 25, 8074–8088. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9239-3>
- Obaidullah, M., Bram, S., Ruyck, J., 2018. An Overview of PM Formation Mechanisms from Residential Biomass Combustion and Instruments Using in PM Measurements 12, 50.
- Oberdörster, G., Finkelstein, J.N., Johnston, C., Gelein, R., Cox, C., Baggs, R., Elder, A.C., 2000. Acute pulmonary effects of ultrafine particles in rats and mice. *Res. Rep. Health Eff. Inst.* 5–74; disc. 75–86.
- Oberdörster, G., Oberdörster, E., Oberdörster, J., 2005. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ. Health Perspect.* 113, 823–839. <https://doi.org/10.1289/ehp.7339>
- Oeder, S., Kanashova, T., Sippula, O., Sapcariu, S.C., Streibel, T., Arteaga-Salas, J.M., Passig, J., Dilger, M., Paur, H.-R., Schlager, C., Mülhopt, S., Diabaté, S., Weiss, C., Stengel, B., Rabe, R., Harndorf, H., Torvela, T., Jokiniemi, J.K., Hirvonen, M.-R., Schmidt-Weber, C., Traidl-Hoffmann, C., Bérubé, K.A., Wlodarczyk, A.J., Prytherch, Z., Michalke, B., Krebs, T., Prévôt, A.S.H., Kelbg, M., Tiggesbäumker, J., Karg, E., Jakobi, G., Scholtes, S., Schnelle-Kreis, J., Lintelmann, J., Matuschek, G., Sklorz, M., Klingbeil, S., Orasche, J., Richthammer, P., Müller, L., Elsasser, M., Reda, A., Gröger, T., Weggler, B., Schwemer, T., Czech, H., Rüger, C.P., Abbaszade, G., Radischat, C., Hiller, K., Buters, J.T.M., Dittmar, G., Zimmermann, R., 2015. Particulate Matter from Both Heavy Fuel Oil and Diesel Fuel Shipping Emissions Show Strong Biological Effects on Human Lung Cells at Realistic and Comparable In Vitro Exposure Conditions. *PLoS ONE* 10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126536>
- Ohura, T., Amagai, T., Fusaya, M., Matsushita, H., 2004. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Indoor and Outdoor Environments and Factors Affecting Their Concentrations. *Environ. Sci. Technol.* 38, 77–83. <https://doi.org/10.1021/es030512o>
- Okubo, T., Hosaka, M., Nakae, D., 2015. In vitro effects induced by diesel exhaust at an air–liquid interface in a human lung alveolar carcinoma cell line A549. *Exp. Toxicol. Pathol.* 67, 383–388. <https://doi.org/10.1016/j.etp.2015.03.004>
- OMS | Pollution de l'air [WWW Document], n.d. . WHO. URL http://www.who.int/topics/air_pollution/fr/ (accessed 4.7.20).
- Øvrevik, J., 2019. Oxidative Potential Versus Biological Effects: A Review on the Relevance of Cell-Free/Abiotic Assays as Predictors of Toxicity from Airborne Particulate Matter. *Int. J. Mol. Sci.* 20. <https://doi.org/10.3390/ijms20194772>
- Øvrevik, J., Refsnes, M., Låg, M., Holme, J.A., Schwarze, P.E., 2015. Activation of Proinflammatory Responses in Cells of the Airway Mucosa by Particulate Matter: Oxidant- and Non-Oxidant-

