



Etude de la toxicité in vitro de particules issues de la combustion de fumigènes sur des cellules épithéliales pulmonaires humaines en culture primaire

Violaine Martin de Lagarde

► To cite this version:

Violaine Martin de Lagarde. Etude de la toxicité in vitro de particules issues de la combustion de fumigènes sur des cellules épithéliales pulmonaires humaines en culture primaire. Médecine humaine et pathologie. Normandie Université, 2022. Français. NNT : 2022NORMR038 . tel-04033773

HAL Id: tel-04033773

<https://theses.hal.science/tel-04033773>

Submitted on 17 Mar 2023

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

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

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

Préparée au sein de l'Université de Rouen Normandie

Etude de la toxicité in vitro de particules issues de la combustion de fumigènes sur des cellules épithéliales pulmonaires humaines en culture primaire

**Présentée et soutenue par
VIOLAINE MARTIN DE LAGARDE**

**Thèse soutenue le 14/10/2022
devant le jury composé de**

MME ARMELLE BAEZA	PROFESSEUR DES UNIVERSITES, UNIVERSITE PARIS 7 PARIS DIDEROT	Rapporteur du jury
M. DOMINIQUE COURCOT	PROFESSEUR DES UNIVERSITES, UNIVERSITE LITTORAL COTE D'OPALE	Rapporteur du jury
MME CECILE CORBIERE	MAITRE DE CONFERENCES, Université de Rouen Normandie	Membre du jury
M. SAMIR DEKALI	CHARGE DE RECHERCHE,	Membre du jury
MME GHISLAINE LACROIX	CHARGE DE RECHERCHE,	Membre du jury
MME CHRISTELLE MONTEIL	PROFESSEUR DES UNIVERSITES, Université de Rouen Normandie	Directeur de thèse

Thèse dirigée par CHRISTELLE MONTEIL (Aliments bioprocédés toxicologie environnements)

Remerciements

Je remercie tout d'abord les membres de mon jury de thèse pour avoir acceptés d'évaluer mon travail. Merci aux Professeurs **Dominique Courcot** et **Armelle Baeza-Squiban** d'avoir acceptés d'être rapporteurs de ma thèse. Je suis très honorée également de compter parmi les membres de mon jury les Docteurs **Ghislaine Lacroix** et **Samir Dekali**.

Je tiens également à remercier les membres de mon CSI et en particulier le Professeur **Xavier Coumoul** qui suit mon parcours universitaire avec enthousiasme depuis ma deuxième année de licence et qui m'a fait découvrir avec passion le domaine de la toxicologie.

Je remercie sincèrement le Professeur **Christelle Monteil**, ma directrice de thèse, pour m'avoir fait confiance pour réaliser ce travail de thèse, pour ses échanges scientifiques éclairés et pour la grande disponibilité qu'elle a pu m'accorder même dans les dernières corrections du manuscrit dans des délais très courts.

Je remercie profondément le Docteur **Cécile Corbière**, mon encadrante de thèse, pour m'avoir soutenue scientifiquement et moralement jusqu'au bout, me formant à la recherche tout en me laissant une grande liberté d'expression. Merci pour toute ton implication dans ce travail et ta bienveillance.

Je remercie chaleureusement le Docteur **Tiphaine Rogez-Florent**, mon encadrante non officielle de thèse, d'avoir participé à mon projet de thèse avec tant d'implication, que ce soit pour l'analyse de résultats, son aide scientifique et technique dans les manip, dans la rédaction d'articles ou encore la mise en page de mon manuscrit. Un immense merci.

Je tiens à remercier chaleureusement les autres membres de l'équipe, notamment **Kelly** et **Ana**, ayant été toutes les trois doctorantes en même temps, j'ai été heureuse de partager cette aventure avec vous. Je tiens à remercier plus particulièrement Ana qui m'a beaucoup aidé au début de ma thèse et avec qui j'ai partagé de joyeux moments de détente. Je

remercie profondément **Clémence** pour sa bonne humeur quotidienne, ses rires, sa participation à mon travail de thèse et à ses encouragements sans faille.

Je remercie **Cathy Logie** pour son aide indispensable dans les PCR.

Je remercie tous les **collaborateurs du projet FUMITOX** qui ont permis que ce travail soit réalisé. Je remercie les chercheurs du **Centre Commun de Mesures** pour l'analyse physicochimique des particules qu'ils ont réalisée. Je remercie en particulier le Docteur **Francine Cazier-Dennin** pour sa disponibilité pour la préparation des suspensions de particules tout au long de ma thèse. Je remercie également le **Groupe Physique des Matériaux** et plus particulièrement le Docteur **Laurence Chevalier** pour ses analyses de microscopie et sa disponibilité à répondre à mes questions pour mieux comprendre cet univers.

Je remercie le Docteur **Noël Perrier**, mon tuteur de la Direction Générale de l'Armement pour avoir suivi mon travail avec grand intérêt et pour tous ses commentaires éclairés dans la rédaction du manuscrit.

A mes amis de longue date **Maxence, Camille, Cyril, Christophe** et **Clara**, pour votre soutien, pour toutes les soirées et week-ends passés ensemble, tous ces moments de joies et de rires. Merci d'être présents dans ma vie. Une mention spéciale pour Christophe qui m'a obligée à faire une sauvegarde en ligne de ma thèse, un grand merci.

A toute ma famille, mes parents **Amaury** et **Gabrielle**, mon frère **Raphaël**, mes sœurs **Aurélia** et **Clémence** pour leur soutien infaillible même à distance. Merci pour votre écoute et tous vos encouragements qui m'ont beaucoup aidée pendant ces années de thèse.

A ma compagne **Hortense** qui partage ma vie depuis 8 ans, qui a toujours cru en moi et qui m'a toujours encouragée tout au long de cette thèse. Merci pour ta patience à supporter mes monologues sur la thèse, toutes ces longues soirées, week-ends et même vacances où j'ai travaillé. Merci pour tout l'amour que tu me donnes au quotidien.

Soutien financier

Ce doctorat s'inscrit dans le cadre du projet FUMITOX, financé par l'Agence Nationale de la Recherche Française (ANR, Astrid ; ANR-15-ASTR-0023) et co-soutenu par le Conseil Régional de Normandie et de l'Union Européenne dans le cadre du FEDER-FSE (projet CellSTEM). La thèse a été soutenue par une bourse doctorale co-financée par l'Agence de l'Innovation de Défense (AID) et la Région Normandie.



Table des matières

COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES	I
LISTE DES FIGURES	IV
LISTE DES TABLEAUX	V
LISTE DES ABREVIATIONS	VI
GLOSSAIRE	X
AVANT-PROPOS	1
ETAT DE L'ART	2
1. POLLUTION PARTICULAIRE ET ACTIVITES PYROTECHNIQUES.....	2
1.1 GENERALITES SUR LA POLLUTION PARTICULAIRE.....	2
1.2 CARACTERISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES DES PARTICULES.....	3
1.2.1 Taille des particules et dépôt dans l'appareil respiratoire	3
1.2.2 Formation des particules.....	5
1.2.3 Aire de surface.....	6
1.2.4 Composition chimique.....	7
1.3 LES DIFFERENCES SOURCES DE PARTICULES.....	10
1.3.1 Sources naturelles.....	10
1.3.2 Sources anthropiques.....	10
1.3.3 Réglementation des particules de l'air ambiant.....	12
1.4 ACTIVITES PYROTECHNIQUES ET SOURCES DE PARTICULES.....	15
1.4.1 Feux d'artifices.....	17
1.4.2 Armes à feu de petits calibres.....	19
1.4.3 Les fumigènes.....	21
2. EFFETS SANITAIRES LIES A L'INHALATION D'AEROSOLS ISSUS D'ACTIVITES PYROTECHNIQUES.....	24
2.1 TOXICITE DES FEUX D'ARTIFICES.....	24
2.2 TOXICITE DES ARMES DE TIRS.....	25
2.3 TOXICITE DES FUMIGENES.....	27
2.3.1 Familles de fumigènes.....	27
2.3.2 Effets sur la santé humaine.....	33
2.3.3 Toxicité in vivo.....	34
2.3.4 Toxicité in vitro.....	38
2.4 REGLEMENTATION CONCERNANT L'UTILISATION DES FUMIGENES.....	42
3. REPONSES BIOLOGIQUES AUX PARTICULES : METHODES D'EVALUATION IN VITRO DE LA TOXICITE PULMONAIRE	47
3.1 L'EPITHELIUM RESPIRATOIRE.....	47
3.1.1 Structure et histologie.....	47
3.1.2 Clairance muco-ciliaire.....	51
3.2 MODELES CELLULAIRES HUMAINS ET METHODES D'EXPOSITION	53
3.2.1 Culture à l'interface air-liquide (IAL)	53
3.2.2 Les lignées cellulaires.....	56
3.2.3 Les cellules primaires.....	57
3.2.4 Co-cultures, organoïdes et organe-sur-puce.....	59
3.2.5 Récolte des particules.....	60
3.2.6 Méthodes d'exposition.....	61
3.3 MECANISMES DE TOXICITE DES PARTICULES	63
3.3.1 Rétention des particules, internalisation et remodelage de l'épithélium.....	63

3.3.2	Stress oxydant	65
3.3.3	Inflammation.....	70
3.4	POTENTIEL OXYDANT DES PARTICULES	72
3.4.1	Test de déplétion des antioxydants dans le RTLF.....	73
3.4.2	Test du dithiothréitol (DTT).....	75
3.4.3	Autres méthodes de mesures du PO	77
RESULTATS		80
1.	ARTICLE 1	80
1.1	RESUME GRAPHIQUE	80
1.1	CONTEXTE.....	81
1.2	OBJECTIFS	81
1.3	PRINCIPAUX RESULTATS.....	81
1.4	CONCLUSION	83
2.	ARTICLE 2	94
2.1	RESUME GRAPHIQUE	94
2.2	CONTEXTE.....	94
2.3	OBJECTIFS	95
2.4	PRINCIPAUX RESULTATS.....	95
2.5	CONCLUSION	96
DISCUSSION		134
1.	CARACTERISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES DES PARTICULES.....	134
2.	POTENTIEL OXYDANT.....	136
3.	COMPARAISON DE LA TOXICITE AIGUË DES PARTICULES DE FUMIGENE SUR LES MODELES SAEC ET NHBE	138
4.	ÉTUDE DE LA TOXICITE AIGUË DES PARTICULES HC-OS ET RSS SUR LE MODELE NHBE 143	
5.	TOXICITE REPETEE DES PARTICULES RSS SUR LE MODELE NHBE	145
CONCLUSION ET PERSPECTIVES		147
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES		150

Communications scientifiques

Publications

Martin de Lagarde, V., et al.,

Toxicity of acute and repeated exposures to particles from pyrotechnic smokes in normal human bronchial epithelial (NHBE) cells 3D culture. (en préparation)

Martin de Lagarde, V., Rogez-Florent, T., Cazier, F., Dewaele, D., Cazier-Dennin, F., Ollivier, A., Janona, M., Achard, S., André, V., Monteil, C., & Corbière, C. (2022). **Oxidative potential and in vitro toxicity of particles generated by pyrotechnic smokes in human small airway epithelial cells.** Ecotoxicology and Environmental Safety, 239, 113637. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.113637>

Juarez-Facio, A. T., Martin de Lagarde, V., Monteil, C., Vaugeois, J.-M., Corbiere, C., & Rogez-Florent, T. (2021). **Validation of a Fast and Simple HPLC-UV Method for the Quantification of Adenosine Phosphates in Human Bronchial Epithelial Cells.** Molecules, 26(20), 6324. <https://doi.org/10.3390/molecules26206324>

Martin de Lagarde, V., Rogez, T., Cazier, F., Dewaele, D., Janona, M., Cazier, F., Monteil, C., & Corbière, C. (2021). **Evaluation of the oxidative potential of pyrotechnic smoke particles and in vitro toxic assessment on a 3D model of primary pulmonary cells at Air-Liquid Interface.** Toxicology Letters, 350, S191. [https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(21\)00690-1](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(21)00690-1)

Communications orales

Martin de Lagarde, V., Rogez-Florent, T., Chevalier L., Janona, M., Corbiere, C., Monteil, C. **Étude du stress oxydant après expositions à des particules de fumigènes sur un modèle 3D de cellules épithéliales bronchiques.** Société de Toxicologie Cellulaire et Moléculaire (STCM), Journée des Jeunes Toxicologues. En ligne. Mars 2022.

Martin de Lagarde, V., Rogez-Florent, T., Cazier, F., Dewaele, D., Cazier-Dennin, M., Monteil,

C., Corbiere, C. **Evaluation of the oxidative potential of pyrotechnic smoke particles and in vitro toxic assessment on a 3D model of primary pulmonary cells at Air-Liquid Interface.** Journées de l'École doctorale Normande de Biologie Intégrative, Santé, Environnement (EDnBISE). En ligne. Mai 2021.

Martin de Lagarde, V., Rogez-Florent, T., Cazier, F., Cazier-Dennin, F., Janona, M., Monteil, C., Corbiere, C. **Evaluation of the oxidative potential of pyrotechnic smoke particles and in vitro toxic assessment on a 3D model of primary pulmonary cells at Air-Liquid Interface.** Journées scientifiques du "Réseau de recherche régional sécurité sanitaire, bien être et aliments durables (SéSAD)". En ligne Décembre 2020.

Martin de Lagarde, V., Corbiere, C., Monteil, C. **Toxicological assessment of particles generated during smoke combustion.** Journées de l'École doctorale Normande de Biologie Intégrative, Santé, Environnement (EDnBISE), Caen, France. Mars 2019.

Communications affichées

Martin de Lagarde, V., Corbiere, C., Monteil, C. **Culture of primary pulmonary cells at air-liquid interface : a suitable 3D model to study exposure to particles from pyrotechnic smokes.** Congrès fondateur de de Société de Toxicologie Cellulaire et Moléculaire (STCM), Paris, France. Juin 2019.

Martin de Lagarde, V., Rogez-Florent, T., Cazier, F., Dewaele, D., Cazier-Dennin, F., Janona, M., Monteil, C., Corbiere, C. **Characterization of oxidative potential and toxicology in vitro study of fine and ultrafine PM generated by smoke grenade shots.** 24th ETH-Conference on Combustion Generated Nanoparticles. En ligne.

Martin de Lagarde, V., Rogez-Florent, T., Cazier, F., Dewaele, D., Cazier-Dennin, F., Janona, M., Monteil, C., Corbiere, C. **Evaluation of the oxidative potential of pyrotechnic smoke particles and in vitro toxic assessment on a 3D model of primary pulmonary cells at Air-Liquid Interface.** Congrès de la fédération EUROTOX (Federation of European Toxicologists and European Societies of Toxicology). En ligne Septembre 2021.

Liste des figures

FIGURE 1. MECANISMES DE DEPOSITION DE PARTICULES INHALEES DANS LES POUMONS EN FONCTION DE LEUR TAILLE. ADAPTE DE (DARQUENNE, 2006) ET DE (LAUWERYS ET AL., 2007)...	4
FIGURE 2. MODES DE FORMATION DES PARTICULES ET DISTRIBUTION DE LA TAILLE EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN NOMBRE (DN/DLOG DP, NOMBRE DE PARTICULES/MM ³), EN AIRE DE SURFACE (DS/ DLOG DP, AIRE DE SURFACE DE PARTICULE/MM ³) ET EN MASSE (DDM/DLOG DP, MASSE DE PARTICULES/MM ³). D'APRES (KWON ET AL., 2020).....	5
FIGURE 3. AIRE DE SURFACE EN EN FONCTION DU DIAMETRE DES PARTICULES. D'APRES (OBERDÖRSTER ET AL., 2005).....	7
FIGURE 4. PRINCIPALES SOURCES D'EMISSION DES PM ₁₀ , PM _{2.5} ET PM _{1.0} EN 2019, EN FRANCE METROPOLITAINE. ADAPTE DE (CITEPA, 2021).....	11
FIGURE 5. ÉVOLUTION DES EMISSIONS DES PARTICULES TOTALES EN SUSPENSION DEPUIS 1990 A 2020 D'APRES CITEPA 2022.....	13
FIGURE 6. DISTRIBUTION GEOGRAPHIQUE DES CONCENTRATIONS MEDIANES DE PM ₁₀ ET DE PM _{2.5} PENDANT UNE PERIODE DE FEUX D'ARTIFICES. "POLLUTION DE FOND" FAIT REFERENCE AUX CONCENTRATIONS DE PARTICULES PENDANT UNE PERIODE DITE NORMALE, HORS PERIODE DE FEUX D'ARTIFICES. LES RESULTATS SONT EXPRIMES EN EXPRESSION RELATIVE PAR RAPPORT A LA POLLUTION DE FOND. ADAPTE DE LIN, 2016.....	18
FIGURE 7. COMPOSITION CHIMIQUE DE PARTICULES ISSUES DE CARABINE MILITAIRE M4 (AURELL ET AL., 2019).....	20
FIGURE 8. UTILISATION DE FUMIGENES PENDANT LA 1 ^{ERE} GUERRE MONDIALE. D'APRES LE RAPPORT DE (NORTH ATLANTIC TREATY ORGANIZATION, 2016)	22
FIGURE 9. LISTE DES PRINCIPAUX COLORANTS ENTRANT DANS LA COMPOSITION DES FUMIGENES DE SIGNALISATION UTILISES PAR L'ARMEE AMERICAINE. ADAPTE DE (GLÜCK ET AL., 2017; NATIONAL RESEARCH COUNCIL (U.S.), 1999).....	32
FIGURE 10. STRUCTURE DES VOIES RESPIRATOIRES. ADAPTE DE (COUMOUL, 2017)	48
FIGURE 11. COMPOSITION CELLULAIRE DE L'EPITHELIUM RESPIRATOIRE EN FONCTION DE SA LOCALISATION. ADAPTEE DE KİYOKAWA & MORIMOTO, 2020.....	49
FIGURE 12. MECANISME DE LA CLAIRANCE MUCO-CILIAIRE MEDIEE PAR L'EPITHELIUM RESPIRATOIRE ET LA GLANDE SOUS-MUQUEUSE. D'APRES WHITSETT, 2018.....	52
FIGURE 13. CULTURE DE CELLULES EPITHELIALES PULMONAIRES A L'IAL.	54
FIGURE 14. COMPARAISON DE LA MORPHOLOGIE DE LA BARRIERE BRONCHIQUE ENTRE LES CELLULES CALU-3 ENSEMENCEES EN CULTURE DE LIQUIDE-LIQUIDE (LCC) OU EN CONFIGURATION D'INTERFACE AIR-LIQUIDE (ALI). (A) REPRESENTATION SCHEMATIQUE DEES DEUX METHODES UTILISEES POUR DEVELOPPER LE MODELE BRONCHIQUE SUR INSERT TRANSWELL®. (B) CULTURE DE CELLULES CALU-3 EN LCC OU EN CONFIGURATION ALI APRES TROIS SEMAINES DE CULTURE. HEMATOXYLINE-EOSINE ET COLORATION BLEUE ALCIAN (COLOREE EN BLEU). BARRES D'ECHELLE : 20 MM. D'APRES (LECHANTEUR ET AL., 2018) ET ADAPTE DE (KREFT ET AL., 2015).....	55
FIGURE 15. STRUCTURE CELLULAIRE DU MODELE NHBE APRES 14 JOURS DE DIFFERENCIATION A L'IAL. A : MICROSCOPIE OPTIQUE DE NHBE COLOREES AU BLEU DE TOLUIDINE. B : MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE BRIGHT-FIELD DE NHBE (LARGE FIELD OF VIEW). BC : CELLULES BASALES ; CC : CELLULES CILIEES ; GC : CELLULES A MUCUS. ADAPTE DE (JUAREZ-FACIO ET AL., 2022).....	58
FIGURE 16. SCHEMA D'UN SYSTEME D'EXPOSITION A L'IAL (VITROCELL®).....	62
FIGURE 17. MECANISMES DES PARTICULES POUVANT CAUSER UN STRESS OXYDANT. D'APRES (NIEMANN ET AL., 2017).....	66
FIGURE 18. ACTIVATION DES VOIES AHR ET NRF-2 PAR LES PARTICULES. D'APRES PARDO ET AL. 2020.	67
FIGURE 19. CYCLE REDOX DES QUINONES A PARTIR DES COMPOSES ORGANIQUES. (A) HAP REPRESENTATIFS ET QUINONES CORRESPONDANTES. (B) SCHEMA REACTIONNEL DE LA METABOLISATION DES HAP EN QUINONE ET CYCLE DE RECYCLAGE DES QUINONES. D'APRES (N. LI, HAO, ET AL., 2003).....	68
FIGURE 20. REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU STRESS OXYDANT ET DE L'INFLAMMATION INDUITS PAR UNE EXPOSITION AUX PARTICULES AU NIVEAU DE L'APPAREIL RESPIRATOIRE ET DES AUTRES ORGANES VITAUX AUXQUELS LES PARTICULES OU LES COMPOSES DESORBES ACCEDENT VIA LA CIRCULATION SANGUINE. ADAPTE DE (H. CHEN ET AL., 2022).....	70

FIGURE 21. OXYDATION DU DITHIOTHREITOL (DTT) PAR DES ESPECES ACTIVES REDOX DANS LES PARTICULES AVEC ENSUITE FORMATION D'ERO. B. REACTION DU DTT AVEC L'ACIDE 5,5' DITHIOBIS(2-NITROBENZOÏQUE) (DTNB). D'APRES (VISENTIN ET AL., 2016).....	75
FIGURE 22 : STRATEGIE EXPERIMENTALE.....	79

Liste des tableaux

TABLEAU 1. NOMBRE DE PARTICULES ET AIRE DE SURFACE POUR 10 $\mu\text{G}/\text{M}^3$ DE PARTICULES ATMOSPHERIQUES (OBERDÖRSTER ET AL., 2005).....	6
TABLEAU 2. CONCENTRATIONS MOYENNES LIMITES JOURNALIERES ET ANNUELLES DES PARTICULES ($\mu\text{G}/\text{M}^3$).	14
TABLEAU 3. DISPOSITIFS PYROTECHNIQUES COURANTS. ADAPTE DE KOSANKE ET AL., (2013).....	16
TABLEAU 4. ANCIENNES ET NOUVELLES FORMULATIONS DES COLORANTS DES FUMIGENES COLORES DE SIGNALISATION UTILISES AU SEIN DE L'ARMEE AMERICAINE. ADAPTE DE (NATIONAL RESEARCH COUNCIL (U.S.), 1999).....	33
TABLEAU 5. SYNTHESE DES ETUDES <i>IN VITRO</i> SUR LA TOXICITE DES FUMIGENES	41
TABLEAU 6. VALEURS LIMITES D'EXPOSITION AUX FUMIGENES HC, WP, RP ET TiO_2	44
TABLEAU 7. SYNTHESE ET COMPARAISON DES MARQUEURS BIOLOGIQUES INDUITS APRES 24H D'EXPOSITION AUX PARTICULES RSS ET HC-OS (12,5 ; 25 ET 50 $\mu\text{G}/\text{CM}^2$). LES RESULTATS SONT EXPRIMES EN RATIO D'EXPRESSION PAR RAPPORT AU CONTROLE PBS. NS : NON SIGNIFICATIF, ND : NON DETERMINE	140

Liste des abréviations

A

AA : acide ascorbique

AcPy : acénaphthylène

AEC I et II : « Alveolar Epithelial Cells » ; cellules épithéliales alvéolaires ou pneumocytes de type I et II

AhR : récepteur aryl hydrocarbure

AIS : « anti-intrusion smoke » ; fumigène anti-intrusion

Ant : anthracène

ARE : « Antioxidants Response Element » ; éléments de réponses antioxydants

B

BaA : benzo[a]anthracène

BaP : benzo[a]pyrène

BbFL : benzo[b]fluoranthène

Bg,h,iP : benzo[ghi]pérylène

BkF : dibenzo[a,h]anthracène

BkFL : benzo[k]fluoranthène

BPCO : BronchoPneumopathie Chronique Obstructive

C

CA : fumigène à base d'acide cinnamique

CAT : catalase

Chr : chrysène

CYP450 : cytochromes P450

D

DCF : dichlorofluorescéine

DCFH : 2',7'-dichloro-dihydrofluorescéine

DEP : « Diesel Exhaust Particles » ; particules de diesel

DTNB : acide 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoïque)

DTT : dithiothreitol

E

EC : « Elemental Carbon » ; carbone élémentaire

EEA : « European Environment Agency » ; Agence Européenne pour l'Environnement

EEGL : « Emergency Exposure Guidance Levels »

ERO : espèces réactives de l'oxygène

F

FITC : « fluorescein isothiocyanate »

Fl : fluoranthène

Flu : fluorène

G

GPx : glutathion peroxydase

GSH : glutathion réduit

H

H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène

HAP : hydrocarbures aromatiques polycycliques

hBEC : « human Bronchial Epithelial Cells »

HC : hexachloroéthane

HC-OS : « hexachloroethane-based obscuring smoke » ; fumigène de camouflage à base d'hexachloroéthane

HO-1 : Hème Oxygénase-1

I

IAL : interface-air-liquide (ou ALI en anglais)

InP : indéno[cd]pyrène

K

KM : fumigènes à base de potassium et magnésium

M

MUC : protéines mucines

N

Nap : naphthalène

NHBE : « Normal Human Bronchial Epithelial Cells »

NP : nanoparticules

NQO-1 : NAD(P)H quinone oxyréductase-1

NRC : « National Research Council » ; Conseil National de Recherche

Nrf-2 : facteur nucléaire à l'érythroïde-2-like-2

O

8-OH-dG : 8-hydroxy-2'-déoxyguanosine

$\cdot\text{OH}$: radical hydroxyle

$\text{O}_2^{\cdot-}$: anion superoxyde

OC : « Organic Carbon » ; carbone organique

OMS : ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTE

ONU : Organisation des Nations Unies

P

PBEC : « Primary Bronhial Epithelial Cells »

PEGL : « Permissible Exposure Guidance Levels »

Phe : phénanthrène

PM : « Particulate Matter »

PM_{0.1} : Particules ultrafines

PM_{1.0} : Particules très fines

PM_{2.5} : Particules fines

PM₁₀ : Particules dont le diamètre est supérieur à 10

PO : Potentiel Oxydant

PPEGL : « Permissible Public Exposure Guidance Levels »

Pyr : pyrène

R

ROO $\cdot$: radical peroxyde

RP : « Red Phosphorus » ; phosphore rouge

RPE : résonance paramagnétique électronique

RSS : « Red Signalling Smoke » ; fumigène de signalisation de couleur rouge

RTLFL : « respiratory tract lining fluid » ; fluide de revêtement des voies respiratoires

S

SAEC : « Small Airway Epithelial Cells »

SOD : superoxyde dismutase

SPEGL : « Short-term Public Emergency Guidance Levels »

T

TEER : « trans-epithelial electrical resistance » ; résistance électrique trans-épithéliale

TNB : 2-nitro-5-thiobenzoïque

TNT : 2,4,6-trinitrotoluène

TPA : fumigène à base d'acide téréphtalique

V

VLEP : Valeurs Limites d'Exposition Professionnelles

W

WP : « White Phosphorus » ; phosphore blanc

X

XRE : éléments de réponses aux xénobiotiques

Z

ZO-1 : Zonula occludens-1

Glossaire

Liste des ions

Cl^- : chlore

SO_4^{2-} : sulfate

NO_3^- : nitrate

NH_4^+ : ammonium

Na^+ : sodium

K^+ : potassium

Ca^{2+} : calcium

Mg^{2+} : magnésium

Liste des métaux

Ag : Argent

Al : Aluminium

As : Arsenic

Au : Or

Ba : Baryum

Bi : Bismuth

Cd : Cadmium

Co : Cobalt

Cr : Chrome

Cs : Césium

Cu : Cuivre

Fe : Fer

Ga : Gallium

Hg : Mercure

La : Lanthane

K : Potassium

Li : Lithium

Mg : Magnésium

Mn : Manganèse

Mo : Molybdène

Na : Sodium

Nb : Niobium

Ni : Nickel

Pb : Plomb

Rb : Rubidium

Sb : Antimoine

Sn : Etain

Sr : Strontium

Ti : Titane

Tl : Thallium

V : Vanadium

Zn : Zinc

Zr : Zirconium

Avant propos

Les activités pyrotechniques sont très bien connues dans le cadre des feux d'artifices, utilisés comme moyen de divertissement dans le monde entier pour différents événements festifs. Une application majeure de la pyrotechnie est le domaine militaire pour la production de dispositifs lumineux, pour l'allumage de dispositifs d'artillerie et dans la production de fumigènes. Les fumigènes sont principalement utilisés comme fumigènes de signalisation ou de camouflage, notamment lors de l'entraînement des militaires. Les fumigènes sont constitués d'un mélange de produits chimiques complexe dont la combustion génère un aérosol, composé de gaz et de particules en suspension qui caractérisent la fonction de celui-ci. Les effets sur la santé d'une exposition à l'aérosol total des fumigènes sont rapportés pour causer des atteintes respiratoires, à différents degrés de sévérité. Cependant, la toxicité de la fraction particulaire est très peu étudiée alors que des expositions aux particules dans le cadre de la pollution atmosphériques sont largement connues pour causer de nombreuses pathologies respiratoires. De plus, en raison de la taille des particules de fumigènes rapportées dans la littérature, celles-ci sont capables de se déposer profondément dans l'appareil respiratoire et d'en atteindre les régions les plus distales.

Ainsi, c'est dans ce contexte que s'inscrit ce travail de thèse dont l'objectif général a été d'évaluer la toxicité *in vitro* de particules issues de la combustion de fumigènes. La première partie de ce travail a consisté à évaluer la toxicité à l'aide de méthodes acellulaires en mesurant le potentiel oxydant des particules. La deuxième partie a reposé sur l'évaluation de la toxicité aiguë des particules par une approche *in vitro* impliquant l'utilisation de deux modèles de cellules primaires épithéliales bronchiques. Enfin, la troisième partie a été dédiée à l'étude de la toxicité des particules après des expositions répétées.

Ce manuscrit se compose de quatre chapitres. Le premier correspond à un état de l'art portant sur les caractéristiques générales des particules, les activités pyrotechniques comme étant des sources de particules et causant des effets sanitaires notamment les fumigènes et sur les méthodes d'évaluation *in vitro* de la toxicité pulmonaire pour mesurer les réponses biologiques des particules. Le deuxième chapitre présente les résultats de la thèse sous la forme d'articles, dont un est publié et le second est en préparation. Le troisième chapitre est consacré à la discussion générale du travail de thèse. Enfin, le quatrième chapitre présente les principales conclusions et perspectives de ce travail.

État de l'art

1. Pollution particulaire et activités pyrotechniques

1.1 Généralités sur la pollution particulaire

Dans la pollution de l'air, on distingue les polluants gazeux comme les composés organiques volatiles, les oxydes d'azote, le dioxyde de soufre ou l'ozone et les **polluants particulaires** qui sont un mélange complexe de substances organiques et minérales en suspension dans l'air, sous forme solide et/ou liquide.

Ces polluants particulaires sont parfois désignés sous le nom « **aérosols** », terme qui inclut à la fois les particules et les gaz dans lesquels elles se trouvent en suspension.

Les particules, communément appelées dans la littérature « **PM** » en anglais pour « **Particulate Matter** », désignent spécifiquement les particules sans considérer les gaz dans lesquels elles sont en suspension. On distingue les particules primaires qui sont directement issues des sources de pollution d'origines naturelles ou anthropiques et directement émises dans l'atmosphère, des particules secondaires qui résultent de réactions physico-chimiques dans l'atmosphère sous l'effet de conditions météorologiques particulières. Les particules présentent des caractéristiques physico-chimiques qui dépendent à la fois de leur source d'émission et du résultat de leurs interactions avec d'autres polluants aériens au cours de leur séjour dans l'atmosphère.

Par ailleurs, le terme de « **poussières** » est également employé pour désigner des particules d'origines naturelles (érosion des roches, volcanisme, feux de forêts) mais aussi des particules solides émises spécifiquement par des aérosols dans le milieu professionnel.

Parmi l'ensemble des polluants atmosphériques, les particules sont considérées comme les plus nocifs d'entre eux, en raison de leurs nombreux effets sur la santé qui ne se limitent pas simplement à la toxicité pulmonaire (Organisation Mondiale de la Santé, (OMS, 2021)). Depuis 2013, les particules de l'air extérieur ambiant sont classées « **cancérogènes chez l'Homme** » (Groupe 1) d'après le Centre International de Recherche sur le Cancer (IARC) (IARC, 2015; Loomis et al., 2013).

1.2 Caractéristiques physico-chimiques des particules

1.2.1 Taille des particules et déposition dans l'appareil respiratoire

La caractérisation des particules est très complexe car elle dépend de leur forme, leur degré d'agglomération, leur taille, leur composition chimique, leurs caractéristiques de surface ou encore leur structure. Cependant, pour différencier les différents types de particules, la classification repose principalement sur leur diamètre aérodynamique, regroupée en trois catégories :

- **PM₁₀** : particules dont le diamètre aérodynamique est inférieur ou égal à 10 μm . Les PM₁₀ sont composées majoritairement, à 70%, de PM_{2.5} (CITEPA, 2022).
- **PM_{2.5}** : particules « fines » dont le diamètre aérodynamique est inférieur ou égal à 2,5 μm
- **PM_{0.1}** : particules « ultrafines » dont le diamètre aérodynamique est inférieur ou égal à 100 nm

Dans la littérature, on peut retrouver une catégorie intermédiaire aux PM_{2.5} et PM_{0.1}, les **PM_{1.0}** qui sont définies comme des particules « très fines » dont le diamètre aérodynamique est inférieur ou égal à 1 μm . L'ensemble des particules quelles que soient leurs tailles sont définies comme les particules totales en suspension. Dans le cadre du code du travail, les particules sont classées différemment en fonction des fractions inhalables, thoraciques et alvéolaires (**partie 2.4**). Par ailleurs, le terme « nanoparticule » (NP) n'est pas approprié pour les particules atmosphériques et désigne des particules d'origine manufacturée, dont le diamètre aérodynamique est inférieur ou égal à 100 nm.

En fonction de leur taille, plus les particules sont petites et plus elles peuvent pénétrer et se déposer profondément dans l'appareil respiratoire (Valavanidis et al., 2013). Connaître la localisation des particules inhalées dans l'appareil respiratoire est nécessaire pour comprendre les mécanismes de toxicité associés à leur exposition. Le dépôt des particules est fortement conditionné par leur taille mais aussi pas leur forme, leur hygroscopicité, leur charge, le flux d'air et la géométrie de l'appareil respiratoire (Stuart, 1984). Cinq mécanismes de déposition des particules sont possibles (**Figure 1**).

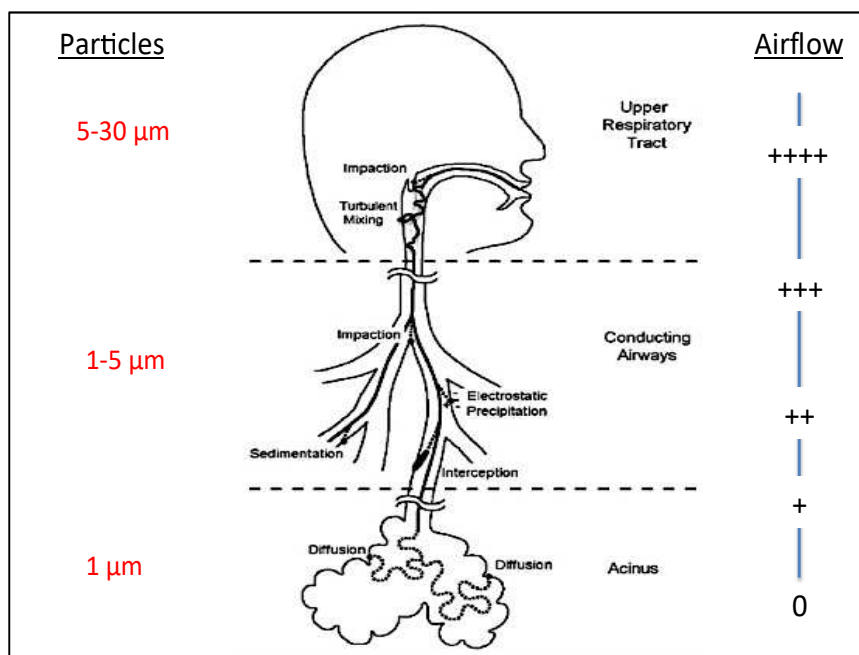


Figure 1. Mécanismes de déposition de particules inhalées dans les poumons en fonction de leur taille.
Adapté de (Darquenne, 2006) et de (Lauwerys et al., 2007).

Les particules ont tendance à suivre leur trajectoire initiale au lieu de se conformer aux courbes des voies respiratoires (Newhouse et al., 1976). Cependant, lorsque la trajectoire des voies aériennes change soudainement de direction et que la vitesse de l'air est élevée, les particules vont se déposer principalement par **impaction**, c'est à dire entrer en collision avec la paroi respiratoire. Le dépôt par impaction survient principalement au niveau du naso-pharynx et majoritairement pour des particules de diamètre élevé, supérieur à 5 μm (Lourenço & Cotromanes, 1982).

Au niveau trachéo-bronchique où la vitesse de l'air est plus faible, le dépôt se fait majoritairement par **impaction** et par **sédimentation**. Le mécanisme par sédimentation nécessite que les particules aient une masse suffisante pour se déposer par force gravitationnelle et transiter pendant un temps long dans les voies respiratoires. Ce mécanisme se retrouve au niveau des bronches et des bronchioles où la vitesse de l'air est lente et concerne des particules entre 1 μm et 5 μm .

D'autres mécanismes de déposition très spécifiques sont possibles dans la région bronchique tels que l'interception et la déposition électrostatique. Le dépôt par **interception** concerne principalement les fibres qui, du fait de leur forme allongée, se déposent dès qu'elles entrent en contact avec la paroi respiratoire. La **déposition**

électrostatique concerne exclusivement les particules chargées qui vont se déposer sur les parois au niveau de sites inversement chargés.

Pour les particules de dimension inférieure à 1 μm , la **diffusion** par mouvement brownien est le principal mode de déposition. Les particules se déplacent de manière aléatoire d'un endroit à l'autre dans les voies respiratoires. Ce dernier mécanisme prédomine au niveau des bronchioles et des alvéoles où la vitesse de l'air est pratiquement nulle.

1.2.2 Formation des particules

La distribution en taille des particules résulte de trois modes de formations, impliquant différents mécanismes physiques (**Figure 2**) : mode nucléation, mode accumulation et mode grossier ou « coarse » (Kwon et al., 2020).

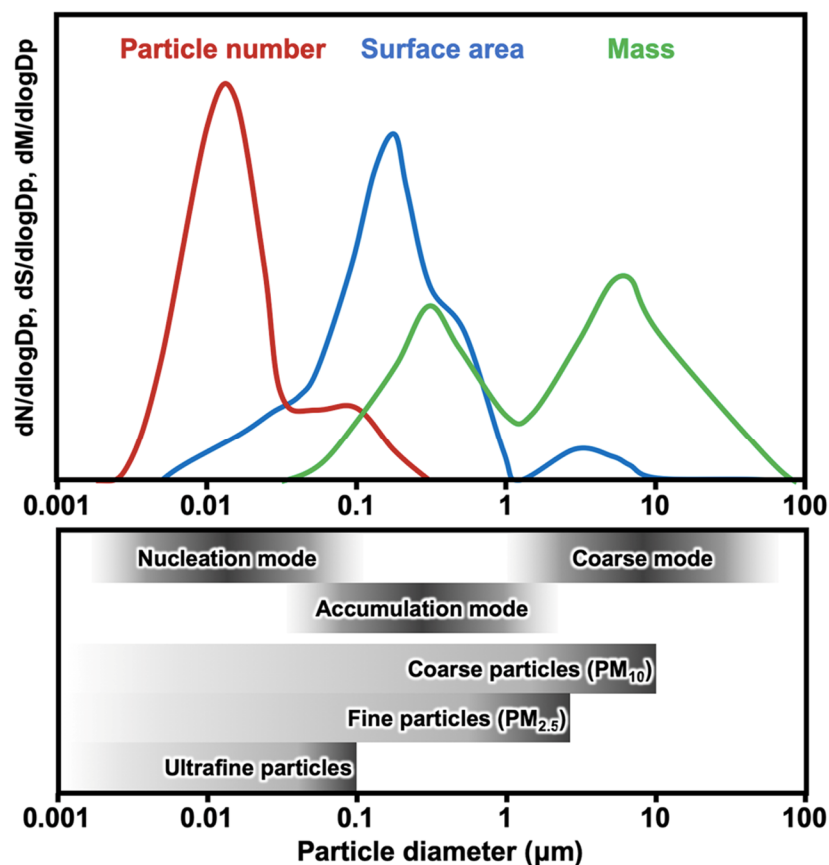


Figure 2. Modes de formation des particules et distribution de la taille en fonction de la concentration en nombre ($dN/d\log D_p$, nombre de particules/ mm^3), en aire de surface ($dS/d\log D_p$, aire de surface de particule/ mm^3) et en masse ($dM/d\log D_p$, masse de particules/ mm^3). D'après (Kwon et al., 2020).

Le **mode nucléation** correspond à des particules nouvellement formées par conversion gaz/particules. Dans ce mécanisme, la concentration en nombre est augmentée tandis que la concentration en masse reste sensiblement la même car les particules formées sont initialement de très petite taille. Ce mode permet la formation de PM_{0.1}. Le **mode accumulation** est ainsi appelé car les processus dynamiques de condensation et de coagulation mènent à l'accumulation de particules formant des PM_{2.5}. La condensation consiste en un transfert de molécules gazeuses sur une particule existante, ce qui augmente le diamètre des particules sans changer la concentration en nombre. La coagulation est un processus permettant la formation d'une particule à partir de la collision de deux ou plusieurs particules élémentaires, augmentant le diamètre des particules mais en diminuant la concentration en nombre. Enfin, le **mode grossier** permet la formation de PM₁₀ et de PM_{2.5} principalement émises par des processus de fragmentations mécaniques tels que l'abrasion ou l'érosion éolienne.

1.2.3 Aire de surface

La distribution en taille des particules peut être définie par la concentration en nombre, en masse et en aire de surface. L'aire de surface est définie comme la surface totale d'exposition par unité de masse. À masse équivalente (10 µg/m³) de particules, plus le diamètre est petit et plus la concentration en nombre de particules et l'aire de surface spécifique sont élevées (Oberdörster et al., 2005) (**Tableau 1**).

Tableau 1. Nombre de particules et aire de surface pour 10 µg/m³ de particules atmosphériques d'après (Oberdörster et al., 2005).

Diamètre des particules (µm)	Nombre de particules (cm ⁻³)	Aire de surface des particules (µm ² /cm ³)
5	153 000 000	12 000
20	2 400 000	3 016
250	1 200	240
5 000	0,15	12

D'après la **Figure 3**, l'aire de surface augmente exponentiellement quand le diamètre est inférieur à 100 nm. Ainsi, les PM_{0.1} ont une plus grande capacité d'adsorption

de composés et notamment de composés toxiques comme les métaux et les composés organiques (Terzano et al., 2010).