- Mediated Triggering Mechanisms. *Biomolecules* 5, 1399 – 1440.
<https://doi.org/10.3390/biom5031399>
- Palma, F.R., He, C., Danes, J.M., Paviani, V., Coelho, D.R., Gantner, B.N., Bonini, M.G., 2020. Mitochondrial Superoxide Dismutase: What the Established, the Intriguing, and the Novel Reveal About a Key Cellular Redox Switch. *Antioxid. Redox Signal.* 32, 701 – 714.
<https://doi.org/10.1089/ars.2019.7962>
- Pascal, M., Wagner, V., Chatignoux, E., Falq, G., Corso, M., Blanchard, M., Host, S., Larrieu, S., Pascal, L., Declercq, C., 2012. Ozone and short-term mortality in nine French cities: Influence of temperature and season. *Atmos. Environ.* 62, 566 – 572.
<https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2012.09.009>
- Pattenden, S., Armstrong, B., Milojevic, A., Heal, M.R., Chalabi, Z., Doherty, R., Barratt, B., Kovats, R.S., Wilkinson, P., 2010. Ozone, heat and mortality: acute effects in 15 British conurbations. *Occup. Environ. Med.* 67, 699–707. <https://doi.org/10.1136/oem.2009.051714>
- Paur, H.-R., Cassee, F.R., Teeguarden, J., Fissan, H., Diabate, S., Aufderheide, M., Kreyling, W.G., Hänninen, O., Kasper, G., Riediker, M., Rothen-Rutishauser, B., Schmid, O., 2011. In-vitro cell exposure studies for the assessment of nanoparticle toxicity in the lung—A dialog between aerosol science and biology. *J. Aerosol Sci.* 42, 668 – 692.
<https://doi.org/10.1016/j.jaerosci.2011.06.005>
- Peel, J.L., Tolbert, P.E., Klein, M., Metzger, K.B., Flanders, W.D., Todd, K., Mulholland, J.A., Ryan, P.B., Frumkin, H., 2005. Ambient Air Pollution and Respiratory Emergency Department Visits. *Epidemiology* 16, 164–174. <https://doi.org/10.1097/01.ede.0000152905.42113.db>
- Penn, A., Murphy, G., Barker, S., Henk, W., Penn, L., 2005. Combustion-Derived Ultrafine Particles Transport Organic Toxicants to Target Respiratory Cells. *Environ. Health Perspect.* 113, 956–963. <https://doi.org/10.1289/ehp.7661>
- Platel, A., Privat, K., Talahari, S., Delobel, A., Dourdin, G., Gateau, E., Simar, S., Saleh, Y., Sotty, J., Antherieu, S., Canivet, L., Alleman, L.-Y., Perdrix, E., Garçon, G., Denayer, F.O., Lo Guidice, J.M., Nessler, F., 2020. Study of in vitro and in vivo genotoxic effects of air pollution fine (PM_{2.5-0.18}) and quasi-ultrafine (PM_{0.18}) particles on lung models. *Sci. Total Environ.* 711, 134666. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134666>
- Pope, C.A., Bates, D.V., Raizenne, M.E., 1995. Health effects of particulate air pollution: time for reassessment? *Environ. Health Perspect.* 103, 472–480.
- Pope, C.A., Burnett, R.T., Thun, M.J., Calle, E.E., Krewski, D., Ito, K., Thurston, G.D., 2002. Lung Cancer, Cardiopulmonary Mortality, and Long-term Exposure to Fine Particulate Air Pollution. *JAMA J. Am. Med. Assoc.* 287, 1132–1141.
- Pope, C.A., Dockery, D.W., 2006. Health effects of fine particulate air pollution: lines that connect. *J. Air Waste Manag. Assoc.* 1995 56, 709 – 742.
<https://doi.org/10.1080/10473289.2006.10464485>

- Prakash, Y.S., Pabelick, C.M., Sieck, G.C., 2017. Mitochondrial Dysfunction in Airway Disease. *Chest* 152, 618–626. <https://doi.org/10.1016/j.chest.2017.03.020>
- Raaschou-Nielsen, O., Andersen, Z.J., Beelen, R., Samoli, E., Stafoggia, M., Weinmayr, G., Hoffmann, B., Fischer, P., Nieuwenhuijsen, M.J., Brunekreef, B., Xun, W.W., Katsouyanni, K., Dimakopoulou, K., Sommar, J., Forsberg, B., Modig, L., Oudin, A., Oftedal, B., Schwarze, P.E., Nafstad, P., De Faire, U., Pedersen, N.L., Östenson, C.-G., Fratiglioni, L., Penell, J., Korek, M., Pershagen, G., Eriksen, K.T., Sørensen, M., Tjønneland, A., Ellermann, T., Eeftens, M., Peeters, P.H., Meliefste, K., Wang, M., Bueno-de-Mesquita, B., Key, T.J., de Hoogh, K., Concin, H., Nagel, G., Vilier, A., Gioni, S., Krogh, V., Tsai, M.-Y., Ricceri, F., Sacerdote, C., Galassi, C., Migliore, E., Ranzi, A., Cesaroni, G., Badaloni, C., Forastiere, F., Tamayo, I., Amiano, P., Dorronsoro, M., Trichopoulou, A., Bamia, C., Vineis, P., Hoek, G., 2013. Air pollution and lung cancer incidence in 17 European cohorts: prospective analyses from the European Study of Cohorts for Air Pollution Effects (ESCAPE). *Lancet Oncol.* 14, 813–822. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(13\)70279-1](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(13)70279-1)
- Rakopoulos, C.D., Antonopoulos, K.A., Rakopoulos, D.C., 2007. Experimental heat release analysis and emissions of a HSDI diesel engine fueled with ethanol–diesel fuel blends. *Energy* 32, 1791–1808. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2007.03.005>
- Rayner, R.E., Makena, P., Prasad, G.L., Cormet-Boyaka, E., 2019. Optimization of Normal Human Bronchial Epithelial (NHBE) Cell 3D Cultures for in vitro Lung Model Studies. *Sci. Rep.* 9. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36735-z>
- Reboul, C., Boissière, J., André, L., Meyer, G., Bideaux, P., Fouret, G., Feillet-Coudray, C., Obert, P., Lacampagne, A., Thireau, J., Cazorla, O., Richard, S., 2017. Carbon monoxide pollution aggravates ischemic heart failure through oxidative stress pathway. *Sci. Rep.* 7. <https://doi.org/10.1038/srep39715>
- Reboul, C., Thireau, J., Meyer, G., André, L., Obert, P., Cazorla, O., Richard, S., 2012. Carbon monoxide exposure in the urban environment: An insidious foe for the heart? *Respir. Physiol. Neurobiol., Gasotransmitters and Respiration: Consequences in Health and Disease* 184, 204–212. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2012.06.010>
- Recent advances in microfluidic technologies for organ-on-a-chip, 2019. . *TrAC Trends Anal. Chem.* 117, 146–156. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.06.005>
- Rizza, V., Stabile, L., Vistocco, D., Russi, A., Pardi, S., Buonanno, G., 2019. Effects of the exposure to ultrafine particles on heart rate in a healthy population. *Sci. Total Environ.* 650, 2403–2410. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.09.385>
- Rock, J.R., Randell, S.H., Hogan, B.L.M., 2010. Airway basal stem cells: a perspective on their roles in epithelial homeostasis and remodeling. *Dis. Model. Mech.* 3, 545 – 556. <https://doi.org/10.1242/dmm.006031>
- Rossner, P., Cervena, T., Vojtisek-Lom, M., Vrbova, K., Ambroz, A., Novakova, Z., Elzeinova, F., Margaryan, H., Beranek, V., Pechout, M., Macoun, D., Klema, J., Rossnerova, A., Ciganek, M., Topinka, J., 2019. The Biological Effects of Complete Gasoline Engine Emissions