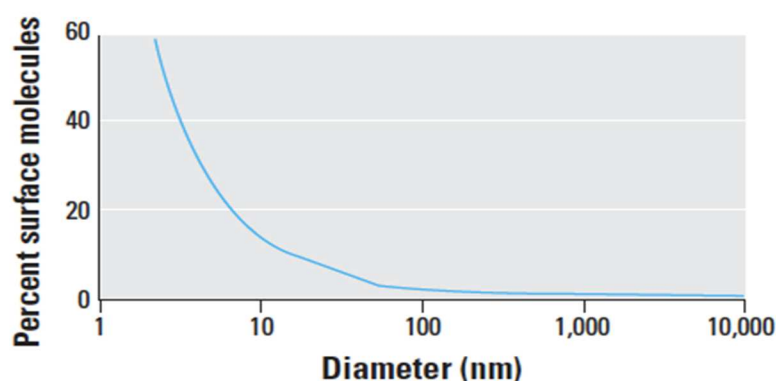


Figure 3. Aire de surface en en fonction du diamètre des particules. D'après (Oberdörster et al., 2005).

1.2.4 Composition chimique

Outre la taille impliquée dans la toxicité des particules, cette dernière dépend également de leur composition chimique (Kelly & Fussell, 2012). Les particules ont des compositions chimiques variées en fonction de leurs sources et des transformations qu'elles subissent durant leur transport et leur durée de vie dans l'atmosphère. Elles présentent, dans des proportions diverses, les différentes fractions décrites ci-dessous :

Fraction ionique

Les particules atmosphériques, notamment les PM_{2.5} sont constituées majoritairement d'ions inorganiques hydrosolubles. La fraction ionique peut représenter entre 40% et 50% de la masse totale de PM_{2.5} comme c'est le cas pour des particules urbaines de nombreuses villes chinoises (Y. Zhang et al., 2017) mais aussi compter jusqu'à 60-70% de la masse totale des particules (Salam et al., 2015). Cette fraction ionique est composée principalement des ions chlore (Cl⁻), sulfate (SO₄²⁻), nitrate (NO₃⁻), ammonium (NH₄⁺), sodium (Na⁺), potassium (K⁺), calcium (Ca²⁺) et magnésium (Mg²⁺) (Švédová et al., 2019). Les ions SO₄²⁻, NO₃⁻ et NH₄⁺ peuvent constituer à eux seuls entre 40% et 65% de la masse des PM_{2.5} (Sillanpää et al., 2006). Les ions Na⁺ et Cl⁻ sont retrouvés dans les PM_{2.5} lors de processus de combustions et également dans des PM₁₀ dont les sources sont plus variées (entretien des routes, industries métallurgiques) (Rogula-Kozłowska et al., 2014).

Fraction carbonée

La fraction carbonée est constituée de carbone élémentaire (EC) et de carbone organique (OC), elle peut représenter jusqu'à un tiers de la composition des PM_{2.5} (Bressi et al., 2013; Samara et al., 2014; Souza et al., 2014). L'EC désigne le carbone suie, composé purement primaire servant de support aux composés organiques. Il est émis lors de processus de combustion incomplète de combustibles fossiles ou de biomasse (W. Zhang et al., 2018). Par exemple, en Chine, environ 50% à 70% des émissions d'EC proviendraient de consommation résidentielle de combustibles solides tels que le charbon et la biomasse (Shen et al., 2012). Une autre source très importante d'EC est liée aux transports routiers (J. Feng et al., 2014; Song et al., 2015). L'OC est une composante organique d'origine primaire et secondaire, regroupant plusieurs centaines de composés organiques différents tels que des alcanes, des acides carboxyliques, des alcools, des aldéhydes, des cétones, des esters, des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) ou encore des dioxines. Les composés organiques les plus étudiés sont la famille des HAP. Ils sont formés par la combustion incomplète de matière organique comme le charbon ou le pétrole (Abdel-Shafy & Mansour, 2016) et ont pour sources principales les activités industrielles et le trafic routier (Villar-Vidal et al., 2014). Parmi les composés organiques présents dans des PM_{2.5-0.3} d'origines urbaine (trafic routier), rurale ou industrielle (industries du Fe, de l'acier et de l'Al, pétrochimique, pharmaceutique et alimentaire), on peut retrouver des HAP tels que l'acénaphthylène (AcPy), l'anthracène (Ant), le benzo[a]anthracène (BaA), le benzo[b]fluoranthène (BbFL), le benzo[k]fluoranthène (BkFL), le benzo[a]pyrène (BaP), le benzo[ghi]pérylène (Bg,h,iP), le chrysène (Chr), le fluorène (Flu), le fluoranthène (Fl), le naphthalène (Nap), l'indéno[cd]pyrène (InP), le dibenzo[a,h]anthracène (BkF), le phénanthrène (Phe) et le pyrène (Pyr) (Dergham et al., 2015). Les résultats d'une méta-analyse sur l'association entre cancer du poumon et exposition à des HAP d'origine industrielle ont montré une augmentation significative du risque relatif de cancer du poumon chez les sujets exposés professionnellement aux HAP dans les industries du charbon, du Fe et de l'acier (A. Singh et al., 2018). La solubilité de ces composés influence également leur toxicité. L'étude *in vitro* de Badran et al., (2020) a comparé la toxicité des fractions organiques extractibles et non-extractibles de PM_{2.5} urbaines de la région de Beyrouth, caractérisée par la présence de forts trafics routiers, de production d'électricité par des groupes électrogènes diesel, et de procédés d'incinération de déchets ménagers polluants. Les résultats ont révélé que la fraction organique extractible des PM_{2.5} était

celle qui induisait fortement les enzymes de phase I et de phase II impliquées dans l'activation métabolique des HAP et à l'origine d'importants dommages à l'ADN (Badran et al., 2020).

Fraction métallique

Les particules contiennent souvent des éléments comme le Cd, le Pb et l'As qui peuvent représenter, entre 13% et 42% de la composition totale des particules (Gautam et al., 2016). Les métaux (K, Ca, Ga, Pb, Sr, Zr, Ba, Na, Li, Be, Ti, Sn, Mg, Al, Cs, Bi, In, Sb) et les métaux de transition (Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Cd, Au, V, Hg, Nb, Tl, Co, Mo, Zr, Rb, Ag) sont les éléments métalliques majoritairement retrouvés dans la composition des particules urbaines (Falcon-Rodriguez et al., 2016).

Les éléments métalliques peuvent servir de traceur pour identifier les différentes sources des particules. Par exemples, le Fe, Cu, Ba, Zn, Sn et Sb sont caractéristiques des particules émises par les systèmes de freins (Grigoratos & Martini, 2015; Hagino et al., 2016; J. Zhao et al., 2015) et le Cu, K, Mn, Zn, Pb, Ba, Sb, Br, As, V, Sn et Cd sont considérés comme des traceurs du trafic routier (Gietl et al., 2010). L'Ag, Al, As, Ca, Cd, Fe, Mn, Pb, et Rb sont émis en fortes concentration par les industries de production d'acier (Hleis et al., 2013; Querol et al., 2007) tandis que l'As, Bi, Ga et Cu sont liés à la métallurgie du Cu (Querol et al., 2007).

L'étude de Jiang et al., (2014) montre que dans des particules d'origine urbaine, il existe une variation de la solubilisation des métaux en fonction des différentes fractions métalliques. Les métaux des PM_{2.5} (Zn, Ca, Cd, V, Mg, Cu, Pb, Mn, Ni, Mo, Fe, Cr et Al) sont plus solubles que ceux des PM₁₀ (Zn, Ca, Cd, V, Mg, Cu et Pb). La fraction métallique hydrosoluble peut être à l'origine de l'expression de médiateurs de l'inflammation, de stress oxydant (Birmili et al., 2006; Gali et al., 2017; Roy et al., 2016) et d'effets génotoxiques (Kogianni et al., 2021; S. Yadav et al., 2019). La solubilité des métaux est donc à prendre en compte pour déterminer les effets toxiques des métaux sur la santé.

Fraction biologique

Des composés biologiques comme des pollens, des spores de champignons, des bactéries, des virus ou des fragments de plantes et d'animaux peuvent s'adsorber sur les particules (Raisi et al., 2013). L'inhalation de micro-organismes présents dans des PM_{2.5} et PM₁₀ peut

être à l'origine d'allergies variées et favoriser la propagation d'infections respiratoires (Cao et al., 2014) tel que le COVID-19 (Copat et al., 2020).

1.3 Les différences sources de particules

1.3.1 Sources naturelles

Les particules peuvent avoir des origines naturelles comme des poussières minérales résultant de l'érosion de roches ou des sols, d'embruns marins ou des poussières volcaniques.

Les océans qui recouvrent plus de 70% de la surface de la Terre produisent des aérosols d'embruns marins qui sont l'une des plus grandes sources naturelles de particules (Seinfeld & Pandis, 2006). Les feux de forêts (Alves et al., 2011; M. Li et al., 2021) et les éruptions volcaniques (Horwell et al., 2003) sont également des sources naturelles de $PM_{2.5}$ et qui sont responsables d'affections respiratoires (Aguilera et al., 2021; Oudin et al., 2013). L'érosion naturelle et les vents conduisent à une exposition aux PM_{10} très importante dans les régions arides telles que le Moyen-Orient ou l'Asie-du Sud-Est, causant de nombreux symptômes respiratoires (Williams et al., 2017). La région du golfe persique est également soumise à des tempêtes de sable et de poussières qui accroissent les émissions de $PM_{2.5}$, contribuant à 37,4% des émissions totales de $PM_{2.5}$ au Koweït (Alahmad et al., 2021). De plus, plusieurs milliards de tonnes de poussières sahariennes sont émises chaque année et peuvent être transportées sur de longues distances pouvant atteindre les Amériques du Nord et du Sud, l'Europe et le Moyen-Orient (Varga, 2020). Enfin, des micro-organismes peuvent participer également à cette pollution particulière par la fixation de pollens, de spores de champignons, de bactéries ou encore des fragments de plantes ou d'insectes à des poussières de sols (Miguel et al., 1999).

1.3.2 Sources anthropiques

En 2019 en France, avant la pandémie de COVID-19, les émissions annuelles de PM_{10} , $PM_{2.5}$ et PM_1 représentaient respectivement 207,5 kt, 126,2 kt et 98,1 kt (CITEPA,

2021). Les contributions des différentes sources, variables en fonction des tailles de particules sont décrites dans la **Figure 4**.

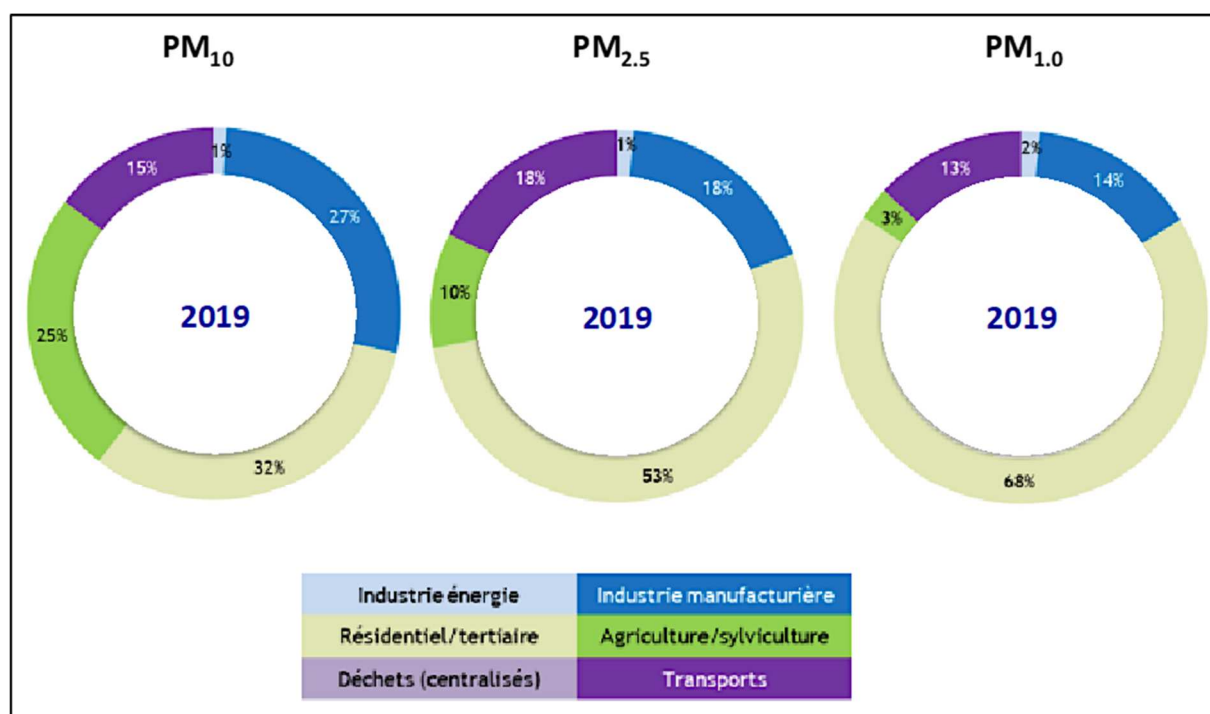


Figure 4. Principales sources d'émission des PM₁₀, PM_{2.5} et PM_{1.0} en 2019, en France métropolitaine. Adapté de (CITEPA, 2021).

Pour les PM₁₀, le secteur contribuant majoritairement aux émissions de ce polluant est le résidentiel/tertiaire (32%), du fait de la combustion du bois et, dans une moindre mesure, du charbon et du fioul. L'industrie manufacturière compte pour 27% des émissions et l'agriculture/sylviculture pour 25%, notamment du fait des élevages et des labours des cultures. Enfin, le transport routier représente 15% des émissions, dû principalement à l'échappement des combustibles brûlés et à l'abrasion des routes, des freins et des pneus.

Pour les PM_{2.5}, le secteur contributeur majoritaire est également le résidentiel/tertiaire (53%), dont la principale source est la combustion de la biomasse, majoritairement domestique, ainsi que, dans une moindre mesure, le fioul. Les transports routiers, et l'industrie manufacturière comptent chacun pour 18% des émissions, dont les principales sources sont le travail du bois puis les chantiers/BTP et l'exploitation des carrières. Pour les secteurs moins représentés comme la transformation d'énergie,

l'agriculture/sylviculture et le traitement des déchets, les émissions proviennent majoritairement de la combustion de biomasse, de charbon ou de carburants pour les engins mobiles non routiers, et des élevages. Le secteur le moins émetteur de PM_{2,5} est celui du traitement des déchets, qui a connu de fortes réductions d'émissions entre 1990 et 2005 grâce à une mise en conformité des installations d'incinération des déchets.

Pour les PM_{1,0}, tous les secteurs d'activité contribuent aux émissions en France métropolitaine mais la grande majorité est issue du secteur résidentiel/tertiaire qui compte pour 68% des émissions, principalement due à la combustion du bois mais aussi du charbon et du fioul. Les émissions du secteur de l'industrie manufacturière, deuxième secteur émetteur (14%), sont principalement causées par la métallurgie. Le secteur des transports représente 13% des émissions de PM_{1,0}.

Par ailleurs, les activités pyrotechniques peuvent être une source ponctuelle mais importante de particules dans l'atmosphère dans le cas de feux d'artifices ou dans l'air intérieur lors d'expositions professionnelles par l'utilisation d'armes de tirs, de fumigènes ou par d'autres engins pyrotechniques. Cette problématique sera détaillée dans la **partie 1.4**.

1.3.3 Réglementation des particules de l'air ambiant

En France, la réglementation de la qualité de l'air a été concrétisée en 1996 avec la Loi sur l'Air et l'Utilisation Rationnelle de l'Énergie (LAURE). Cette loi transpose en droit français la directive européenne 96/62/CE, qui a comme objectif de définir une stratégie commune pour l'évaluation et la gestion de la qualité de l'air ambiant dans les États membres. Cette directive a été à l'origine de quatre directives filles, fixant des valeurs réglementaires (en moyenne annuelle, voire en période de pic) pour plusieurs polluants, s'appuyant sur les résultats des travaux de l'OMS. Ainsi, la directive 1999/30/CE a permis la fixation de concentrations limites journalières et annuelles d'exposition aux PM₁₀ pour la population générale. En 2008, la législation européenne relative à la qualité de l'air a été clarifiée et simplifiée avec l'adoption de la directive 2008/50/CE qui fusionne dans un seul acte la directive cadre de 1996 et trois de ses directives filles (99/30/CE,

2000/69/CE et 2002/3/CE) pour l'établissement d'une qualité de l'air ambiant et d'un air pur pour l'Europe. C'est donc à partir de 2008 qu'une réglementation européenne apparaît pour les PM_{2.5} qui est transposée en 2010 en droit français (ANSES, 2017).

Grâce à l'établissement de ces différentes directives, le niveau des émissions des particules totales en suspension est globalement en baisse depuis 1990 (**Figure 5**).

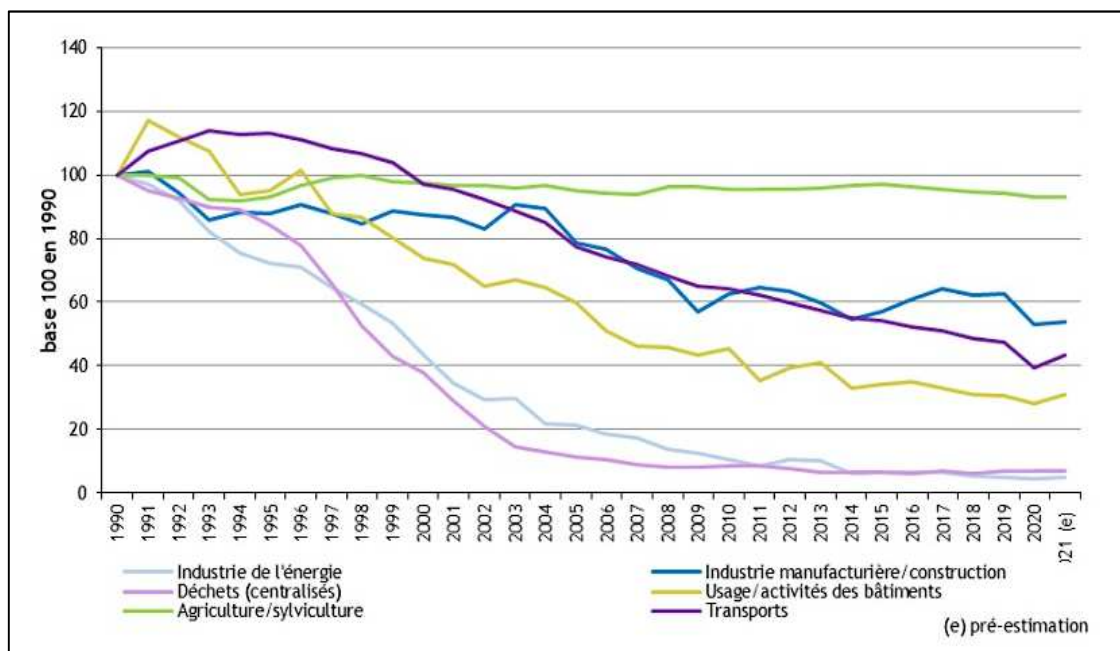


Figure 5. Évolution des émissions des particules totales en suspension depuis 1990 à 2020. D'après CITEPA 2022.

Tous les secteurs ont contribué à la diminution continue observée, excepté l'agriculture/sylviculture dont la courbe est plutôt stagnante. Les émissions du secteur résidentiel/tertiaire ont été réduites de moitié sur la période notamment grâce au renouvellement et à l'amélioration des équipements individuels brûlant du bois. Dans le cas des transports, les émissions proviennent, d'une part, de la combustion des carburants et, d'autre part, de l'usure des routes mais aussi des pneus et des freins. Les émissions des polluants gazeux à l'échappement ont nettement diminué au cours de ces trois dernières décennies suite à la mise en œuvre des différentes normes relatives aux véhicules routiers, normes Euro, à partir de 1990. Dans le secteur de la transformation d'énergie et du traitement des déchets, les émissions ont connu une très forte baisse, moins 96% depuis 1990 et sont désormais mineures. La baisse observée dans la

transformation d'énergie s'explique en grande partie par l'arrêt de l'exploitation des mines à ciel ouvert en 2002 et des mines souterraines en 2004. On observe des creux d'émissions en 2009, 2011, 2014 et en 2020. Ces phénomènes temporaires ont des causes variées : crise économique en 2009, douceur du climat en 2011 et 2014 et crise sanitaire en 2020. En effet, entre 2019 et 2020, une diminution nationale des émissions des particules totales en suspension de 7% est observée, avec une contribution de tous les secteurs sauf l'agriculture/sylviculture.

Les progrès des technologies dans les différents secteurs ont permis une réduction très importante des émissions de particules mais les niveaux de PM₁₀, PM_{2.5} et PM_{0.1} restent une préoccupation majeure en terme de santé publique. Des niveaux de qualité de l'air sont recommandés par l'OMS pour un certain nombre de polluants, dont les particules, sur la base d'études scientifiques. Les valeurs guides ainsi établies ne sont pas des valeurs réglementaires mais permettent aux états d'élaborer leur réglementation en fixant des normes à ne pas dépasser. Le **Tableau 2** résume les valeurs limites recommandées par l'OMS (OMS, 2021) et celles fixées par la réglementation en Europe (AIRPARIF, 2021) et aux USA (EPA, 2022).

Tableau 2. Concentrations moyennes limites journalières et annuelles des particules (µg/m³).

Taille particules	Concentration moyenne limite sur 24h (µg/m ³)	Concentration moyenne limite annuelle (µg/m ³)
PM₁₀	USA : 150 Europe : 50 (≤ 35 jours/an) OMS : 45	USA : nd Europe : 40 OMS : 15
PM_{2.5}	USA : 35 Europe : 20 OMS : 15 (≤ 3-4 jours/an)	USA : 12 Europe : 25 OMS : 5

Pour les PM₁₀ et PM_{2.5}, les recommandations de l'OMS pour les concentrations moyennes limites sur 24h sont respectivement de 45 µg/m³ et 15 µg/m³ en ne dépassant pas 3-4 jours par an et les concentrations moyennes limites annuelles sont respectivement de 15 µg/m³ et 5 µg/m³. En Europe, la réglementation fixe des valeurs limites pour les PM₁₀ et

PM_{2.5} plus hautes que celles recommandées par l'OMS (**Tableau 2**). Les directives européennes (Directive 2008/50/CE et Directive 2004/107/CE) sont transposées dans la réglementation française, qui peut ajouter des critères plus restrictifs que ceux imposés par la Commission européenne.