- Exposure in a 3D Human Airway Model (MucilAir™) and in Human Bronchial Epithelial Cells (BEAS-2B). *Int. J. Mol. Sci.* 20. <https://doi.org/10.3390/ijms20225710>
- Rubio, V., Zhang, J., Valverde, M., Rojas, E., Shi, Z.-Z., 2011. Essential role of Nrf2 in protection against hydroquinone- and benzoquinone-induced cytotoxicity. *Toxicol. In Vitro* 25, 521–529. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2010.10.021>
- Rynning, I., Neca, J., Vrbova, K., Libalova, H., Rossner, P., Holme, J.A., Gützkow, K.B., Afanou, A.K.J., Arnoldussen, Y.J., Hrubá, E., Skare, Ø., Haugen, A., Topinka, J., Machala, M., Møllerup, S., 2018. In Vitro Transformation of Human Bronchial Epithelial Cells by Diesel Exhaust Particles: Gene Expression Profiling and Early Toxic Responses. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* 166, 51–64. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfy183>
- Savic, N., Rahman, M.M., Miljevic, B., Saathoff, H., Naumann, K.H., Leisner, T., Riches, J., Gupta, B., Motta, N., Ristovski, Z.D., 2016. Influence of biodiesel fuel composition on the morphology and microstructure of particles emitted from diesel engines. *Carbon* 104, 179–189. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2016.03.061>
- Schnelle, J., Jänsch, T., Wolf, K., Gebefügi, I., Kettrup, A., 1995. Particle size dependent concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in the outdoor air. *Chemosphere* 31, 3119–3127. [https://doi.org/10.1016/0045-6535\(95\)00170-D](https://doi.org/10.1016/0045-6535(95)00170-D)
- Schraufnagel, D.E., 2020. The health effects of ultrafine particles. *Exp. Mol. Med.* 52, 311–317. <https://doi.org/10.1038/s12276-020-0403-3>
- Schröder, O., Krahl, J., Munack, A., Bünger, J., 1999. Environmental and Health Effects Caused by the Use of Biodiesel. *SAE Trans.* 108, 1756–1766.
- Schwartz, J., 1989. Lung function and chronic exposure to air pollution: A cross-sectional analysis of NHANES II. *Environ. Res.* 50, 309–321. [https://doi.org/10.1016/S0013-9351\(89\)80012-X](https://doi.org/10.1016/S0013-9351(89)80012-X)
- Seriani, R., de Souza, C.E.C., Krempel, P.G., Frias, D.P., Matsuda, M., Correia, A.T., Ferreira, M.Z.J., Alencar, A.M., Negri, E.M., Saldiva, P.H.N., Mauad, T., Macchione, M., 2016. Human bronchial epithelial cells exposed in vitro to diesel exhaust particles exhibit alterations in cell rheology and cytotoxicity associated with decrease in antioxidant defenses and imbalance in pro- and anti-apoptotic gene expression. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 23, 9862–9870. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6228-x>
- Shang, Y., Sun, Z., Cao, J., Wang, X., Zhong, L., Bi, X., Li, H., Liu, W., Zhu, T., Huang, W., 2013. Systematic review of Chinese studies of short-term exposure to air pollution and daily mortality. *Environ. Int.* 54, 100–111. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2013.01.010>
- Shin, H.-J., Cho, H.G., Park, C.K., Park, K.H., Lim, H.B., 2017. Comparative In Vitro Biological Toxicity of Four Kinds of Air Pollution Particles. *Toxicol. Res.* 33, 305–313. <https://doi.org/10.5487/TR.2017.33.4.305>
- Siegmann, K., Hepp, H., Sattler, K., 1995. Reactive Dimerization: A New PAH Growth Mechanism in Flames. *Combust. Sci. Technol.* 109, 165–181. <https://doi.org/10.1080/00102209508951900>

- Siegmann, K., Sattler, K., 1999. Formation mechanism for polycyclic aromatic hydrocarbons in methane flames. *J. Chem. Phys.* 112, 698–709. <https://doi.org/10.1063/1.480648>
- Sies, H., 2015. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biol.* 4, 180–183. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.01.002>
- Sies, H., 1997. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp. Physiol.* 82, 291 – 295. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.1997.sp004024>
- Sies, H., Jones, D., 2007. Oxidative Stress*, in: Fink, G. (Ed.), *Encyclopedia of Stress* (Second Edition). Academic Press, New York, pp. 45–48. <https://doi.org/10.1016/B978-012373947-6.00285-3>
- Sillanpää, M., Geller, M.D., Phuleria, H.C., Sioutas, C., 2008. High collection efficiency electrostatic precipitator for in vitro cell exposure to concentrated ambient particulate matter (PM). *J. Aerosol Sci.* 39, 335–347. <https://doi.org/10.1016/j.jaerosci.2007.12.001>
- Sivarethinamohan, R., Sujatha, S., Priya, S., Sankaran, Gafoor, A., Rahman, Z., 2020. Impact of air pollution in health and socio-economic aspects: Review on future approach. *Mater. Today Proc.* <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.08.540>
- Sotty, J., 2019. Toxicité in vitro des particules atmosphériques fines et ultrafines : focus sur les bronchopneumopathies chroniques et la fonction mitochondriale (These de doctorat). Lille 2.
- Sotty, J., Garçon, G., Denayer, F.-O., Alleman, L.-Y., Saleh, Y., Perdrix, E., Riffault, V., Dubot, P., Lo-Guidice, J.-M., Canivet, L., 2019. 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.* 176, 108538. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.108538>
- Sotty, J., Kluza, J., De Sousa, C., Tardivel, M., Anthérieu, S., Alleman, L.-Y., Canivet, L., Perdrix, E., Loyens, A., Marchetti, P., Lo Guidice, J.-M., Garçon, G., 2020. Mitochondrial alterations triggered by repeated exposure to fine (PM_{2.5-0.18}) and quasi-ultrafine (PM_{0.18}) fractions of ambient particulate matter. *Environ. Int.* 142, 105830. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.105830>
- Steenenbergh, P.A., Zonnenberg, J.A.J., Dormans, J.A.M.A., Joon, P.N.T., Wouters, I.M., Bree, L. van, Scheepers, P.T.J., Loveren, H.V., 1998. Diesel Exhaust Particles Induced Release of Interleukin 6 and 8 by (Primed) Human Bronchial Epithelial Cells (Beas 2b) In Vitro. *Exp. Lung Res.* 24, 85–100. <https://doi.org/10.3109/01902149809046056>
- Stewart, C.E., Torr, E.E., Mohd Jamili, N.H., Bosquillon, C., Sayers, I., 2012a. Evaluation of Differentiated Human Bronchial Epithelial Cell Culture Systems for Asthma Research [WWW Document]. *J. Allergy*. <https://doi.org/10.1155/2012/943982>
- Stewart, C.E., Torr, E.E., Mohd Jamili, N.H., Bosquillon, C., Sayers, I., 2012b. Evaluation of Differentiated Human Bronchial Epithelial Cell Culture Systems for Asthma Research. *J. Allergy* 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/943982>

- Suzuki, M., Otsuki, A., Keleku-Lukwete, N., Yamamoto, M., 2016. Overview of redox regulation by Keap1–Nrf2 system in toxicology and cancer. *Curr. Opin. Toxicol., Oxidative Toxicology* 1, 29–36. <https://doi.org/10.1016/j.cotox.2016.10.001>
- Terzano, C., Stefano, F., Conti, V., Graziani, E., Petroianni, A., 2010. Air pollution ultrafine particles: Toxicity beyond the lung. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 14, 809–21.
- Tian, L., Shang, Y., Chen, R., Bai, R., Chen, C., Inthavong, K., Tu, J., 2019. Correlation of regional deposition dosage for inhaled nanoparticles in human and rat olfactory. *Part. Fibre Toxicol.* 16, 6. <https://doi.org/10.1186/s12989-019-0290-8>
- Tian, Y., Ouyang, N., Thomas, P.E., 2010. 2.29 - Regulation of Xenobiotic Sensor PXR and AhR by NF- κ B and Its Roles in Xenobiotic Detoxification and Inflammation-Associated Carcinogenesis, in: McQueen, C.A. (Ed.), *Comprehensive Toxicology (Second Edition)*. Elsevier, Oxford, pp. 579–585. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00232-3>
- Turner, J., Roger, J., Fitau, J., Combe, D., Giddings, J., Heeke, G.V., Jones, C.E., 2011. Goblet Cells Are Derived from a FOXJ1-Expressing Progenitor in a Human Airway Epithelium. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 44, 276–284. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2009-0304OC>
- Upadhyay, D., Panduri, V., Ghio, A., Kamp, D.W., 2003. Particulate matter induces alveolar epithelial cell DNA damage and apoptosis: role of free radicals and the mitochondria. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 29, 180–187. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2002-0269OC>
- Upadhyay, S., Palmberg, L., 2018. Air-Liquid Interface: Relevant In Vitro Models for Investigating Air Pollutant-Induced Pulmonary Toxicity. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* 164, 21–30. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfy053>
- Upadhyay, S., Stoeger, T., George, L., Schladweiler, M.C., Kodavanti, U., Ganguly, K., Schulz, H., 2014. Ultrafine carbon particle mediated cardiovascular impairment of aged spontaneously hypertensive rats. *Part. Fibre Toxicol.* 11, 36. <https://doi.org/10.1186/s12989-014-0036-6>
- Upadhyay, S., Stoeger, T., Harder, V., Thomas, R.F., Schladweiler, M.C., Semmler-Behnke, M., Takenaka, S., Karg, E., Reitmeir, P., Bader, M., Stampfl, A., Kodavanti, U.P., Schulz, H., 2008. Exposure to ultrafine carbon particles at levels below detectable pulmonary inflammation affects cardiovascular performance in spontaneously hypertensive rats. *Part. Fibre Toxicol.* 5, 19. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-5-19>
- Uppstad, H., Øvrebo, S., Haugen, A., Mollerup, S., 2010. Importance of CYP1A1 and CYP1B1 in bioactivation of benzo[a]pyrene in human lung cell lines. *Toxicol. Lett.* 192, 221–228. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2009.10.025>
- Valko, M., Morris, H., Cronin, M.T.D., 2005. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr. Med. Chem.* 12, 1161–1208. <https://doi.org/10.2174/0929867053764635>
- Vaughan, A., Stevanovic, S., Jafari, M., Bowman, R.V., Fong, K.M., Ristovski, Z.D., Yang, I.A., 2019a. Primary human bronchial epithelial cell responses to diesel and biodiesel emissions at an air-liquid interface. *Toxicol. In Vitro* 57, 67–75. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2019.02.005>