Tous les ans, l'Agence Européenne pour l'Environnement (EEA) publie un rapport sur la qualité de l'air en Europe. D'après le rapport EEA, 2020, en 2018, la valeur limite journalière de l'Europe pour les PM₁₀, fixée auparavant à 50 µg/m³, a été dépassée en Bulgarie, en Pologne, en Serbie, en Turquie, en Macédoine, au Montenegro et en Bosnie-Herzégovine, atteignant des valeurs comprises entre 50 et 100 µg/m³. Dans le cas de la valeur limite annuelle de l'Europe pour les PM₁₀, fixée à 40 µg/m³, seulement quatre pays ont dépassé cette valeur (le Montenegro, la Macédoine, la Turquie et la Bosnie-Herzégovine) avec des concentrations comprises entre 45 et 55 µg/m³. Cependant, en se plaçant à la valeur recommandée par l'OMS avant 2021, soit 20 µg/m³, 23 pays sur 37 dépassent ce niveau de recommandation. Concernant, les concentrations annuelles en PM_{2.5}, 24 pays sur 37 dépassent la valeur recommandée par l'OMS avant 2021, soit 10 µg/m³, dont seule la Bosnie-Herzégovine dépasse la valeur limite européenne de 25 µg/m³ (environ 40 µg/m³). Les particules ont des effets néfastes sur la santé même à très faibles concentrations et le seuil en dessous duquel il n'y aurait pas d'effets n'est pas encore identifié (Danesh Yazdi et al., 2021; Khomenko et al., 2021). Ainsi, les limites très basses recommandées par l'OMS visent à établir des concentrations en particules les plus faibles possibles en dessous desquelles les effets sont considérés comme acceptables.

1.4 Activités pyrotechniques et sources de particules

La pyrotechnie au sens littéral du terme se définit par l'art de manier le feu. Elle regroupe la pyrotechnie militaire qui correspond à l'ensemble des techniques de préparation et d'emploi des explosifs et des munitions et la pyrotechnie civile, définie par l'ensemble des techniques de fabrication et d'utilisation des pièces d'artifices. Les activités pyrotechniques peuvent être classées en fonction de l'effet produit : lumière, gaz, fumée, chaleur, projection de munition, onde de pression, effet de souffle. Il peut s'agir également d'une combinaison de tous ces effets. Un dispositif pyrotechnique est constitué d'un mélange de plusieurs composés solides dont un oxydant, un agent réducteur qui est

le carburant, éventuellement un colorant et de divers autres additifs, générant un aérosol, composés de gaz et de particules en suspensions, permettant l'effet pyrotechnique souhaité. Dans le **Tableau 3**, les dispositifs pyrotechniques couramment utilisés y sont décrits.

Tableau 3. Dispositifs pyrotechniques courants. Adapté de Kosanke et al., (2013).

Dispositif	Domaine	Description
Fusée de ligne	Militaire	Dispositif de propulsion pour former une ligne entre les navires.
Fusée de signalisation	Militaire et civil	Appareil portatif pour propulser de la fumée en altitude pour la signalisation
Fusée d'éclairage	Militaire	Appareil portatif qui se déploie en parachute portant des bougies pour éclairer la terre ou la mer.
Fusées de détresse	Militaire et civil	Dispositifs pour marquer des accidents (autoroute) ou des situations dangereuses.
Feux d'artifices	Civil	Fusées, chandelle romaine, feu de Bengale, pétards
Moteur miniature	Civil	Utilisation de poudre noire ou de compositions pyrotechniques pour propulser des modèles réduits de fusée.
Amorceur	Militaire	Compositions pyrotechniques utilisées pour l'amorçage des charges propulsives des mortiers, de l'artillerie et des projectiles militaires similaires
Amorceur	Civil	Utilisé pour allumer des feux d'artifice et initiateurs d'airbag
Fusible	Militaire	Retardement ou transfert de l'amorçage dans une variété de dispositifs
Thermique	Militaire	Dispositifs destructeurs de documents classifiés, d'armes, d'appareils électroniques
Thermique	Civil	Appareils de soudage
Générateurs de gaz	Militaire et civil	Fournitures d'oxygène de secours dans les avions, gonfleurs d'airbags pour les véhicules, démarreurs de moteurs
Fumigènes	Militaire	Génération de fumée pour le camouflage et la signalisation
Fumigènes	Civil	Signaux terrestres ou aériens, dispersion de pesticides

La littérature sur les émissions de particules issues d'activités pyrotechniques et la toxicité liées à ces activités a été très bien décrite dans le domaine des feux d'artifices. Cependant, d'autres dispositifs pyrotechniques utilisés dans l'artillerie ou les fumigènes, dont les usages sont très répandus dans le domaine militaire ont fait l'objet de très peu d'études de toxicité. Ainsi, il y a un grand manque de données sur la physicochimie et sur les risques sanitaires liées à l'inhalation de particules d'activités pyrotechniques dans le cadre d'expositions professionnelles.

1.4.1 Feux d'artifices

Historiquement, la pyrotechnie trouve une origine festive dans les feux d'artifices en Chine, avant de s'importer en Europe et de gagner le monde entier. De nos jours, les feux d'artifice sont très largement utilisés dans les domaines festifs, artistiques et sportifs.

De nombreux événements festifs, tels que les Fêtes Nationales et les célébrations du Nouvel An dans le monde entier (Retama et al., 2019), les fêtes des Lanternes et du Printemps en Chine (C.-C. Lin et al., 2014), la fête de Diwali en Inde (Deka & Hoque, 2014; S. K. Yadav et al., 2019; Yerramsetti et al., 2013) et au Royaume-Uni (Godri et al., 2010), ou encore les fêtes de « Mascletàs » en Espagne (Crespo et al., 2012) sont associés à des émissions massives de particules en suspension dans l'air. Une large étude américaine (Seidel & Birnbaum, 2015) a analysé les données sur la qualité de l'air de 315 sites de surveillance de feux d'artifices aux États-Unis entre 1999 et 2013. Les concentrations en $PM_{2.5}$ et d'autres polluants ont été mesurées avant, pendant et après les feux d'artifice du 4 juillet. Les concentrations de particules sont maximales à 21h avec une augmentation de $21 \mu g/m^3$ par rapport à des jours contrôles où la pollution de fond est de $12 \mu g/m^3$. Le lendemain à midi, les niveaux retournent à la normale. Au niveau National, il est observé une augmentation moyenne de $5 \mu g/m^3$ (42%) des niveaux de $PM_{2.5}$ sur une période de 24h. La distance à laquelle les mesures sont effectuées par rapport aux sites de tirs influence grandement les niveaux de $PM_{2.5}$. Par exemple, sur un site adjacent aux feux d'artifice et quelques heures après les tirs, les niveaux de $PM_{2.5}$ montent à environ $500 \mu g/m^3$ et la moyenne sur 24h est augmentée de $48 \mu g/m^3$ (370%). De même, en Inde, pendant la fête de Diwali, des augmentations de l'ordre de 56% à 121% des niveaux de particules par rapport à la pollution de fond sont rapportées (M. Kumar et al., 2016). Les niveaux de particules varient fortement en fonction de la distance des sites de mesures par rapport aux feux d'artifice, des conditions météorologiques et de la pollution locale (Joly et al., 2010; Vecchi et al., 2008). De plus, il existe de fortes différences de concentrations en particules liées aux diversités culturelles entre les pays. Par exemple, la **Figure 6** présente les concentrations médianes en $PM_{2.5}$ et en PM_{10} pendant des jours de feux d'artifices et pendant des jours dits « normaux » dans trois régions du monde : l'Inde, la Chine et Taïwan ainsi que l'Europe et l'Amérique du Nord nommé « Pays occidentaux » (C.-C. Lin, 2016).

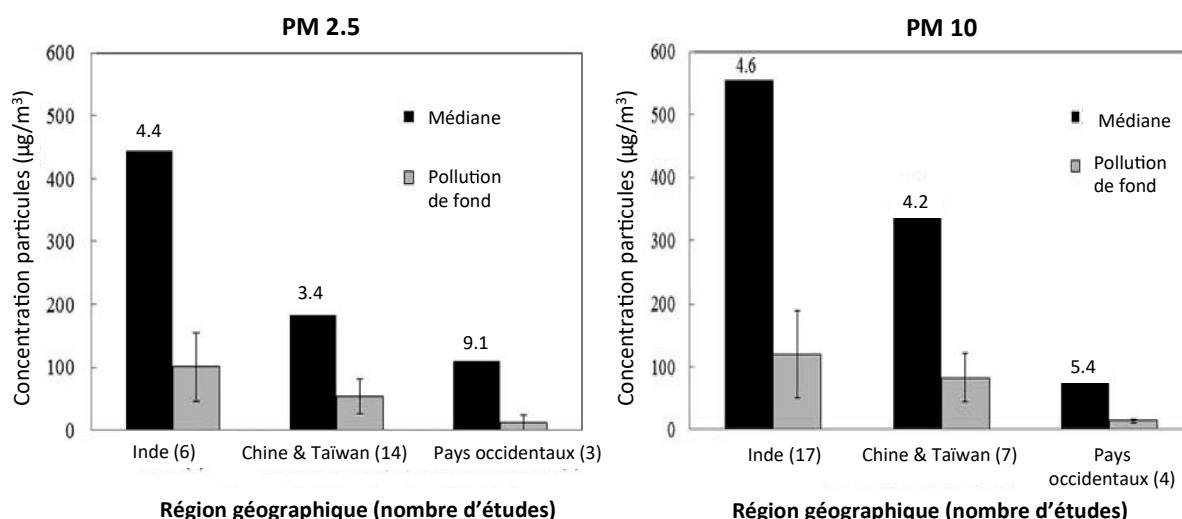


Figure 6. Distribution géographique des concentrations médianes de PM₁₀ et de PM_{2.5} pendant une période de feux d'artifices. "Pollution de fond" fait référence aux concentrations de particules pendant une période dite normale, hors période de feux d'artifices. Les résultats sont exprimés en expression relative par rapport à la pollution de fond. Adapté de Lin, 2016.

Les concentrations en PM_{2.5} et PM₁₀ sont les plus élevées en Inde (101 µg/m³ et 119 µg/m³), suivies de la Chine et de Taïwan (54 µg/m³ et 83 µg/m³), puis des pays occidentaux (12 et 14 µg/m³). Lorsque l'on compare les expressions relatives des niveaux de particules, par exemple des PM_{2.5}, en période de feux d'artifice par rapport à la pollution de fond, celles des pays occidentaux (9,1) sont supérieures à celles de l'Inde (4,4), de la Chine et de Taïwan (3,4) (**Figure 6**).

En raison de la forte pollution causée par les feux d'artifices, certaines villes dont Shanghai (Chine) ont imposé des mesures réglementaires dans l'usage des feux d'artifices. Cette réglementation a permis une baisse efficace des niveaux de PM_{2.5} d'environ 60% sur une période de cinq ans (Yao et al. 2019).

L'augmentation des concentrations de particules pendant une période de feux d'artifices va causer des modifications des niveaux de métaux, d'ions et de composés organiques émis dans l'atmosphère. Concernant la taille de ces particules, leur distribution résulte du mode de formation par accumulation générant principalement des particules de taille entre 100 et 500 nm (Do et al., 2012; M. Kumar et al., 2016; C.-C. Lin et al., 2014; Nirmalkar et al., 2013; Pathak et al., 2015; Retama et al., 2019; Tian et al., 2014). De nombreux métaux sont utilisés comme colorants dans les feux d'artifices afin d'augmenter leur luminosité et de les rendre plus attractifs. Par exemple, le Fe permet

une meilleure production d'étincelles et les éléments tels que le Sr, Na, Cu et Ba sont utilisés pour des colorations rouge, jaune, vert et bleu, respectivement, ou encore le Ca qui permet d'intensifier la coloration d'autres composés (Kulshrestha et al., 2004). Ainsi, lors des fêtes du printemps Chinois, il est retrouvé une augmentation des niveaux d'Al, K, Ba, Sr dans l'air spécifiquement liés aux feux d'artifices (Kong et al., 2015). De plus le K, Si, Al, Na, Ca et Fe représenteraient entre 85% et 90% de tous les éléments chimiques émis pendant cette période (Kong et al., 2015). De même, des augmentations des concentrations en Al, Zn, Pb et Cd (5 à 12 fois), Cu, Fe et Mn (25 à 40 fois) et du Co et V (70 à 80 fois) sont observées lors de la fête de Diwali (Chatterjee et al., 2013). Des augmentations des concentrations d'autres métaux tels que le Cu, Zn, Pb, Cd, Cr, and Fe ont également été décrites dans la littérature (Hickey et al., 2020; C.-C. Lin, 2016). Ainsi, l'Al, Mg, K, Ba et Sr sont les éléments métalliques majoritairement retrouvés dans l'air après des épisodes de feux d'artifices, signifiant que ces métaux pourraient servir d'éléments traceurs (Crespo et al., 2012; Godri et al., 2010; C.-C. Lin, 2016).

Des concentrations élevées de nombreux ions hydrosolubles sont généralement observées après des feux d'artifices, notamment, K^+ , Mg^{2+} , Cl^- et SO_4^{2-} (Chatterjee et al., 2013; S. K. Yadav et al., 2019; Yao et al., 2019a). D'autres ions sont également souvent détectés tels que NO_3^- , SO_4^{2-} , Ca^{2+} et Na^+ , pendant des périodes de feux d'artifices mais le K^+ est considéré comme un traceur fiable de particules émises par les feux d'artifices (Chatterjee et al., 2013; Cheng et al., 2014; C.-C. Lin et al., 2014; Yao et al., 2019a).

À propos des composés organiques, il semblerait que les feux d'artifices augmentent significativement l'OC mais peu l'EC (Kong et al., 2015). Pour les HAP, des études suggèrent qu'ils ne sont pas émis directement par les feux d'artifices et que leur part est négligeable par rapport aux deux sources majeures de HAP que sont la combustion de biomasse et le trafic routier (C.-C. Lin, 2016).

1.4.2 Armes à feu de petits calibres

Les armes à feu sont classées dans les activités pyrotechniques et sont largement utilisées par les armées françaises et du monde entier. Les armes à feu de petit calibre ou légères désignent des armes utilisant des munitions de calibre inférieur à 20 mm.

Les quantités de particules de tirs émises dans l'air sont nettement supérieures à celles émises lors de feux d'artifices et vont dépendre du nombre de tirs successifs. En effet, en fonction du type de munition et à proximité du tireur, un tir peut générer jusqu'à 17 mg/m³ de particules alors que trois, six ou dix tirs génèrent respectivement 43 mg/m³, 93 mg/m³ et 112 mg/m³ de particules (Mariussen et al., 2021). D'autres études rapportent des concentrations élevées en particules, entre 15 et 80 mg de particules/cartouche (Bergström et al., 2015; Wingfors et al., 2014). Ces valeurs sont près de 1500 à 4500 fois supérieures aux valeurs limites sur 24h recommandées par l'OMS pour les PM₁₀ et PM_{2.5} atmosphériques respectivement. Cependant, des concentrations beaucoup plus faibles retrouvées dans l'air ambiant au niveau d'un stand de tirs sur une période de 15h30 étaient de 0,284 mg/m³ (Mekki, 2017) mais dépassent largement les limites recommandées par l'OMS.

Concernant la taille des particules, il est retrouvé diverses tailles notamment des PM₁₀ dont le diamètre aérodynamique est compris entre 3 µm et 7 µm (Mekki, 2017), < 4µm (Bergström et al., 2015) et majoritairement des PM_{2.5} (Aurell et al., 2019; Mariussen et al., 2021). Toutefois, il semblerait que plus de 90% des particules totales en suspension aient un diamètre inférieur à 30 nm (Wingfors et al., 2014).

Les particules de tirs d'armes légères sont composées de métaux variés, de suies et de composés organiques (Wingfors et al., 2014). Selon le type de munition utilisé, les principaux métaux détectés dans leur composition sont le Cu (37%), le Pb (13%), le Bi (6%), le Zn (4%) et le Sb (3%) (**Figure 7**).

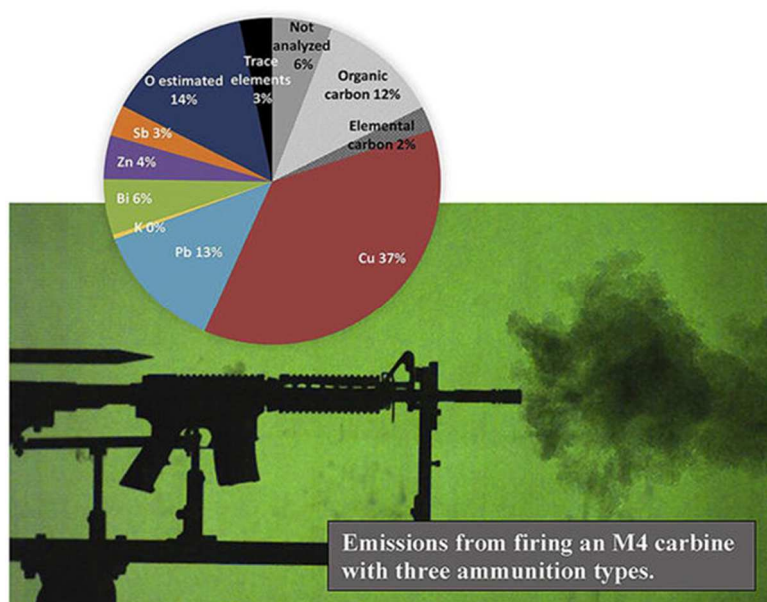


Figure 7. Composition chimique de particules issues de carabine militaire M4 (Aurell et al., 2019).

Les fortes concentrations en Cu et en Pb sont également retrouvées après des tirs avec d'autres types d'armes (Bergström et al., 2015; Brochu et al., 2011). En raison de la forte toxicité humaine et environnementale du Pb, des munitions sans Pb sont de plus en plus utilisées depuis une vingtaine d'années. Cependant, il est rapporté que les particules de ce nouveau type de munition contiennent de fortes concentrations en Cu, Zn et Fe, supérieures à celles des munitions avec Pb et pouvant dépasser les limites d'exposition, pour le Cu par exemple (Bergström et al., 2015; Grabinski et al., 2017; Voie et al., 2014; Wingfors et al., 2014).

Divers composés organiques composent les particules de tirs d'armes légères comme des composés aromatiques azotés (carbazole, quinolone, phénazine), des phtalates et également des composés de la famille des HAP (Moxnes et al., 2013; Wingfors et al., 2014). En effet, de nombreux HAP sont abondamment détectés comme le Nap, le Pyr, le BaP l'AcPy, le Phe, le Fl, le Bg,h,iP ou encore le BaFL (Aurell et al., 2019; Wingfors et al., 2014).

1.4.3 Les fumigènes

Les fumigènes font partie des activités pyrotechniques et sont largement utilisés dans le domaine militaire dont les premières références d'utilisations datent de 2000 ans avant J-C (North Atlantic Treaty Organization, 2016). Le brûlage de la paille mouillée était une technique classique pour générer un brouillard et dissimuler les positions ennemies afin de créer la confusion sur le champ de bataille (Nicholson, 1943). L'usage systématique des fumigènes commence pendant la Première Guerre Mondiale avec la fabrication par les anglais des premières grenades à fumigènes à base de phosphore blanc (North Atlantic Treaty Organization, 2016). Les fumigènes sont alors utilisés pendant les combats par les forces terrestres et navales pour masquer les attaques ainsi que la répartition des troupes et des navires. (**Figure 8**). A partir des années 1970, l'efficacité des fumigènes pendant le combat devient évidente et conduit au développement scientifique de nouvelles formulations pour améliorer les mécanismes de diffusion de la fumée.

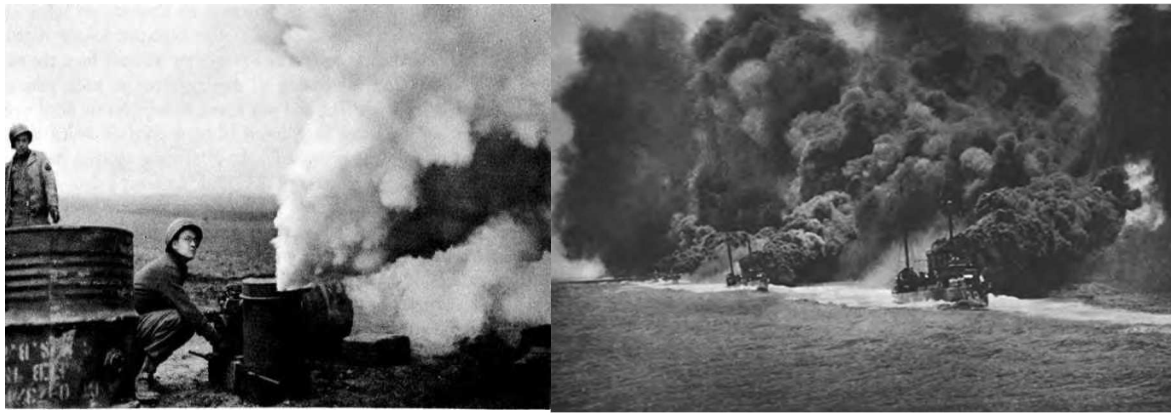


Figure 8. Utilisation de fumigènes pendant la 1^{ère} Guerre Mondiale. D'après le rapport de (North Atlantic Treaty Organization, 2016)

De nos jours, les fumigènes sont généralement utilisés dans un cadre professionnel et principalement dans le domaine militaire pour le camouflage ou la signalisation. Les particules émises par la combustion du fumigène caractérisent la fonction de celui-ci. En effet, les particules produites par les fumigènes à fonction de camouflage sont capables de bloquer ou de perturber les transmissions du spectre électromagnétique tel que les rayonnements visibles, infrarouges ou micro-ondes (North Atlantic Treaty Organization, 2016). Les fumigènes de signalisation ont une longue histoire d'utilisation militaire et sont disponibles dans une variété de couleurs différentes permettant la communication, la signalisation et le marquage (Conkling & Morcella, 2018). Les fumigènes peuvent être utilisés également par les forces de l'ordre pour la protection et la sécurité des personnes comme anti-intrusion ou encore dans le domaine de l'agriculture comme procédé d'application des pesticides. En France, les fumigènes sont des produits en vente libre dans le commerce et dont l'usage est libre sauf dans certaines circonstances (Fête Nationale, manifestations comportant des risques élevés de troubles à l'ordre public, stades). Ainsi, les populations civiles peuvent être amenées à les utiliser lors de manifestations sociales, culturelles, politiques, sportives, pour leur sécurité (feux de détresse) ou lors d'événements festifs.