- Vaughan, A., Stevanovic, S., Jafari, M., Rahman, M., Bowman, R.V., Fong, K.M., Ristovski, Z., Yang, I.A., 2019b. The effect of diesel emission exposure on primary human bronchial epithelial cells from a COPD cohort: N-acetylcysteine as a potential protective intervention. *Environ. Res.* 170, 194–202. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2018.12.035>
- VITROCELL® - Advanced in vitro exposure systems [WWW Document], n.d. URL <https://www.vitrocell.com/> (accessed 8.7.20).
- Vogel, C.F.A., Van Winkle, L.S., Esser, C., Haarmann-Stemmann, T., 2020. The aryl hydrocarbon receptor as a target of environmental stressors – Implications for pollution mediated stress and inflammatory responses. *Redox Biol.* 34, 101530. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101530>
- Wagnon, S.W., Thion, S., Nilsson, E.J.K., Mehl, M., Serinyel, Z., Zhang, K., Dagaut, P., Konnov, A.A., Dayma, G., Pitz, W.J., 2018. Experimental and modeling studies of a biofuel surrogate compound: laminar burning velocities and jet-stirred reactor measurements of anisole. *Combust. Flame* 189, 325–336. <https://doi.org/10.1016/j.combustflame.2017.10.020>
- Walgraeve, C., Demeestere, K., Dewulf, J., Zimmermann, R., Van Langenhove, H., 2010. Oxygenated polycyclic aromatic hydrocarbons in atmospheric particulate matter: Molecular characterization and occurrence. *Atmos. Environ.* 44, 1831 – 1846. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2009.12.004>
- Wang, Y., Tang, M., 2018. Review of in vitro toxicological research of quantum dot and potentially involved mechanisms. *Sci. Total Environ.* 625, 940 – 962. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.12.334>
- WHO, 2020. Asthma [WWW Document]. URL <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/asthma> (accessed 2.6.21).
- WHO, 2018. Cancer [WWW Document]. URL <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer> (accessed 5.29.20).
- WHO, 2017. Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) [WWW Document]. URL [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chronic-obstructive-pulmonary-disease-\(copd\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chronic-obstructive-pulmonary-disease-(copd)) (accessed 2.6.21).
- WHO, 2016. WHO Expert Consultation: Available evidence for the future update of the WHO Global Air Quality Guidelines (AQGs) (2016) [WWW Document]. URL <https://www.euro.who.int/en/health-topics/environment-and-health/air-quality/publications/2016/who-expert-consultation-available-evidence-for-the-future-update-of-the-who-global-air-quality-guidelines-aqgs-2016> (accessed 2.18.21).
- WHO, 2005. Air quality guidelines. Global update 2005. Particulate matter, ozone, nitrogen dioxide and sulfur dioxide [WWW Document]. URL <https://www.euro.who.int/en/health-topics/environment-and-health/Housing-and-health/publications/pre-2009/air-quality-guidelines.-global-update-2005.-particulate-matter,-ozone,-nitrogen-dioxide-and-sulfur-dioxide> (accessed 11.24.20).