Bien que les fumigènes soient utilisés massivement dans le domaine militaire et notamment lors des entraînements des soldats, très peu d'études se sont intéressées aux émissions de particules dans l'air et à leur composition physico-chimique. Dans ces études, seule la taille des particules a été étudiée (Hemmilä, Hihkiö, Kasanen, et al., 2007a;

Hemmilä et al., 2013; Karlsson et al., 1991; van Hulst et al., 2017). Il existe une très grande diversité de fumigènes dont les principales familles seront décrites dans la **partie 2.3.1**. Selon le type de fumigène, les particules émises sont de tailles variées $< 5 \mu\text{m}$ (Karlsson et al., 1991) $< 2 \mu\text{m}$ (Hemmilä et al., 2013; van Hulst et al., 2017), ou $< 1 \mu\text{m}$ (Hemmilä, Hihkiö, & Linnainmaa, 2007). Concernant leur composition chimique après combustion, seule l'étude de Hemmilä et al., 2013 rapporte que les particules de fumigènes sont principalement constituées de carbone et d'oxygène mais indique également la présence de Cl, K, Zn, Al et Si. Ainsi, il existe un grand manque d'informations sur la caractérisation physico-chimique des particules de fumigènes.

2. Effets sanitaires liés à l'inhalation d'aérosols issus d'activités pyrotechniques

Le chapitre précédent a montré que les activités pyrotechniques peuvent être une source très importante de particules dans l'air. Ces particules pourraient rester en suspension dans l'air pendant 20h (Barman et al., 2008) voire une semaine jusqu'à un mois après des feux d'artifices, conduisant alors à des concentrations élevées de particules sur une période prolongée (Agrawal et al., 2011; Chatterjee et al., 2013; Kong et al., 2015). Il est bien connu que les particules atmosphériques sont à l'origine de nombreuses maladies respiratoires (Falcon-Rodriguez et al., 2016; Loboda et al., 2016). Ainsi, ces particules issues d'activités pyrotechniques peuvent présenter un risque pour la santé de la population générale dans le cas de feux d'artifices ou dans le cas d'expositions professionnelles avec l'utilisation d'armes à feu ou de fumigènes.

2.1 Toxicité des feux d'artifices

De façon générale, la manipulation de substances énergétiques nécessite des précautions particulières, encadrées par une réglementation stricte pour l'industrie (Comet et al., 2013). Les risques sanitaires des feux d'artifices sont principalement connus dans le cas d'accidents comme des blessures au niveau des yeux et des mains, des brûlures, ainsi que de certains cas mortels, souvent lors de mauvais usages personnels (Canner et al., 2014; Moore et al., 2014; Patel & Mukherjee, 2014; Sandvall et al., 2017).

Outre le risque explosif ou d'incendie, l'impact des feux d'artifice sur la santé humaine est attribué à la grande quantité de composants chimiques émis qui ont été utilisés lors de la fabrication (Gouder & Montefort, 2014). Seules quelques études se sont intéressées aux effets sanitaires des particules émises lors des feux d'artifices, soulignant la surmortalité ou l'incidence de maladies cardio-respiratoires (Beig et al., 2013; Gouder & Montefort, 2014; Hirai et al., 2000; Yao et al., 2019b). Dans l'article de (Beig et al., 2013), les auteurs ont ainsi calculé des ratios de nombre de cas excédentaires de mortalités totale, cardiovasculaire et respiratoire lors d'épisodes de feux d'artifice par rapport à des épisodes sans. Ils ont ainsi mis en évidence des ratios entre 1,75 et 3,5 pour la mortalité totale associée aux PM_{2.5} et entre 3 et 8 pour celle associée aux PM₁₀ (Beig et al., 2013). De même, pendant les feux d'artifices des fêtes du Printemps à Shanghai et sur une période

de 2013 à 2017, la mortalité quotidienne spécifiquement liée aux explosions de PM_{2,5} émis pendant les feux d'artifices a représenté 1,4 % à 3,8 % de la mortalité quotidienne totale (Yao et al., 2019). En Inde, des atteintes respiratoires ont été signalées pendant la fête de Diwali avec des augmentations entre 30% à 40% des cas de respiration sifflante, d'exacerbation de l'asthme et de cas de bronchites (Gouder & Montefort, 2014). Hirai et al., 2000 ont également constaté que l'inhalation de la fumée des feux d'artifice provoque de la toux, de la fièvre et de la dyspnée et conduit à certains cas de pneumonie aiguë. Comme décrit précédemment, la durée des festivals va fortement conditionner la persistance des particules de feux d'artifices dans l'atmosphère. Ainsi, il semblerait qu'une exposition occasionnelle d'une journée ne présente pas de risques aussi néfaste pour la santé humaine qu'une exposition prolongée (Gouder & Montefort, 2014).

Au niveau de la toxicité *in vitro*, des effets cytotoxiques sont observés avec une baisse de 30% de la viabilité après exposition de cultures de cellules épithéliales bronchiques type BEAS-2B pendant 24h à des particules collectées pendant des feux d'artifices (Do et al., 2012). Des augmentations significatives de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) par des BEAS-2B et des cellules endothéliales micro-vasculaires pulmonaires ont été observées et ont été corrélées à l'inflammation chez la souris après exposition à des particules de feux d'artifices (Hickey et al., 2020). Une exposition à l'interface-air-liquide (IAL) en temps réel, pendant des feux d'artifices, sur une période de 12h, sur des macrophages différenciés a montré l'induction d'une réponse inflammatoire par l'augmentation de la sécrétion de TNF- α et d'IL-6 (Ding et al., 2019).

2.2 Toxicité des armes de tirs

De nombreuses études ont montré que des tireurs en intérieur et en extérieur, exposés au Pb contenu dans les munitions avaient des concentrations élevées de Pb dans le sang (Chau et al., 1995; Gulson et al., 2002; Ochsmann et al., 2009; Rocha et al., 2014; B.-G. Svensson et al., 1992). De même, ils ont développé des symptômes d'exposition au Pb tels qu'une anémie, une fatigue, ou divers degrés de neuropathie (problèmes de mémoires, lésion de nerfs) (Chau et al., 1995; Rocha et al., 2014). De plus, en raison des effets néfastes du Pb sur l'environnement (Bellinger et al., 2013; Heier et al., 2009), des munitions sans Pb ont été développées depuis une vingtaine d'années. Étonnamment, plusieurs études rapportent la survenue de divers symptômes ressemblant à la grippe tels

que de la fièvre, des frissons, des nausées, des maux de tête, de la fatigue, des douleurs musculaires et articulaires, de la toux ou encore un essoufflement lors de tirs de munition sans Pb (Methner et al., 2013; Moran & Ott, 2008; Voie et al., 2014). Ces symptômes sont caractéristiques d'une « fièvre des métaux », tel que c'est le cas pour l'inhalation aiguë de fumées d'oxydes de Cu pouvant provoquer un syndrome pseudo-grippal ainsi que des troubles digestifs, et hépatiques (INERIS, 2016). Ainsi, une étude de toxicité chez l'homme a été menée pour comparer la toxicité de munitions avec Pb, sans Pb et avec une formulation contenant du Pb mais modifiée (Voie et al., 2014). Il en ressort que les sujets exposés aux munitions sans Pb présentaient plus de symptômes grippaux que les autres. Dans les munitions sans Pb, les concentrations de Cu ($6,4 \text{ mg/m}^3$) sont 32 fois supérieures à la limite d'exposition hebdomadaire américaine ($0,2 \text{ mg/m}^3$) alors que les munitions avec Pb en contiennent $3,7 \text{ mg/m}^3$. De plus, les concentrations en Zn sont triplées dans les munitions sans Pb ($1,6 \text{ mg/m}^3$) comparées à celles avec Pb ($0,5 \text{ mg/m}^3$). Ces fortes concentrations en Cu et en Zn seraient probablement à l'origine de ces symptômes plus prononcés chez les patients exposés aux munitions sans Pb probablement causés par une inflammation des poumons.

Quelques études *in vitro* se sont intéressées à la toxicité des aérosols des armes de tirs. Dans l'étude de Bergström et al., 2015 après 24h d'exposition de modèles cellulaires alvéolaire (A549) et bronchique (NHBE), les particules sans Pb ont montré une cytotoxicité plus élevée que les particules de munitions au Pb. Des facteurs de corrélation élevés ($>0,9$) ont été trouvés entre la mort cellulaire et les teneurs en Cu et en Zn. Enfin, les différents types de particules ont été capables d'induire un stress oxydant par surproduction d'ERO et le développement d'une réponse inflammatoire par sécrétion d'IL-6 et d'IL-8 dans les deux modèles cellulaires. De même, l'étude de Mariussen et al. 2021 a analysé les effets d'une exposition de cellules A549 réalisée à l'IAL à différents types de particules de tirs provenant de munitions avec et sans Pb. Alors que les munitions sans Pb émettent des quantités plus faibles de particules que les autres types de munition, une diminution de la viabilité cellulaire de 50% a été rapportée après exposition aux particules sans Pb contre 20% pour celles avec Pb. Il semblerait à nouveau que ces effets observés soit en lien avec les émissions de Cu et de Zn. Enfin, des résultats similaires sont observés à partir de cellules A549 exposées pendant 24h et 48h à des particules de tirs de petit calibre (munitions avec Pb), notamment une diminution de 40%

de la viabilité cellulaire et une augmentation de la proportion de cellules en phase sub-G1 indiquant une apoptose (Mekki, 2017).

2.3 Toxicité des fumigènes

Il existe de nombreuses familles de fumigènes avec des compositions chimiques très variées mais il existe peu de documents les listant. De plus, leur toxicité a été très peu étudiée. A la fin des années 1990, trois rapports listant les familles de fumigènes utilisées par l'armée américaine et leurs effets toxiques sont publiés par le Conseil National de Recherche (NRC) des États-Unis (National Research Council (U.S.) (1997a, 1997b, 1999). L'objectif du NRC était d'établir des niveaux indicatifs d'exposition aux fumigènes pour les militaires lors des entraînements mais aussi pour les civils résidant ou travaillant à proximité d'installations militaires. Ces rapports regroupent des données de toxicité humaine et chez l'animal sur les aérosols produits par l'ensemble des fumigènes de camouflage et colorés. La toxicité exclusive de la fraction particulaire des fumigènes n'est pas rapportée.

Les familles de fumigènes utilisées au sein de l'armée française sont listées dans le rapport de l'Organisation du Traité de l'Atlantique Nord (2016), « Guidelines for Toxicity Testing of Smokes, Obscurants, and Pyrotechnic Mixtures » (North Atlantic Treaty Organization, 2016). Ainsi, les données présentées dans cette partie proviennent majoritairement des rapports décrits ci-dessus.

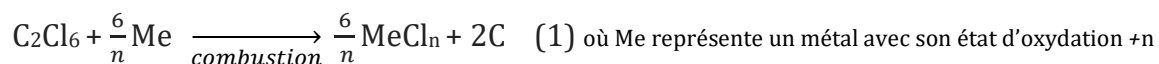
Enfin, concernant la toxicité *in vitro* des fumigènes, très peu d'études ont été menées afin d'étudier les mécanismes d'action des fumigènes sur la cible respiratoire. Cela sera décrit dans la **partie 2.3.4**.

2.3.1 Familles de fumigènes

Fumigène à base d'hexachloroéthane (HC)

Les fumigènes à base d'HC sont principalement utilisés comme obscurcissant grâce à la production d'une fumée épaisse qui a une excellente capacité de dissimulation. La fumée d'HC est produite par la combustion d'un mélange équimolaire de l'oxydant HC (C_2Cl_6) et d'un combustible métallique (Zn, ZnO, Al, Si ou TiO_2). Lorsqu'il est enflammé, une réaction

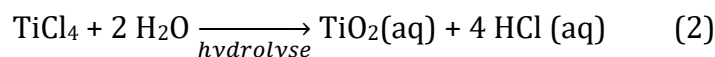
exothermique a lieu entre l'oxydant et le combustible et un chlorure métallique (MeCl) est produit, selon la réaction suivante :



Les MeCl étant hygroscopiques, l'épaisseur de la fumée produite et sa capacité de dissimulation vont dépendre de l'humidité relative de l'air. Généralement, le Zn est utilisé comme combustible métallique et la réaction avec l'HC va produire du chlorure de zinc (ZnCl_2) dont la fumée est blanche grisâtre. Dans un second temps, la fumée ZnCl_2 va réagir avec l'humidité de l'air et produire du chlorure de zinc hydroxyle (Zn(OH)Cl) et de l'acide chlorhydrique (HCl). Certains fumigènes HC/Zn contiennent également du 2,4,6-trinitrotoluène (TNT) qui est utilisé comme additif, permettant de garder une stabilité de la composition du fumigène vis-à-vis de l'humidité et de faciliter l'allumage par des temps froids et humides. Enfin, d'autres éléments tels que du silicium, du nitrate de potassium (KNO_3), du charbon, de l'oxyde de fer, de l'aluminium granulaire, du nitrate de cellulose et de l'acétone peuvent être nécessaires pour déclencher la réaction et ainsi disperser de très petites quantités d'autres contaminants en suspension dans l'air.

Fumigènes à base de tétrachlorure de titane (TiCl_4)

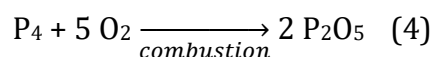
Le TiCl_4 est un liquide sensible à l'humidité et à l'eau. Il s'hydrolyse instantanément au contact de l'humidité et conduit à la formation d'oxychlorures de titane ($\text{Ti(OH)}_n\text{Cl}_x$ ou de dioxyde de titane (TiO_2) qui génèrent une fumée blanche. Les réactions chimiques correspondantes sont les suivantes :



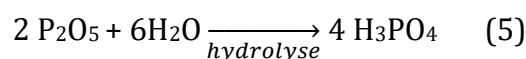
Fumigène à base de phosphore blanc (WP)

Le WP est un produit chimique inorganique qui a une légère couleur jaune causée par des impuretés de couleur rouge et est souvent appelé phosphore jaune. Longtemps utilisé pour sa très forte capacité incendiaire et ses vapeurs corrosives, l'Organisation des Nations Unies (ONU) a interdit en 1983 l'utilisation offensive du WP. Depuis, l'armée l'utilise comme fumigène pour protéger des forces alliées, soutenir des opérations de « déception » (dissimulation et simulation) et former un écran de fumée pour les activités

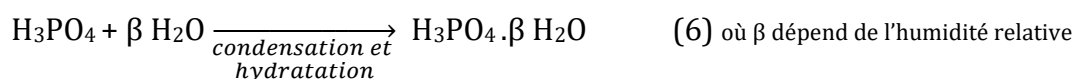
de reconnaissance, de surveillance et cibler des forces ennemies. Les fumigènes à base de WP sont utilisés dans le monde entier car leurs fumées sont les plus efficaces contre les systèmes d'imagerie thermique. Le WP possède un point de fusion bas (44°C). La combustion du WP va générer comme produit final de l'acide phosphorique (H₃PO₄). Tout d'abord, le WP va se consumer dans l'air et former du pentoxyde de phosphore (P₂O₅), selon la réaction suivante :



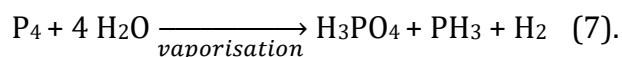
Le P₂O₅ étant extrêmement chaud, il absorbe la moindre trace d'humidité pour former des gouttelettes d'H₃PO₄ :



Ces gouttelettes d'H₃PO₄ peuvent se condenser et se réhydrater pour former à nouveau de l'H₃PO₄ :



Le WP peut réagir également avec de l'eau pour former un composé gazeux, la phosphine (PH₃), qui est toxique pour le système nerveux central et le foie :



Dans l'air, le PH₃ est ensuite converti en produits chimiques moins nocifs :

Fumigène à base de phosphore rouge (RP)

Le RP est une substance amorphe, solide à 416°C, obtenue par chauffage du WP à 250 °C. Certains pays ont remplacé le WP par le RP car il est thermodynamiquement stable aux conditions normales de température et de pression, le rendant beaucoup moins inflammable (T°_{combustion} = 280 °C) et moins toxique. Comme le WP, il est utilisé pour former un écran de fumée bloquant les ondes infra-rouges. La combustion de RP provoque une vaste fumée blanche, retombant au sol sous forme de gouttelettes brûlantes, enflammant facilement la matière organique et pouvant provoquer des incendies de forêt. Son utilisation est donc limitée à certaines conditions saisonnières et météorologiques.

Comme le WP, le RP va réagir premièrement avec l'air pour former du P_2O_5 selon la réaction (4) présentée ci-dessus. Généralement, les grenades de RP sont constituées d'un mélange à 95% de RP et de 5% de caoutchouc butyle, qui, une fois brûlé, produit des aérosols d' H_3PO_4 .

Comme le WP, le RP va réagir premièrement avec l'air pour former du P_2O_5 selon la réaction (4) présentée ci-dessus. Puis, dans un second temps, en réaction à l'humidité de l'air il est produit des aérosols d' H_3PO_4 . Généralement, les grenades de RP sont constituées d'un mélange à 95% de RP et de 5% de caoutchouc butyle, qui, une fois brûlé, produit des aérosols d' H_3PO_4 . Pour améliorer sa fonction, des produits chimiques supplémentaires tels que des métaux ou des oxydes métalliques peuvent être ajoutés.

Fumigènes à base de potassium et magnésium (KM), d'acide cinnamique (CA) et à d'acide téréphtalique (TPA)

Les fumigènes à base de KM sont composés principalement de Mg, KNO_3 , de perchlorate de potassium ($KClO_4$) et d'azodicarbonamide.

La combustion de fumigènes à base de CA et de TPA entraîne la vaporisation de ces composés qui vont se condenser sous le refroidissement et former de fines particules capables de masquer les bandes spectrales du visible et de l'infra-rouge. Le fumigène à base de TPA est initialement considéré comme un fumigène de signalisation de couleur blanche en raison de sa fumée blanche mais est également utilisé comme fumigène de camouflage. Ces trois types de fumigènes ont une capacité de camouflage moins importante que ceux à base de HC, WP et RP mais restent très utilisés pendant les entraînements.

Fumigènes à base de dioxyde de titane (TiO_2)

Les fumigènes à bases de TiO_2 sont principalement des grenades utilisées comme fumigène de camouflage. Les particules fines à ultrafines émises permettent de bloquer la détection des ondes lumineuses dans la partie visible du spectre électromagnétique.

Fumigènes à base d'anthracène

Les fumigènes à base d'anthracène sont utilisés par les forces navales sur des dispositifs flottants pour masquer des navires. Ils sont composés principalement de $KClO_3$, d'anthracène et de chlorure d'ammonium. Lors de la combustion, une fumée blanche

jaunâtre très dense est produite avec une haute capacité de camouflage. Dans des conditions météorologiques, ce type de fumigène « flottant » peut générer un écran de fumée dépassant plusieurs centaines de mètres.

Fumigènes colorés

Les fumigènes colorés, disponibles dans une variété de couleurs différentes, sont utilisés à des fins de signalisation pour communiquer et marquer des positions. Ils sont composés d'un oxydant, d'un carburant, d'un colorant organique et de quelques additifs qui permettent de faciliter la combustion et d'améliorer la transformation des composés du fumigène. Le KClO_3 est fréquemment utilisé comme oxydant et le lactose comme combustible. Les colorants appartiennent généralement à la famille des anthraquinones ou des benzathrones. Les dénominations des colorants et les noms de leur molécule chimique sont présentés dans la **Figure 9**. Au cours de la combustion, le colorant est vaporisé puis, après expulsion de la cartouche, les molécules de colorant vont se refroidir et se condenser pour former un aérosol contenant des particules qui donnent à la fumée sa couleur caractéristique. Initialement, les formulations de ces fumigènes ont été développées strictement dans le but de produire la couleur désirée, pendant une durée spécifique.