- Witschger, O., Fabriès, J.-F., 2005. Particules ultra-fines et santé au travail - Caractéristiques et effets potentiels sur la santé - Article de revue - INRS [WWW Document]. URL <https://www.inrs.fr/media.html?refINRS=ND%202227> (accessed 11.26.20).
- Wu, Y., Rossow, B., Modica, V., Yu, X., Wu, L., Grisch, F., 2017. Laminar flame speed of lignocellulosic biomass-derived oxygenates and blends of gasoline/oxygenates. *Fuel* 202, 572–582. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2017.04.085>
- Xue, J., Grift, T.E., Hansen, A.C., 2011. Effect of biodiesel on engine performances and emissions. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 15, 1098–1116. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2010.11.016>
- Xue, J., Hu, S., Quiros, D., Ayala, A., Jung, H.S., 2019. How do particle number, surface area, and mass correlate with toxicity of diesel particle emissions as measured in chemical and cellular assays? *Chemosphere* 229, 559 – 569. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.05.010>
- Ye, G., Gao, H., Zhang, X., Liu, X., Chen, J., Liao, X., Zhang, H., Huang, Q., 2021. Aryl hydrocarbon receptor mediates benzo[a]pyrene-induced metabolic reprogramming in human lung epithelial BEAS-2B cells. *Sci. Total Environ.* 756, 144130. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144130>
- Yuan, Q., Chen, Y., Li, X., Zhang, Z., Chu, H., 2019. Ambient fine particulate matter (PM_{2.5}) induces oxidative stress and pro-inflammatory response via up-regulating the expression of CYP1A1/1B1 in human bronchial epithelial cells in vitro. *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* 839, 40–48. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2018.12.005>
- Zaidman, N.A., Panoskaltis-Mortari, A., O’Grady, S.M., 2016. Differentiation of human bronchial epithelial cells: role of hydrocortisone in development of ion transport pathways involved in mucociliary clearance. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 311, C225-236. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00073.2016>
- Zarcone, M.C., Duistermaat, E., van Schadewijk, A., Jedynska, A., Hiemstra, P.S., Kooter, I.M., 2016. Cellular response of mucociliary differentiated primary bronchial epithelial cells to diesel exhaust. *Am. J. Physiol.-Lung Cell. Mol. Physiol.* 311, L111 – L123. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00064.2016>
- Zarcone, M.C., van Schadewijk, A., Duistermaat, E., Hiemstra, P.S., Kooter, I.M., 2017. Diesel exhaust alters the response of cultured primary bronchial epithelial cells from patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) to non-typeable *Haemophilus influenzae*. *Respir. Res.* 18. <https://doi.org/10.1186/s12931-017-0510-4>
- Zavala, J., Freedman, A.N., Szilagyi, J.T., Jaspers, I., Wambaugh, J.F., Higuchi, M., Rager, J.E., 2020. New Approach Methods to Evaluate Health Risks of Air Pollutants: Critical Design Considerations for In Vitro Exposure Testing. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 17. <https://doi.org/10.3390/ijerph17062124>
- Zavala, J., O’Brien, B., Lichtveld, K., Sexton, K.G., Rusyn, I., Jaspers, I., Vizuete, W., 2016. Assessment of Biological Responses of EpiAirway™ 3-D Cell Constructs vs. A549 Cells for Determining

Toxicity of Ambient Air Pollution. *Inhal. Toxicol.* 28, 251 – 259.
<https://doi.org/10.3109/08958378.2016.1157227>

Zhang, Z.-H., Balasubramanian, R., 2014. Influence of butanol–diesel blends on particulate emissions of a non-road diesel engine. *Fuel* 118, 130 – 136.
<https://doi.org/10.1016/j.fuel.2013.10.059>

Zheng, L., Liu, S., Zhuang, G., Xu, J., Liu, Q., Zhang, X., Deng, C., Guo, Z., Zhao, W., Liu, T., Wang, Y., Zhang, Y., Lin, J., Wang, Q., Sui, G., 2017. Signal Transductions of BEAS-2B Cells in Response to Carcinogenic PM_{2.5} Exposure Based on a Microfluidic System. *Anal. Chem.* 89, 5413–5421. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b00218>

Summary

Particulate pollution represents a major health issue and is associated with the development of respiratory and cardiovascular diseases. Among the different fractions, fine particles (FP) and ultrafine particles (UFP) are of growing concern. Due to their size, FP and UFP can reach the deeper airways. In urban areas, they are emitted principally by road traffic. Today's transports depend mainly on fossil fuels, which are not renewable. As a result, the development of new fuels such as second-generation biofuels (B2G) should help to reduce the use of fossil fuels and their toxic emissions. Unfortunately, in terms of health effects, there are still very few studies about the combustion products of these new biofuels.