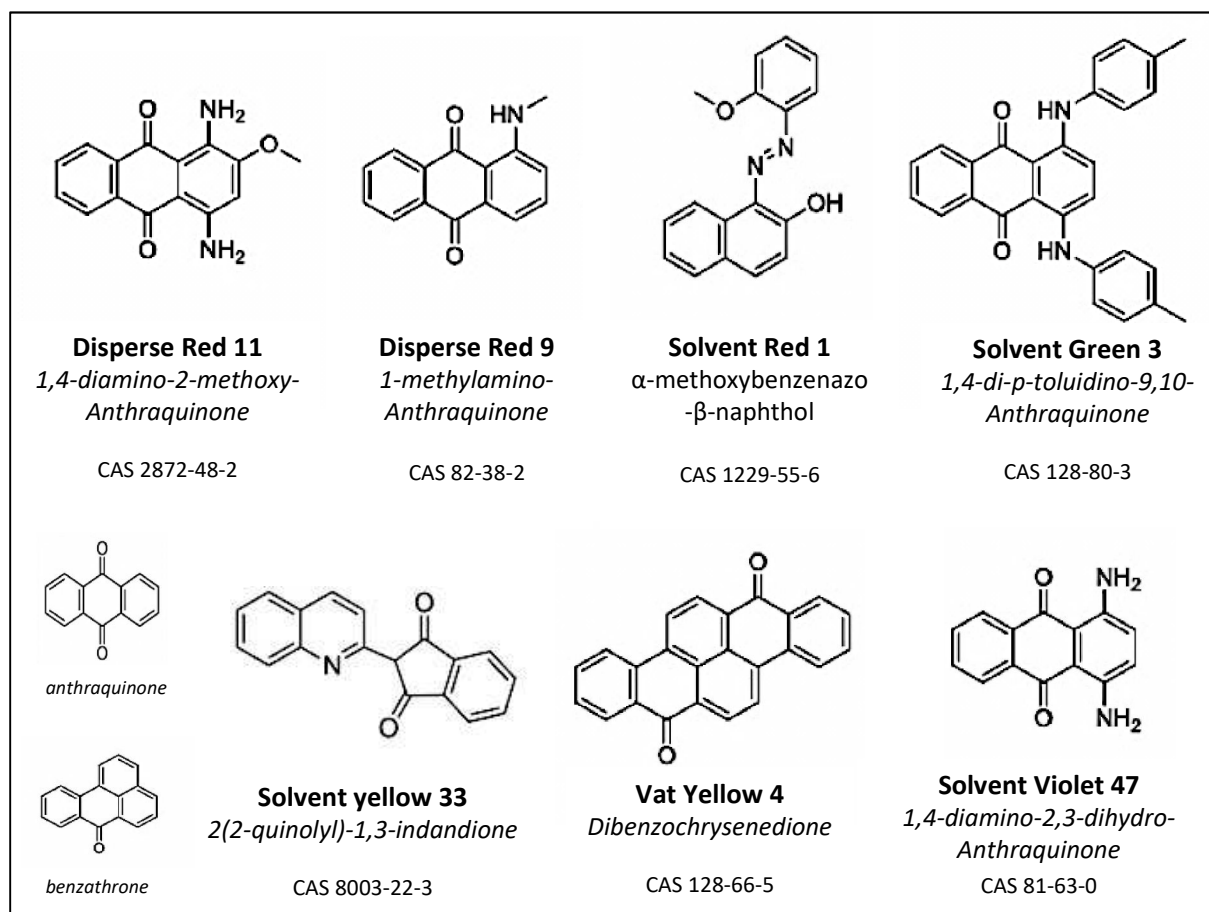


Figure 9. Liste des principaux colorants entrant dans la composition des fumigènes de signalisation utilisés par l'armée américaine. Adapté de (Glück et al., 2017; National Research Council (U.S.), 1999).

Des modifications ont été apportées aux formulations de cette famille de fumigènes pour remplacer certains colorants trop toxiques et améliorer la sécurité des soldats ainsi que celle du public vivant ou travaillant à proximité d'installations d'entraînement militaire. La couleur du fumigène obtenue après combustion correspond à un mélange de colorants dans différentes proportions (Tableau 4). Dans la composition des anciennes formulations, on retrouve également du soufre, du chlorate de potassium et du bicarbonate de sodium et dans les nouvelles formulations, le sucre est utilisé comme combustible à la place du soufre et le carbonate de magnésium remplace le bicarbonate de sodium.

Tableau 4. Anciennes et nouvelles formulations des colorants des fumigènes colorés de signalisation utilisés au sein de l'armée américaine. Adapté de (National Research Council (U.S.), 1999).

Couleur du fumigène	Composition en colorants (% total)	Composition en colorants (% total)
	Anciennes formulations	Nouvelles formulations
Jaune	Benzanthrone (54%), Vat Yellow 4 (38%)	Solvent Yellow 33 (42%)
Vert	Benzanthrone (24%), Solvent Green 3 (62%) et Vat Yellow 4	Solvent Green 3 (29,4%) et Solvent Yellow 33 (12,6%)
Rouge	Disperse Red 9 (40%), Anthraquinone (2-3%)	Solvent Red 1 (34,2%) et Disperse Red 11 (6,8%)
Violet	Solvent violet 47 (80%) et Disperse red 9 (20%)	

2.3.2 Effets sur la santé humaine

L'utilisation des fumigènes peut provoquer un certain nombre d'accidents, notamment ceux à base d'HC/Zn générant un aérosol contenant du $ZnCl_2$. Cette famille de fumigènes est celle dont la toxicité est la plus étudiée et la mieux connue. Les lésions pulmonaires après exposition sont principalement attribuées à l'inhalation de vapeurs de $ZnCl_2$, pouvant rapidement provoquer une atteinte des muqueuses respiratoires. La revue de El Idrissi et al., 2017 fait état de l'existence de près de 30 rapports concernant 376 patients exposés au fumigène HC/Zn, la plupart lors d'entraînements militaires. Il en ressort qu'une exposition à la fumée de $ZnCl_2$ chez les soldats provoque immédiatement des nausées, des vomissements et une irritation des voies respiratoires (dyspnée, toux, maux de gorge et larmolement) pouvant durer plusieurs heures jusqu'au lendemain. Les soldats les plus fortement exposés développent d'autres symptômes dans les jours suivants tels qu'une dyspnée, de la toux, de la fièvre et des malaises. La fièvre et les difficultés respiratoires peuvent mettre plusieurs semaines à disparaître mais dans la plupart des cas les patients guérissent totalement (El Idrissi et al., 2017). Une étude rétrospective a été réalisée sur des soldats taiwanais qui ont été exposés accidentellement à des fumées de $ZnCl_2$ pendant un entraînement (Hsu et al., 2005). Ils ont été exposés pendant 5 à 10 min à des fumées denses, sans masque de protection et dans un espace confiné de type tunnel. Sur les 20 sujets, tous ont souffert de nausées, de maux de gorge, de vertiges, de toux, d'essoufflements et d'oppression thoracique, cinq soldats ont développé un syndrome de détresse respiratoire aiguë et la majorité d'entre eux a présenté une lésion parenchymateuse du poumon (Hsu et al., 2005). Enfin, 70% des

patients ont eu des altérations transitoires de la fonction hépatique (Huang et al., 2008; Loh et al., 2008), effet préalablement observé (Loh et al., 2006) et probablement causé par des niveaux de Zn sériques élevés (Xie & Xie, 2018). Les traitements les plus fréquemment appliqués sont la mise sous ventilation, la prise d'antibiotiques et de corticostéroïdes pour limiter l'inflammation du poumon (El Idrissi et al., 2017). Dans certains cas, dans des espaces confinés, une exposition à la fumée de ZnCl_2 peut entraîner la mort (Evans, 1945; Gil et al., 2008; Holmes, 1999; Macaulay & Mant, 1964; Pettilä et al., 2000).

Pour les fumigènes à base de WP, les seules données de toxicité rapportées proviennent d'études très anciennes répertoriées dans le volume 2 du rapport du (National Research Council (U.S.), 1997a). L'inhalation de fumées de WP peut entraîner une irritation du nez et de la gorge, de la toux, une détresse respiratoire, des maux de tête et dans les cas les plus graves, une oppression thoracique, des œdèmes pulmonaires, une hypertrophie du foie, une leucocytose ainsi que des difficultés à parler.

Concernant la toxicité de fumigènes à base de TiO_2 , une étude de cohorte de grande ampleur a été menée sur 1576 travailleurs exposés à des fumées de TiO_2 pendant au moins 1 an dans des sites de production entre 1935 et 1984 (National Research Council (U.S.), 1997a). L'incidence de maladies respiratoires cancéreuses et non cancéreuses a été analysée mais aucune association significative n'a été relevée.

Pour les autres familles de fumigènes, aucune étude sur des effets chez l'homme ne semble connue.

2.3.3 Toxicité *in vivo*

Les fumigènes à base d'HC utilisent généralement le Zn (HC/Zn) ou le TiO_2 (HC/ TiO_2) comme combustible métallique générant respectivement du ZnCl_2 ou du TiCl_4 . Il est rapporté que la toxicité aiguë par inhalation de fumée d'HC/ TiO_2 est bien inférieure à celle de la fumée de HC/Zn. En effet, les fumées d'HC/ TiO_2 causent uniquement des irritations et des inflammations pulmonaires alors que la fumée d'HC/Zn provoque des lésions pulmonaires étendues avec des œdèmes pulmonaires entraînant la mort (National Research Council (U.S.), 1997b). Ces effets très toxiques des fumigènes HC/Zn sont retrouvés chez le rat après des expositions aiguës d'1h par instillation, notamment une

détresse respiratoire, un œdème des poumons, une alvéolite destructrice et une infiltration de macrophages, suivis du développement d'une fibrose et enfin une mortalité plus élevée que chez les animaux contrôles (National Research Council (U.S.), 1997b).

Des expositions répétées par inhalation (1h/jour, 5j/semaine pendant 20 semaines) à 0,1 ; 1,3 ; 12,8 ou 122 mg/m³ de HC/Zn chez des souris, rats et cochons d'Inde ont été étudiées. La plus forte concentration (122 mg/m³) a causé une mortalité excessive chez les cobayes et les souris. Des changements inflammatoires, tels que des œdèmes, de l'emphysème et l'infiltration de macrophages dans les poumons des rats et des cobayes, se sont également produits à cette concentration d'exposition. Les groupes d'animaux exposés aux concentrations moyennes et faibles ont présenté des taux de survie normaux et aucun effet pulmonaire indésirable n'a été mis en évidence. Le niveau sans effet nocif observé (NOAEL) a été déterminé à 12,8 mg de Zn/m³, ou 26,6 mg de ZnCl₂/m³, en supposant que tout le Zn dans la fumée soit sous la forme de ZnCl₂.

Les fumigènes à base de WP entraînent des atteintes pulmonaires chez l'Homme mais aussi chez l'animal (National Research Council (U.S.), 1997a). Des signes d'irritation des voies respiratoires (congestion légère à intense, œdème et hémorragie) ont été observés dans les poumons de souris, de rats et de chèvres après une exposition par inhalation à la fumée de WP contenant de l'acide phosphorique (H₃PO₄). Une exposition aiguë d'1h a produit, chez les animaux exposés, des signes clairs d'irritation à l'H₃PO₄ à des concentrations de 152, 525 et 745 mg/m³, respectivement. Un gonflement du foie et des atteintes rénales sont observés chez différentes espèces animales après 1h d'exposition à des concentrations d'H₃PO₄ supérieures à 650 mg/m³.

Des expositions à plus long terme et répétées (15 min/jour, 5 jours/semaine pendant 6 ou 13 semaines), à 884 mg/m³ d'H₃PO₄, peuvent entraîner une dyspnée, des laryngites et trachéites légères à sévères chez le rat (Brown et al. 1981).

Une étude a été menée sur des souris concernant les toxicités aiguë (30 min, 25 à 450 mg/m³ d'H₃PO₄) et répétée (30 min/jours pendant 5 jours, 65 à 90 mg/m³ et 25 à 110 mg/m³ d'H₃PO₄) de deux fumigènes à base de RP (Hemmilä et al., 2010). Les résultats de cette étude montrent des atteintes pulmonaires dose-dépendantes mises en évidence par une diminution de la fréquence respiratoire et une augmentation du temps de pause après

inspiration. La concentration qui a causé 50% de diminution de la fréquence respiratoire a été calculée à 1140 mg/m³ mais sans aucune irritation pulmonaire.

Des expositions répétées (8 min/jour, 5 jours/semaine pendant 12 semaines) à des concentrations d'H₃PO₄ de 22 mg/m³ ou 165 mg/m³ en moyenne journalière ont été réalisées sur des rats, des souris, des cobayes et des lapins (National Research Council (U.S.), 1997b). Aucun effet attribuable à la fumée de ce fumigène n'a été démontré chez aucune des espèces. Il en est conclu que la concentration de 165 mg/m³ représente la dose sans effet nocif observable (NOAEL) pour toutes les souches et espèces animales testées. Cependant d'autres études d'expositions répétées (2,25 h/jour pendant 4 jours/semaine pendant 4 semaines) à des concentrations de 400 à 1200 mg/m³ d'H₃PO₄ chez des rats ont montré des difficultés respiratoires, une fibrose bronchiolaire terminale et une perte de poids liée à une perte d'appétit.

Une inhalation aiguë de 30 min, à une dose de 1240 mg/m³ de particules fines de TiO₂, émises par un fumigène à base de TiO₂, n'a entraîné aucun effet notable chez le rat (National Research Council (U.S.), 1997a). De nombreuses études d'expositions répétées à des particules de TiO₂ manufacturées montrent des résultats variés en fonction des conditions expérimentales choisies. Soit aucun effet significatif n'est mis en évidence, soit il est observé une inflammation, une fibrose ou encore une hyperplasie épithéliale pulmonaire (National Research Council (U.S.), 1997a).

Pour les fumigènes colorés, aucune étude *in vivo* n'a été menée pour déterminer la toxicité des anciennes formulations des fumigènes jaune et vert ou de leurs produits de combustion. Cependant, certaines études se sont intéressées à la toxicité de leurs colorants (National Research Council (U.S.), 1999). Par exemple, 1h d'exposition par inhalation au benzanthrone (0,9 à 14,4 g/m³), composé des fumigènes jaune et vert, ou au 1,4-di-p-toluidino-9,10-anthraquinone nommé « Solvent Green 3 » (0,6 à 12,1 g/m³) a provoqué des lésions caractérisées par une nécrose pulmonaire, une desquamation de la muqueuse, un œdème dans l'espace alvéolaire et une nécrose dans l'arbre trachéo-bronchique chez des rats, des souris et des cobayes. Dans une autre étude, les animaux ont été exposés à un fumigène composé de 2(2-quinolyl)-1,3-indandione (Solvent Yellow 33), de 1-méthylamino-anthraquinone (Dispersed Red 9) et de 1,4-di-p-toluidino-9,10-anthraquinone (Solvent Green 3) à des concentrations de 0,1 à 1,0 g/m³ pendant 1h/ jour,

5 jours par semaine pendant 100 jours. Les résultats mettent en évidence une congestion pulmonaire, une alvéolite, une pneumonie chronique et une inflammation pulmonaire (National Research Council (U.S.), 1999). La toxicité du colorant rouge, le 1-méthylamino-anthraquinone (Disperse Red 9) présent dans les anciennes formulations de fumigène de signalisation, a été évaluée sur plusieurs espèces animales (rats, lapins, cobayes, chiens, porcs et chèvres), à des concentrations de 1,5 à 18 g/m³, pendant 10 à 240 min. Tous les animaux ont montré des signes d'irritation des voies respiratoires supérieures, une salivation (National Research Council (U.S.), 1999). La toxicité du colorant violet présent dans les anciennes formulations a été évaluée dans une étude utilisant des rats, des lapins, des cobayes, des chiens, des porcs et des chèvres. Les animaux ont été exposés à des concentrations de 1,3 à 7,8 g/m³ pendant 8 à 142 min. Tous les animaux ont montré une irritation des voies respiratoires supérieures et une salivation (National Research Council (U.S.), 1999).

Concernant la nouvelle formulation de fumigène jaune, composée principalement de 2(2-quinolyl)-1,3-indandione (Solvent Yellow 33), une étude a évalué la toxicité d'un fumigène constitué d'un mélange de « Solvant Yellow 33 », de « Solvent Green 3 » et du « Dispersed Red 9 ». Dans cette étude, l'examen histologique de rats, de souris et de cobayes exposés aux fumées à des concentrations de 0,1 à 1,0 g/m³ pendant 1h/jour, 5 jours par semaine pendant 100 jours a révélé une congestion pulmonaire, une alvéolite, une pneumonie chronique et une inflammation pulmonaire (National Research Council (U.S.), 1999). Plus récemment, en 2015, le centre de Santé Publique de l'armée aux États-Unis a publié un rapport sur la toxicité aiguë et subaiguë chez le rat d'une exposition par inhalation à une nouvelle formulation de fumigène rouge, à base de 1-isopropylamino-anthraquinone ou « Solvent Red 169 » (Crouse et al., 2017). Les expositions aiguës ont duré 30 min et les observations ont été réalisées après 14 semaines de repos. Pour les expositions subaiguës, les rats ont été exposés 30 min/jour, 5 jours/semaine pendant 3 semaines. En terme de mortalité, la LC50 en exposition aiguë est supérieure à 1,92 mg/L. Pour les expositions répétées, les concentrations testées (0,1 ; 0,5 et 1,5 mg/L) n'ont induit aucune mortalité. Ces expositions ont causé une coloration rouge de la fourrure de l'animal ainsi qu'une hypersalivation de manière dose-dépendante. Des changements de masse corporelle sont également observés à 1,5 mg/L avec une diminution au début des expositions, puis une augmentation plus tardive pendant la deuxième semaine de repos. Les principaux résultats de ce rapport sont que les expositions répétées ont causé une

hyperplasie de l'épithélium nasal, parfois accompagnée de dégénérescence des muqueuses des cornets nasaux. Après 4 semaines de repos, ces lésions nasales avaient disparu. Les seules données sur la toxicité de la nouvelle formulation de fumée verte proviennent d'une étude par inhalation sur un mélange de « Solvent Yellow 33 » et de « Solvent Green 3 ». Le mélange était peu toxique mais une légère inflammation pulmonaire a été observée et a été attribuée au « Solvent Green 3 ». Des données sont disponibles sur la toxicité d'un mélange contenant du α -methoxybenzenazo- β -naphthol (Solvent Red 1) et du 1,4-diamino-2-methoxy-anthraquinone (Dispersed Red 11). L'exposition par inhalation de rats et de lapins à ce mélange a entraîné des lésions nasales et pulmonaires.

Toutes les familles de fumigènes dont la toxicité a été étudiée chez l'animal ont entraîné à divers degrés des troubles respiratoires souvent accompagnés d'une inflammation des poumons pour des concentrations allant de dizaines ou centaines de mg/m³ à des g/m³. Même si les concentrations utilisées dans ces études *in vivo* paraissent élevées, les effets retrouvés sont assez proches de ce qui est décrit après une exposition chez l'homme (**partie 2.3.2**).

2.3.4 Toxicité *in vitro*

Une équipe finlandaise s'est intéressée à la toxicité *in vitro* de différentes familles de fumigène et a publié plusieurs études sur le sujet (Hemmilä, Hihkiö, Kasanen, et al., 2007a; Hemmilä, Hihkiö, & Linnainmaa, 2007; Hemmilä et al., 2010, 2013). Dans ces études, le fumigène à base d'HC/Zn/TNT est utilisé comme celui de référence, considéré comme très fortement toxique.

Une étude s'est intéressée à la différence de toxicité entre deux types de fumigène à base d'HC (HC/Zn et HC/Zn/TNT) (Hemmilä, Hihkiö, Kasanen, et al., 2007a). Des cellules épithéliales bronchiques BEAS-2B ont été exposées pendant 5 min à différentes quantités de fumigène brûlé (0,25 - 1 g ce qui correspond à 1 - 3,5 g/m³). Les effets génotoxiques sont mesurés immédiatement après exposition alors que les effets cytotoxiques sont mesurés 48h plus tard. Pour 0,5 et 1 g de fumigène brûlé, le fumigène HC/Zn/TNT a des

effets cytotoxiques plus prononcés (diminution de 75% à 100% de la viabilité cellulaire) que le fumigène HC/Zn (diminution de 50% à 75% de la viabilité cellulaire). De même pour la génotoxicité, pour 0,5 et 1g de fumigène brûlé, les effets sont plus marqués pour le fumigène HC/Zn/TNT que celui à base de HC/Zn. En conclusion de cette étude, les deux types de fumigènes sont cytotoxiques et génotoxiques avec des effets plus prononcés pour HC/Zn/TNT. Cependant, les auteurs soulignent que lors de la combustion, il est mesuré un dégagement de monoxyde de carbone qui pourrait contribuer à ces effets toxiques.

Dans une autre étude, des cellules bronchiques (BEAS-2B) ont été exposées pendant 5 min à l'aérosol émis par deux fumigènes à base de rouge de phosphore (RP) ayant des contenus en RP différents, P60 (60% de RP) et RPB (70 % de RP) et à un fumigène à base d'HC/Zn/TNT qui a servi de référence (Hemmilä et al., 2010). La viabilité cellulaire a été mesurée 48h après l'exposition et les effets génotoxiques 2h après. Seul le fumigène RPB (1,3 ; 2,6 et 5,1 g/m³ d'H₃PO₄) a entraîné une cytotoxicité modérée avec une diminution de la viabilité cellulaire entre 30% et 40% aux plus fortes concentrations mais sans relation dose-dépendante. Aucun des deux fumigènes de RP n'a induit d'effet génotoxique. Au contraire, le fumigène de référence d'HC/Zn/TNT (0,9–3,5 g/m³ de ZnCl₂) a induit une très forte cytotoxicité avec une diminution entre 40% et 100% de la viabilité cellulaire et a montré un effet génotoxique significativement positif.

Pour les fumigènes colorés, les colorants appartiennent généralement à la famille des anthraquinones. Leur toxicité est influencée par les substituants et leur position sur le squelette moléculaire tricyclique, en particulier la position des groupes hydroxyles sur la molécule (Bondy et al., 1994). La toxicité aiguë et la génotoxicité de plusieurs fumigènes colorés, orange, vert, rouge, bleu, violet et jaune ont été étudiées et comparées à celles d'un fumigène de référence à base d'HC/Zn/TNT (Hemmilä et al., 2007, 2013). Dans ces deux études, les formulations des fumigènes pour une même couleur ne sont pas toujours identiques. 48h après une exposition de 5 min (0,25 ; 0,5 ; 1 et 2 g), tous les fumigènes colorés ont montré des effets cytotoxiques plus importants que celui à base d'HC/Zn/TNT à l'exception des fumigènes jaune et vert : orange > violet ≈ rouge > HC/Zn/TNT > jaune (Hemmilä, Hihkiö, & Linnainmaa, 2007) ; orange > violet > bleu > rouge > jaune > HC > vert (Hemmilä et al., 2013). Les effets génotoxiques ont été mesurés 2h après exposition. Dans l'étude de (Hemmilä, Hihkiö, & Linnainmaa, 2007), les résultats révèlent que seul le

fumigène orange a induit des effets génotoxiques significatifs dans tous les tests, le fumigène rouge est génotoxique dans un seul des tests et il est observé une tendance positive pour les fumigènes jaune, violet et HC/Zn/TNT. Dans la deuxième étude (Hemmilä et al., 2013), les effets génotoxiques sont différents : violet $\approx$ HC $\approx$ orange > bleu $\approx$ jaune $\approx$ vert $\approx$ rouge.

Une autre étude s'est intéressée à la toxicité de fumigènes colorés rouge et vert, de trois fabricants différents, sur le modèle cellulaire alvéolaire A549 (van Hulst et al. 2017). Les cellules ont été exposées aux fumigènes sous forme d'aérosols pendant 30 min (combustion d'une grenade par type de fumigène) puis les effets biologiques ont été étudiés 24h après l'exposition. Les fumigènes rouge III et vert III, produits par le même fabricant, sont positifs aux tests de cytotoxicité, soit une cytotoxicité supérieure à 10% comparée aux cellules non exposées alors que les fumigènes des autres fabricants présentent des résultats négatifs. Le fumigène rouge III a entraîné également des effets mutagènes. Enfin, les mécanismes de toxicité d'un fumigène rouge sur le modèle A549 a été étudié dans les travaux de thèse de Mekki, 2017. Contrairement aux études précédentes, il s'agit d'une exposition non pas à l'aérosol total mais à la fraction particulaire du fumigène (0,1 et 0,25 mg/ml). Les résultats de ces travaux mettent en avant une cytotoxicité importante après 24h et 48h d'exposition, inférieure à 60%, confirmée par une augmentation de la proportion de cellules en phase sub-G1, suggérant un mécanisme d'apoptose. L'étude de l'expression des gènes antioxydants et de l'inflammation a été réalisée après 6h et 24h d'exposition. Des réponses marquées sont observées aux deux temps, avec des augmentations d'expression des gènes *hème Oxygénase-1 (HO-1)*, *NAD(P)H quinone oxyréductase-1 (NQO-1)*, *superoxyde dismutase à Mn (MnSOD)* ainsi que des interleukine-6 (*IL-6*) et - 8 (*IL-8*). Enfin, des extraits organiques issus de ce fumigène rouge ont induit des effets mutagènes sur deux souches de bactéries après activation métabolique (test d'Ames). L'ensemble de ces travaux est résumé dans le **Tableau 5** ci-dessous.

Tableau 5. Synthèse des études *in vitro* sur la toxicité des fumigènes

Type de fumigène	Composition	Modèle cellulaire	Conditions d'exposition	Marqueurs évalués et principaux résultats	Référence
HC	HC/Zn (45%/55%) HC/Zn/TNT (43%/52%/5%)	BEAS-2B	Chambre d'exposition (150L) - 5 min	<u>Cytotoxicité</u> 48h après exposition : +++ HC/Zn/TNT > ++ HC/Zn <u>Génotoxicité</u> : +++ HC/Zn/TNT > ++ HC/Zn	(Hemmilä, Hihkiö, Kasanen, et al., 2007b)
RP, HC	P60 (60% de RP) ; RPB (70% de RP) HC/Zn/TNT (43%/52%/5%)	BEAS-2B	Chambre d'exposition (150L) - 5 min	<u>Cytotoxicité</u> 48h après exposition : +++ HC/Zn/TNT > + RPB <u>Génotoxicité</u> : +++ HC/Zn/TNT Ø RPB ≈ P60	(Hemmilä et al., 2010)
Colorés	Grenades à mains de trois fabricants différents rouge et vert (I, II et III)	A549	Système IAL (Vitrocell) - 30 min	<u>Cytotoxicité</u> 24h après exposition : + Vert et Rouge III <u>Mutagénicité</u> : + Rouge III	(van Hulst et al., 2017)
Colorés, HC	Orange : 1,4-dihydroxy-anthraquinone Violet : 1-(p-tolylamino)-4-hydroxy-anthraquinone Rouge : 1-méthylamino-anthraquinone Jaune : 4,4'-méthylidène-bis-3-méthyl-1-phényl-2-pyrazoline-5-one HC/Zn/TNT (43%/52%/5%)	BEAS-2B	Chambre d'exposition (150L) Grand container (56 m3) situé sur le terrain d'essai	<u>Cytotoxicité</u> 48h après exposition : orange > violet ≈ rouge > HC/Zn/TNT > jaune <u>Génotoxicité</u> : ++ orange > + violet Ø jaune ≈ rouge <u>Cytotoxicité</u> 48h après exposition : orange > jaune ≈ violet > rouge <u>Génotoxicité</u> : ++ orange	(Hemmilä, Hihkiö, & Linnainmaa, 2007)
Colorés	Vert : Solvent Green 3A ; Solvent Yellow 33 Orange : Disperse Red 9 ; Smoke Orange 18 Bleu : Disperse Blue 180 Jaune : Solvent Yellow 33 ; Smoke Orange 18 Violet : Disperse Red 9 ; Disperse Blue 180 : HC : (non précisé)	BEAS-2B	Chambre d'exposition (150L)	<u>Cytotoxicité</u> 48h après exposition Orange ≈ bleu ≈ jaune ≈ violet > HC > vert <u>Génotoxicité</u> : violet ≈ HC ≈ orange > bleu ≈ jaune ≈ vert ≈ rouge	(Hemmilä et al., 2013)
Colorés	Rouge : chlorate de potassium, lactose, colorant organique rouge.	A549	Exposition avec une suspension de particules 24h et 48h	<u>Cytotoxicité</u> : +++ 48h > ++ 24h <u>Apoptose</u> : augmentation population sub-G1 à 24h et 48h Réponse anti-oxydante (6h et 24h) : augmentation ARNm de HO-1, NQO-1 et MnSOD <u>Inflammation</u> : augmentation ARNm IL-6 et L-8 <u>Mutagénicité</u> : résultats positifs avec les souches TA98 et YG1041	(Mekki, 2017)

Ces études de toxicité *in vitro* mettent en évidence la difficulté de comparer les résultats entre eux. Tout d'abord, les formulations des fumigènes, si l'information est donnée, sont très complexes et peuvent diverger d'une étude à l'autre pour un même type de fumigène. Ensuite, les concentrations utilisées ne sont pas standardisées entre les études. Elles sont soit définies en quantité de fumigène brûlé (g), soit en masse volumique (g/m³), soit uniquement en nombre de grenades brûlées. De plus, les conditions d'expositions sont différentes : chambre d'exposition à échelle du laboratoire, système IAL du fabricant Vitrocell Systems, exposition en immergé, types cellulaires différents. L'ensemble des familles de fumigènes présentées ci-dessus (**Tableau 5**) ont induit une diminution plus ou moins importante de la viabilité cellulaire ainsi que de potentiels effets génotoxiques ou mutagènes. Cependant, ces paramètres ne sont pas suffisants pour caractériser la toxicité des fumigènes et pour comprendre les mécanismes de toxicité sur l'appareil respiratoire. Enfin, la plupart de ces études s'intéressent à la toxicité de l'aérosol total émis par la combustion du fumigène, impliquant les effets d'autres gaz non spécifiques au fumigène pouvant conduire à ces variabilités de réponses entre les différentes études.

2.4 Réglementation concernant l'utilisation des fumigènes

Il existe une très grande variété de fumigènes avec des compositions chimiques très différentes. Les militaires et les artificiers dans l'exercice de leur métier peuvent être exposés aux aérosols produits par les fumigènes, à des temps d'exposition plus ou moins longs et à des fréquences différentes.

Aux États-Unis, les rapports du NRC ont eu pour objectif de mettre à jour la toxicité des fumigènes afin d'établir des recommandations et des seuils d'exposition en vue de protéger la santé des militaires ainsi que celle de civils vivant ou travaillant près de structures d'entraînements militaires. Quatre limites d'exposition ont ainsi été définies :

- (1) **Emergency Exposure Guidance Levels (EEGL)** : limite d'exposition dans une situation d'urgence et rare pour une exposition du **personnel militaire** imprévue et de moins de 24h.
- (2) **Permissible Exposure Guidance Levels (PEGL)** : limite d'exposition autorisée pour des expositions répétées du **personnel militaire** durant les exercices d'entraînements.

- (3) **Short-term Public Emergency Guidance Levels (SPEGL)** : limite d'exposition à court terme pour **la population civile**, après exposition aux fumigènes lors d'entraînements militaires.
- (4) **Permissible Public Exposure Guidance Levels (PPEGL)** : limite d'expositions répétées autorisée pour **les populations résidant ou travaillant** à proximité d'installations d'entraînements militaires.

Les rapports du NRC ont permis d'établir des valeurs limites pour les fumigènes à base d'HC, WP, RP et TiO₂, présentés dans le **Tableau 6** ci-dessous. Concernant les fumigènes colorés et leurs produits de combustion, les rapports du NRC ont conclu qu'une exposition à ce type de fumigène était préoccupante en raison d'une possible sensibilisation cutanée et d'une atteinte des voies respiratoires. Cependant, ces données sont trop limitées pour permettre des recommandations bien étayées sur des limites d'exposition. Afin de protéger au minimum le personnel militaire, il est recommandé aux troupes qui ne portent pas d'équipement de protection, d'éviter d'entrer dans le nuage de fumée pendant l'entraînement.

Tableau 6. Valeurs limites d'exposition aux fumigènes HC, WP, RP et TiO₂.

EEGL : Emergency Exposure Guidance Levels. PEGL : Permissible Exposure Guidance Levels

SPEGL : Short-term Public Emergency Guidance Levels PPEGL : Permissible Public Exposure Guidance Levels

Fumigène	Directive d'exposition	Temps d'exposition	Valeur limite d'exposition (mg/m ³)
HC (exprimé en Zn Cl ₂)	EEGL PEGL	15 min ; 1h ; 6h 8h/jour, 5 jours/semaine	10 ; 3 ; 0,4 0,2
	SPEGL PPEGL	15 min ; 1h ; 6h 8h/jour, 5 jours/semaine	1 ; 0,3 ; 0,04 0,02
WP (exprimé en H ₃ PO ₄)	EEGL PEGL	15 min ; 1h ; 6h 8h/jour, 5 jours/semaine	19 ; 5 ; 0,8 0,09
	SPEGL PPEGL	15 min ; 1h ; 6h 8h/jour, 5 jours/semaine	1,9 ; 0,5 ; 0,08 0,009
RP	EEGL PEGL	15 min ; 1h ; 6h 8h/jour, 5 jours/semaine	40 ; 10 ; 2 1
	SPEGL PPEGL	15 min ; 1h ; 6h 8h/jour, 5 jours/semaine	4 ; 1 ; 0,2 0,1
TiO₂	EEGL PEGL	15 min ; 1h ; 6h 8h/jour, 5 jours/semaine	1800 ; 450 ; 75 2
	SPEGL PPEGL	15 min ; 1h ; 6h 8h/jour, 5 jours/semaine	180 ; 45 ; 7,5 0,2

En France et en Europe, il n'existe pas de Valeurs Limites d'Exposition Professionnelles (VLEP) pour des expositions aux fumigènes. La VLEP est définie comme la limite de la moyenne, pondérée en fonction du temps, de la concentration d'un agent chimique dangereux dans l'air de la zone de respiration d'un travailleur au cours d'une période de référence déterminée. Au niveau réglementaire, la période de référence est soit de 8 heures (VLEP- 8h) soit de 15 minutes (VLEP court terme). Les VLEP sont établies substance par substance et ne peuvent prendre en compte la toxicité d'un cocktail de produits chimiques comme c'est le cas pour la combustion de fumigènes. Ainsi, la réglementation actuelle repose sur des valeurs substance par substance et non sur une valeur pour le mélange contrairement aux valeurs définies pour l'armée américaine dans les rapports du NRC. Depuis la mise en place du règlement européen REACH en 2006, concernant l'enregistrement, l'évaluation et l'autorisation des substances chimiques,

ainsi que les restrictions applicables à ces substances, une meilleure évaluation du risque sanitaire concernant la production des fumigènes pourrait être mise en place.

Dans les précédentes parties, nous avons souligné le risque majeur d'une exposition spécifiquement liée aux particules de fumigènes. La réglementation des particules de l'air ambiant n'est pas adaptée pour le milieu professionnel. Dans le milieu professionnel, on parle d'exposition à des poussières. Ces aérosols sont générés principalement lors de la manipulation de matériaux pulvérulents, lors de procédés mécaniques comme le concassage, le broyage, le perçage ou le ponçage mettant en œuvre des matériaux et par la remise en suspension par l'air de particules déposées sur les surfaces. Les aérosols émis par les fumées (émissions de moteurs diesel, de hauts fourneaux, épandage de bitume), les brouillards et les bioaérosols (bactéries, moisissures, virus, composés et fragments microbiens) sont également inclus dans la définition des poussières. Le domaine de taille des particules des poussières n'est pas défini comme celui des particules de l'air ambiant. Les poussières sont définies comme des particules de taille comprise entre 10 nm et 100 µm, cette dernière valeur étant la limite supérieure communément admise pour définir un aérosol (INRS, 2022). On distingue trois fractions d'aérosols, en lien avec les effets potentiels sur la santé :

- **La fraction inhalable** : fraction massique des particules totales en suspension dans l'air inhalée par le nez et la bouche.
- **La fraction thoracique** : fraction massique des particules inhalées pénétrant au-delà du larynx. Les particules d'un diamètre aérodynamique de 10 µm ont une probabilité de pénétration de 50 %.
- **La fraction alvéolaire** : la fraction massique des particules inhalées qui pénètrent dans les voies aériennes non ciliées. Les particules d'un diamètre aérodynamique de 4 µm ont une probabilité de pénétration de 50 %.

Ainsi, les valeurs limites d'exposition professionnelle aux poussières dites sans effet spécifiques sont les suivantes :

- VLEP-8h pour la fraction inhalable : 4 mg/m³
- VLEP-8h pour la fraction alvéolaire : 0,9 mg/m³

Enfin, on distingue les poussières qui entraînent des pathologies spécifiques comme la silice cristalline qui est à l'origine de la silicose et de cancers pulmonaires, des

poussières dites sans effet spécifique. Elles sont définies comme des poussières « qui ne sont pas en mesure de provoquer seules sur les poumons ou sur tout autre organe ou système du corps humain d'autre effet qu'un effet de surcharge » (ANSES, 2020).

Ainsi, les aérosols émis par les fumigènes pourraient rentrer dans l'une de ces catégories de cadre réglementaire.

3. Réponses biologiques aux particules : méthodes d'évaluation *in vitro* de la toxicité pulmonaire

Le chapitre précédent a porté sur les effets sanitaires des activités pyrotechniques mais les études de toxicité se sont intéressées exclusivement à la toxicité de l'aérosol total, incluant alors les phases gazeuse et particulaire. Or, les particules ont la capacité de se déposer et de pénétrer profondément dans l'appareil respiratoire pouvant causer des dommages cellulaires, à l'origine de maladies respiratoires. Ainsi, cette troisième partie va aborder les réponses biologiques induites spécifiquement par les particules ainsi que les approches *in vitro* permettant l'évaluation de leur toxicité.

3.1 L'épithélium respiratoire

3.1.1 Structure et histologie

L'appareil respiratoire se divise en trois parties : les voies aériennes supérieures et inférieures et la région alvéolaire (**Figure 10**). Les voies aériennes supérieures sont extra-thoraciques et comprennent le nez et les sinus, la bouche, le pharynx et le larynx. Les voies aériennes inférieures sont intrathoraciques et commencent par la trachée, pour se diviser en deux bronches primaires principales puis en de nombreuses ramifications, les bronchioles. La région alvéolaire est constituée des bronchioles terminales, des sacs alvéolaires et des alvéoles. Les alvéoles sont les unités fonctionnelles du poumon et forment une barrière très mince (0,4-2,5 μm), accolée à la paroi de la circulation pulmonaire.

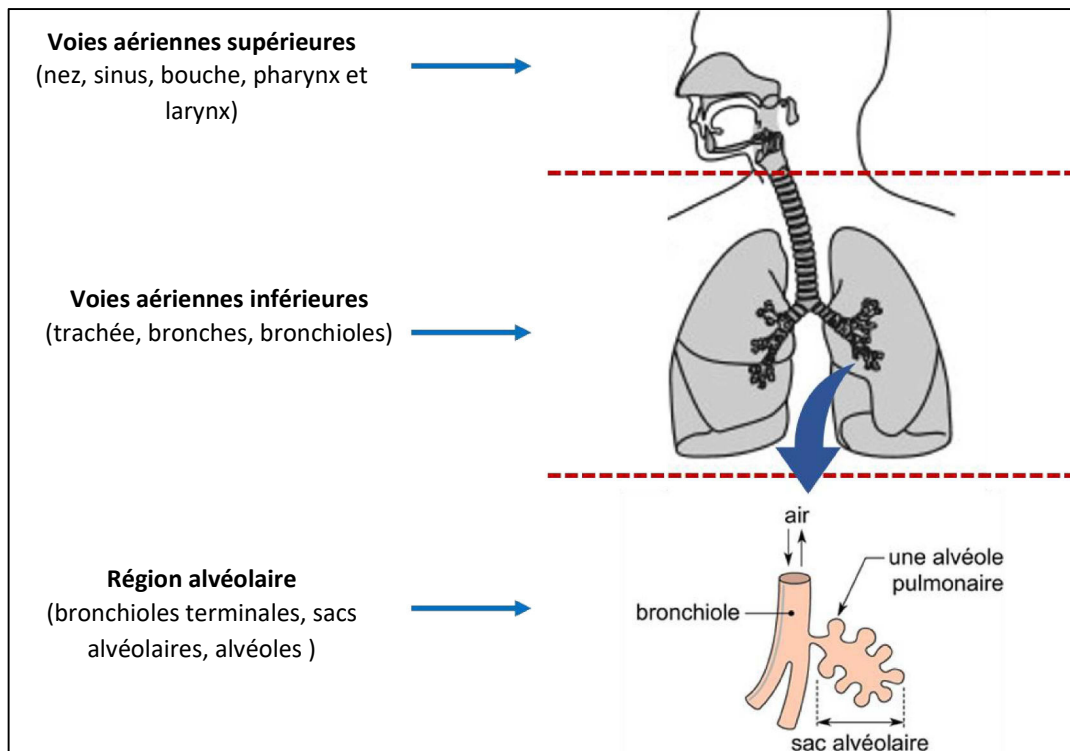


Figure 10. Structure des voies respiratoires. Adapté de (Coumoul, 2017)

Les voies respiratoires humaines sont tapissées d'un épithélium qui comporte plusieurs types cellulaires. Ces cellules épithéliales reposent sur une membrane basale et sont étroitement liées par des jonctions serrées et des jonctions adhérentes intercellulaires permettant de maintenir l'intégrité de l'épithélium et d'assurer sa fonction de barrière physique. La membrane basale repose sur un chorion dans lequel est localisé le muscle lisse, les glandes et le cartilage. Les constituants majeurs de la membrane basale sont des laminines, des glycosaminoglycanes, de la réticuline qui forment un réseau auquel les cellules épithéliales peuvent s'ancrer grâce à des hémidesmosomes (Marrazzo et al., 2016). La protéine *Zonula occludens-1* (ZO-1) est un composant essentiel des jonctions serrées avec les occludines et les claudines (Bhowmick & Gappa-Fahlenkamp, 2016). Les cadhérines comme la E-cadhérine associée à la β -caténine sont représentatives des jonctions adhérentes. L'ensemble permet de rendre jointives les cellules épithéliales formant ainsi une barrière contre les agents pathogènes colonisant les voies respiratoires mais aussi contre divers polluants (Aghapour et al., 2018; Bhowmick & Gappa-Fahlenkamp, 2016; Blank et al., 2006; Marrazzo et al., 2016).

Dans les voies respiratoires supérieures et inférieures, les cellules basales représentent en moyenne 30% des cellules de l'épithélium (Rock et al., 2009), sans jamais être en contact avec la lumière pulmonaire. La surface du tissu est composée principalement de trois types cellulaires : des cellules ciliées, des cellules caliciformes ou « goblet » en anglais, sécrétant du mucus mais aussi de cellules sécrétrices immunitaires appelées cellules « club » et plus rarement des cellules neuroendocrines (Rock et al., 2009). L'épaisseur de l'épithélium et sa composition en cellules varient en fonction de sa localisation dans l'appareil respiratoire (**Figure 11**).