Hence, the objective of this work is to evaluate the toxicity of FP and UFP produced during the combustion of fossil fuels and second-generation biofuels (B2G), under controlled combustion and exposure conditions. The first part of my thesis was devoted to the development of a lung cell exposure protocol adapted to the study of² combustion particles, produced in a reproducible and standardized manner. These particles were representative of road traffic emissions. This protocol allowed the generation and characterization of these particles as well as the simultaneous *in vitro* exposure. Then, toxicologic response of organic UFP were studied. The last part of this work was the comparative study of the physico-chemical and *in vitro* toxicological characteristics of FP and UFP from fossil fuels and B2G combustion.

The development of the exposure protocol allowed to explore the toxicological effects of UFP with a high content of organic compounds, on two bronchial epithelial models: the differentiated model NHBE as well as the BEAS-2B line. Under non-cytotoxic conditions, both models show an induction of the antioxidant and inflammatory response. In addition, the metabolism of xenobiotics was also induced on the BEAS-2B line. The results of the comparative study between fossil fuels and B2G on the BEAS-2B line at exposure dose close to real conditions also show an alteration in markers of oxidative stress, inflammation, and xenobiotic metabolism. This response is observed mainly 3 h after exposure.

Taken together, these results demonstrate the effect of PF and PUF under real exposure conditions on the antioxidant and inflammatory response as well as on the metabolism of xenobiotics. These results will provide a better understanding of the future of new fuels.

Keywords: *In vitro*, Beas-2b, NHBE, fine and ultrafine particles, gasoline emissions, B2G

Résumé

La pollution particulaire constitue aujourd'hui un enjeu sanitaire majeur et est associée au développement de maladies respiratoires et cardiovasculaires. Parmi les différentes fractions, les particules fines (PF) et plus encore les particules ultrafines (PUF), soulèvent une préoccupation croissante. En raison de leur taille, elles peuvent atteindre les voies respiratoires profondes provoquant des conséquences sur la santé à court et à long terme. En milieu urbain, le trafic routier est leur principal émetteur. Aujourd'hui, les transports automobiles utilisent majoritairement des carburants fossiles, carburants qui ne sont pas renouvelables. De ce fait, le développement de nouveaux carburants comme les biocarburants de seconde génération (B2G) pourraient contribuer à diminuer l'utilisation des carburants fossiles et leurs émissions toxiques. Malheureusement, en termes d'effets sanitaires, il existe encore très peu d'études qui s'intéressent aux produits de combustion de ces nouveaux biocarburants.

Par conséquent, l'objectif général de ce travail est d'évaluer la toxicité de particules fines et ultrafines produites lors de la combustion de carburants pétroliers et de biocarburants de seconde génération (B2G), pour des conditions de combustion et d'exposition parfaitement contrôlées, représentatives de l'exposition humaine. La première partie de mon travail de thèse a été consacrée au développement d'un protocole d'exposition de cellules pulmonaires adapté à l'étude de particules de combustion, produites de façon reproductible et standardisée, et représentatives de particules issues du trafic routier. Ce protocole a permis la génération et la caractérisation de ces particules ainsi que l'exposition simultanée aux cellules en culture. Une fois validé, ce protocole a permis l'étude du profil de réponse toxique de particules ultrafines riches en carbone organique. La dernière partie de ce travail a été dédiée à l'étude comparative de l'influence du carburant utilisé sur la composition physico-chimique et le profil de réponse toxique observé après exposition aux particules fines et ultrafines.

Le développement du protocole d'exposition a permis d'explorer les effets toxicologiques de PUF avec une haute teneur en composés organiques, sur deux modèles de cellules épithéliales bronchiques : le modèle différencié NHBE ainsi que la lignée BEAS-2B. Dans des conditions non cytotoxiques, les deux modèles montrent une induction de la réponse antioxydante et inflammatoire. De plus, le métabolisme des xénobiotiques a également été fortement induit sur la lignée BEAS-2B.

Les résultats de l'étude comparative des carburants fossiles et B2G sur la lignée BEAS-2B à des doses d'expositions proches de conditions réelles, montrent également une réponse des marqueurs du stress oxydant, de l'inflammation et du métabolisme des xénobiotiques. Cette réponse est observée principalement 3 h après exposition.

L'ensemble de ces résultats démontre l'effet des PF et PUF dans des conditions d'exposition contrôlées sur la réponse antioxydante et inflammatoire ainsi que sur le métabolisme de xénobiotiques. Ces résultats permettront de mieux comprendre l'avenir de nouveaux carburants.

Mots clés : *In vitro*, Beas-2b, NHBE, particules fines et ultrafines, émissions essence, B2G