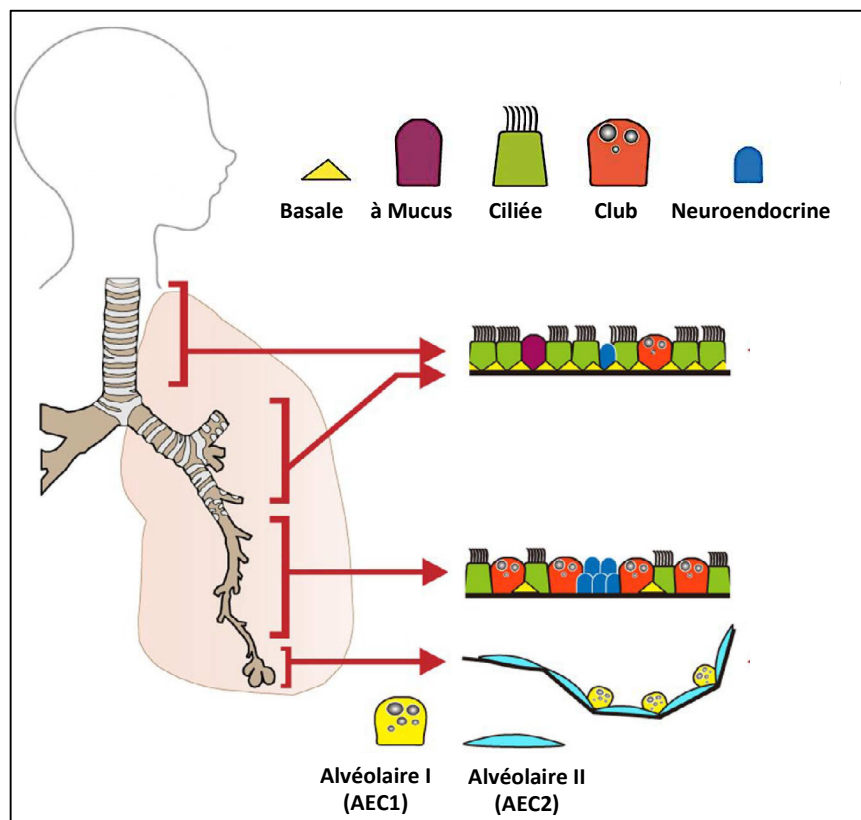


Figure 11. Composition cellulaire de l'épithélium respiratoire en fonction de sa localisation. Adaptée de Kiyokawa & Morimoto, 2020.

Au niveau trachéo-bronchique, l'épithélium est d'abord cylindrique pseudo-stratifié constitué de cellules basales, de cellules ciliées et de cellules caliciformes, puis, va évoluer au niveau des bronchioles terminales en un épithélium cuboïde monocouche, constitué théoriquement seulement de cellules ciliées et de cellules Club (Kiyokawa & Morimoto, 2020). Enfin, l'épithélium alvéolaire est de type pavimenteux simple et composé de seulement deux types de cellules épithéliales ou pneumocytes de type I (AEC1) et de type II (AEC2) au sein duquel sont infiltrés des macrophages.

Les **cellules basales** sont des cellules ovoïdes de petites tailles à la base de l'épithélium. Elles ont la particularité d'être des cellules progénitrices, c'est-à-dire qu'elles sont capables de proliférer et de se différencier en plusieurs types cellulaires présents dans l'épithélium respiratoire (Rock et al., 2009). Elles assurent également la cohésion de l'épithélium respiratoire en se liant aux cellules voisines via des desmosomes et elles s'ancrent à la membrane basale grâce aux hémidesmosomes. Elles peuvent être mises en évidence par immunofluorescence en recherchant l'expression de cytokératines (Pohl et al., 2009 ; Soty et al., 2019).

Les **cellules caliciformes** ou cellules à mucus ou cellules en gobelet sont de forme prismatique simple et sont des cellules sécrétrices de mucus. Ce mucus est localisé dans des vésicules de sécrétion situées au pôle apical de la cellule. Le mucus joue un rôle de barrière protectrice et sélective par le biais de la clairance muco-ciliaire (**partie 3.1.2**). La couche de mucus formée sur le tissu a une épaisseur variable entre 7 et 70 μm (Hatstrup & Gendler, 2008) avec une moyenne autour de 20 μm (Chu et al., 2016) pour des personnes en bonne santé. La présence de ces cellules caliciformes représente 5 à 15 % de la surface de l'épithélium en fonction de la localisation. Les cellules à mucus peuvent être mises en évidence en recherchant l'expression ou la sécrétion des protéines mucines MUC5AC et MUCB (Kanai et al., 2015; Rayner et al., 2019; Sotty et al., 2019).

Les **cellules ciliées**, de forme prismatique, sont caractérisées par la présence à leur pôle apical de cils, environ 200 à 300 cils par cellule (Rokicki et al., 2016). Chaque cil mesure entre 5 et 8 μm de long et 0,3 μm de diamètre (Breeze & Wheeldon, 1977). Ce sont les cellules les plus nombreuses de l'épithélium, représentant 50 à 75 % de la surface de l'épithélium, avec un ratio estimé de cinq cellules ciliées pour une cellule caliciforme chez le sujet sain (Breeze & Wheeldon, 1977). Les cellules ciliées peuvent être mises en évidence en recherchant l'expression de β -tubuline IV ou d' α -tubuline acétylée ou non (Rayner et al., 2019; Sotty et al., 2019).

Les **cellules club** de forme cubique, dépourvues de cils, possèdent une région apicale remplie de granules de sécrétion (G. Singh & Katyal, 2006). Dans des conditions physiologiques, ces cellules constituent approximativement 9% de la population totale des cellules épithéliales des voies respiratoires humaines et sont réparties majoritairement dans les bronchioles terminales (Rokicki et al., 2016). Ces cellules sécrètent des composés détoxifiants et antimicrobiens qui contribuent aux défenses de la muqueuse respiratoire (Iwasaki et al., 2017). Elles sécrètent aussi des protéines qui se

lient au surfactant permettant la stabilisation de sa structure (Niden, 1967). Tout comme les cellules basales, les cellules club sont des cellules progénitrices et sont capables de proliférer et de se différencier en cellules ciliées (Rock et al., 2009). De plus, elles ont une activité métabolique importante car elle contiennent de nombreux CYP450 (Rokicki et al., 2016).

Les **cellules neuroendocrines** sont des cellules épithéliales endocrines, associées à des fibres nerveuses, regroupées pour former des îlots innervés ou sont isolées. Ce sont des cellules sécrétrices rares (1 pour 2500 cellules épithéliales), retrouvées particulièrement aux embranchements des voies respiratoires, au niveau des bronchioles (Cutz et al., 2007). Les fonctions de ces cellules sont mal connues mais il semblerait qu'elles jouent le rôle de chimiorécepteur sensible à l'oxygène avec des fonctions régulatrices locales et réflexes, et un rôle de régulateur de la croissance et du développement des voies respiratoires (Van Lommel et al., 1999).

L'alvéole pulmonaire est composée de **cellules épithéliales alvéolaires** AEC1 et AEC2 ainsi que de macrophages. Les AEC1 sont des cellules extrêmement minces et aplaties, recouvrant 95% de la surface alvéolaire et permettant les échanges gazeux entre les alvéoles et le sang (Whitsett et al., 2015). Les AEC2 de forme grossièrement cubique, sécrètent le surfactant et agissent comme cellules progénitrices des AEC1 (Whitsett et al., 2015). Le surfactant est principalement composé de phospholipides (85-90%) dont 40% de phosphatidylcholine et de 10% environ de protéines hydrophobes spécifiques (SP-A, SP-B, SP-C et SP-D) (Gasser et al., 2012). Son rôle principal est de réduire la tension de surface au niveau alvéolaire et de maintenir une surface optimale permettant les échanges gazeux lors des mouvements respiratoires (Gasser et al., 2012). On trouve également des macrophages qui ont une fonction de phagocytose jouant un rôle dans la clairance alvéolaire.

3.1.2 Clairance muco-ciliaire

Une fois déposée dans les voies respiratoires, les particules peuvent être soit absorbées soit éliminées. Les particules solubles et insolubles sont majoritairement éliminées par le mécanisme de la clairance muco-ciliaire de l'épithélium respiratoire, décrit dans la **Figure 12**.

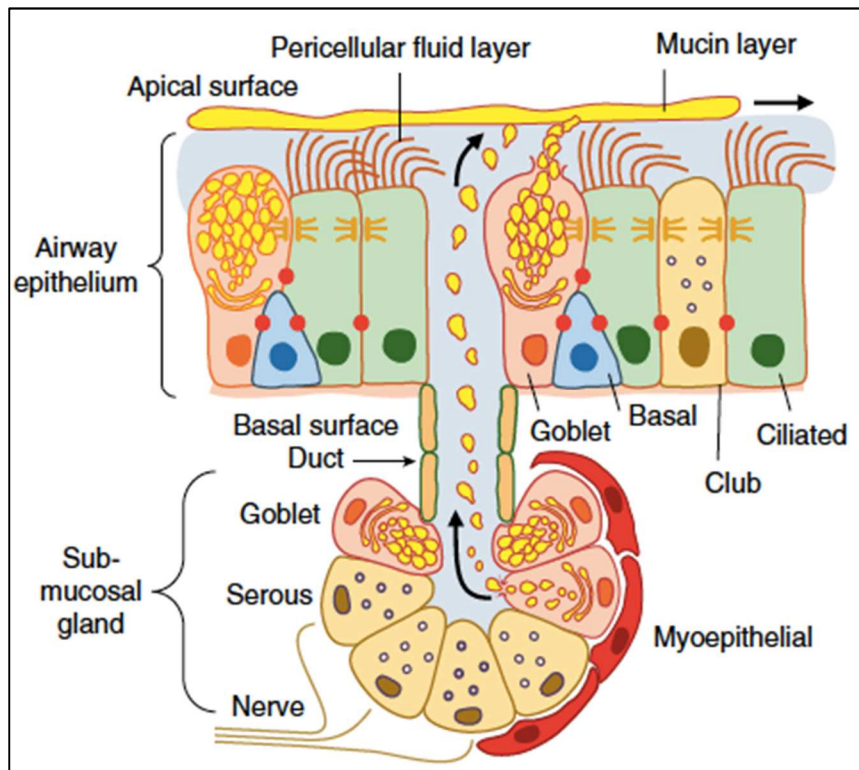


Figure 12. Mécanisme de la clairance muco-ciliaire médiée par l'épithélium respiratoire et la glande sous-muqueuse. D'après Whitsett, 2018.

L'épithélium respiratoire est recouvert d'un fluide de revêtement épithélial, composé d'une couche de liquide périciliaire et au-dessus d'une couche de mucus, au niveau des voies aériennes supérieures et inférieures (Knowles & Boucher, 2002). Le mucus permet de piéger les particules, molécules et micro-organismes pathogènes présents dans l'air inhalé, les empêchant de pénétrer au sein du tissu. Ayant des propriétés d'écoulement, le mucus est mis en mouvement par les cils respiratoires, permettant de transporter et d'évacuer ces particules piégées. Pour permettre le bon fonctionnement des cils et donc du transport du mucus, les cils ne sont pas directement immergés dans la couche de mucus mais dans la couche de liquide périciliaire. Cette dernière est beaucoup moins visqueuse que le mucus et d'épaisseur proche de la longueur des cils, de 6 à 7 μm permettant le libre battement des cils. Les cils forment un mouvement rotatoire synchrone et possèdent un battement ciliaire puissant entre 5 et 20 Hz (Chu et al., 2016; L. Liu et al., 2013) permettant de faire remonter le mucus vers les voies aériennes supérieures pour être expectoré ou avalé (Bustamante-Marin & Ostrowski, 2017). Les constituants du mucus, mucines et mucopolysaccharides, sont sécrétés par les cellules caliciformes et par les cellules sécrétoires des glandes sous-muqueuses. D'autres

éléments tels que diverses protéines antimicrobiennes, des métabolites et des électrolytes sont présents dans la composition du mucus (Whitsett, 2018).

Les cellules ciliées et les cellules caliciformes de l'épithélium respiratoire sont indispensables à la clairance muco-ciliaire mais les glandes présentes dans la sous-muqueuse épithéliale jouent également un rôle essentiel (Bustamante-Marin & Ostrowski, 2017) (**Figure 12**). Ces glandes sous-muqueuses sont tapissées de cellules à mucus et de cellules séreuses qui sécrètent une variété de protéines immunitaires innées, des mucines, et des électrolytes qui contrôlent l'hydratation des sécrétions. Les glandes sont innervées et entourées de cellules myoépithéliales qui assurent la sécrétion du mucus en réponse à des influx nerveux qui peuvent activer des sécrétions massives des glandes après stimulation par des irritants et des toxiques (Whitsett, 2018).

3.2 Modèles cellulaires humains et méthodes d'exposition

Depuis une cinquantaine d'années, de nouveaux modèles d'études *in vitro* sont utilisés afin de réduire, affiner et remplacer l'expérimentation animale, notamment, pour évaluer les effets de polluants aériens sur la santé humaine. De nombreux modèles cellulaires pulmonaires et diverses méthodes de cultures sont utilisés pour reproduire une exposition par inhalation à des particules et évaluer leur toxicité. Dans les modèles cellulaires, on distingue les lignées cellulaires et les cellules primaires. Les cellules épithéliales recouvrant la surface des voies respiratoires sont les premières cibles d'exposition aux particules. Par conséquent, elles constituent les principaux modèles cellulaires pour évaluer la toxicité des particules.

3.2.1 Culture à l'interface air-liquide (IAL)

Traditionnellement, la culture cellulaire est réalisée en deux dimensions, dans des conditions immergées, sur des surfaces en plastique. Cependant, ce type de culture est limité pour étudier une toxicité par inhalation représentative de l'épithélium respiratoire (Hiemstra et al., 2018). En effet, l'épithélium respiratoire étant de type pseudo-stratifié, composé de plusieurs types cellulaires et avec une fonction muco-ciliaire au niveau trachéo-bronchique, la culture immergée ne permet donc pas d'étudier l'interaction entre différents types cellulaires. Une autre des limites de ce type de culture

est l'apport d'oxygène non contrôlé. La culture en immergée est donc très éloignée des conditions physiologiques.

Ainsi, le développement de modèles plus complexes, cultivés en trois dimensions, dans lesquels les cellules peuvent proliférer dans de multiples directions et se différencier pour mieux représenter les interactions cellulaires dans leur environnement physiologique ont vu le jour. La culture à l'IAL (**Figure 13**) permet d'obtenir ce type de modèle. Cette méthode de culture repose tout d'abord sur l'ensemencement de cellules sur un insert poreux, cultivé quelques jours en liquide-liquide jusqu'à confluence des cellules. Puis, les cellules sont cultivées en apical en contact avec de l'air et du côté basal en contact avec le milieu de culture, contenant des facteurs de croissance et agents de différenciation spécifiques. La culture à l'IAL se poursuit pendant plusieurs jours jusqu'à plusieurs semaines permettant la reconstitution d'un épithélium pseudo-stratifié plus ou moins différencié, en fonction du choix du modèle cellulaire utilisé et du temps de culture choisi.

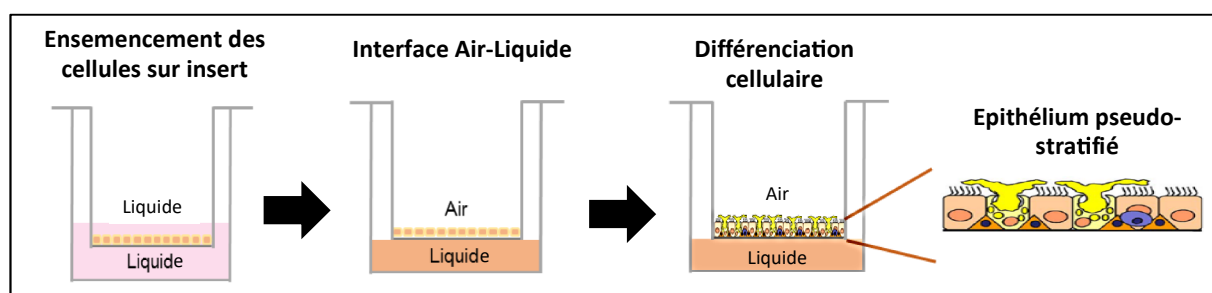


Figure 13. Culture de cellules épithéliales pulmonaires à l'IAL.

Initialement la culture à l'IAL a été développée avec des lignées cellulaires pulmonaires telles que BEAS-2B, 16HBE14o-, Calu-3, NCI-H441 ou A549 (Upadhyay & Palmberg, 2018) qui seront présentées dans **la parties 3.2.2**. Tout l'intérêt de la culture à l'IAL par rapport à la culture en immergée est mis en évidence dans l'exemple illustré dans la **figure 14** ci- dessous.

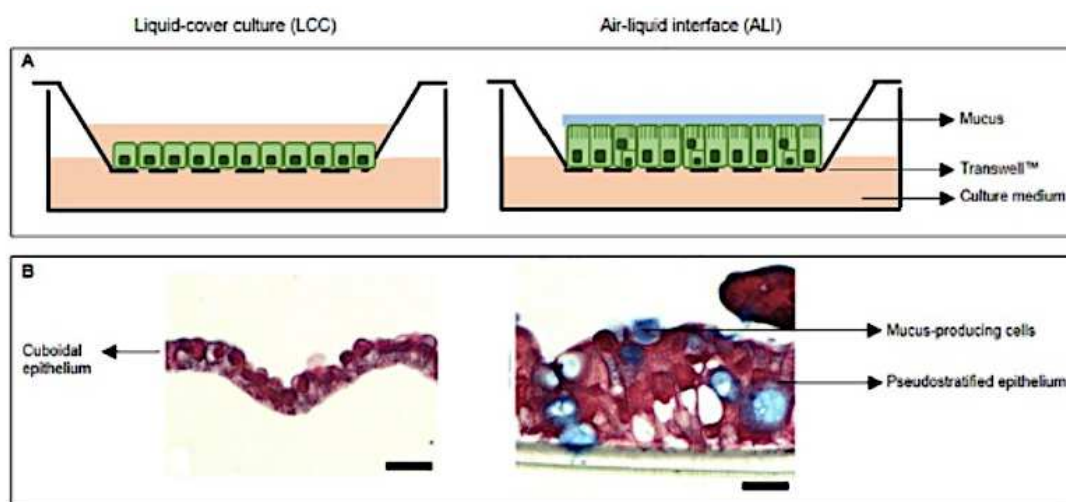


Figure 14. Comparaison de la morphologie de la barrière bronchique entre les cellules Calu-3 ensemencées en culture de liquide-liquide (LCC) ou en configuration d'interface air-liquide (ALI). (A) Représentation schématique des deux méthodes utilisées pour développer le modèle bronchique sur insert Transwell®. (B) Culture de cellules Calu-3 en LCC ou en configuration ALI après trois semaines de culture. Hématoxyline-éosine et coloration bleue Alcian (colorée en bleu). Barres d'échelle : 20 μm. D'après (Lechanteur et al., 2018) et adapté de (Kreft et al., 2015).

La lignée cellulaire épithéliale bronchique Calu-3, cultivée en condition immergée (liquide-liquide) pendant trois semaines forme un épithélium cubique simple alors qu'à l'IAL l'épithélium est pseudo-stratifié ressemblant à un épithélium bronchique (**Figure 14**). De plus à l'IAL, le cytoplasme des cellules est constitué de nombreuses vésicules sécrétrices de mucus (colorés au bleu Alcian) qui sont plus nombreuses qu'en culture liquide-liquide. Après trois semaines de culture en IAL, ces vésicules sont plus nombreuses et une sécrétion de mucus est observée (Kreft et al., 2015).

Par ailleurs, la culture à l'IAL rendrait les cellules plus résistantes aux effets toxiques des particules (Ghio et al., 2013). En effet, après exposition à des particules urbaines, la lignée cellulaire BEAS-2B et les cellules primaires NHBE cultivées en immergé ont montré une expression forte des gènes de l'inflammation (*IL-6*, *IL-8*) et du gène antioxydant *hème oxygénase-1* (*HO-1*) comparé aux cultures à l'IAL qui n'ont montré aucun effet. Cette absence de réponse à l'IAL n'est pas liée à la seule différenciation des cellules avec la présence d'une clairance muco-ciliaire protectrice pour le modèle NHBE, car le modèle BEAS-2B n'est pas capable de se différencier en un épithélium pseudo-stratifié avec une fonction muco-ciliaire. En effet, l'étude met en évidence qu'une augmentation de la disponibilité de l'oxygène pour les cellules cultivées à l'IAL rendrait les cellules BEAS-2B et NHBE plus résistantes (Ghio et al., 2013).

3.2.2 Les lignées cellulaires

Les lignées de cellules BEAS-2B, 16HBE14o- et Calu-3 font partie des lignées cellulaires épithéliales bronchiques les plus largement utilisées en toxicologie *in vitro* (Baber et al., 2011; H. Chen et al., 2021; Juarez Facio et al., 2022; Q. Lin et al., 2022; Méausoone et al., 2021; Persoz et al., 2012; Yu et al., 2017). Au niveau épithélial alvéolaire, le modèle A549 est le plus répandu (Kooter et al., 2013; Persoz et al., 2012; Tilly et al., 2020; Yu et al., 2017) mais le modèle NCI-H441 est également utilisé (Lakhdar et al., 2022).

Les cellules **BEAS-2B** proviennent de cellules épithéliales bronchiques immortalisées par le virus AD12-SV40 (Reddel et al., 1988). Ce sont des cellules qui ont une morphologie proche des cellules épithéliales basales mais qui sont incapables de se différencier à l'IAL et de former une barrière épithéliale solide, en raison de la présence de jonctions non fonctionnelles (résistance trans-épithéliale très faible) (Rothen-Rutishauser et al., 2008; Stewart et al., 2012).

La lignée cellulaire **16HBE14o-** est issue de cellules épithéliales bronchiques transformées par le virus SV40 (Cozens et al., 1994). En culture à l'IAL, cette lignée cellulaire conserve les caractéristiques de cellules épithéliales bronchiques différenciées normales. Les cellules se développent en couches de cellules polarisées et forment des jonctions serrées bien fonctionnelles, des cils peuvent être détecté mais elles sécrètent moins de mucus que des cellules épithéliales bronchiques primaires (Rothen-Rutishauser et al., 2008). Ce modèle semble un peu plus différencié que le modèle BEAS-2B (Hiemstra et al., 2018).

La lignée cellulaire **Calu-3** provient d'un adénocarcinome du poumon, de cellules de la glande séreuse sous muqueuse. Parmi les lignées cellulaires, il s'agit du modèle le plus proche de l'épithélium physiologique lorsqu'il est cultivé à l'IAL. En effet, ces cellules peuvent être cultivées pendant plusieurs semaines et former un épithélium pseudo-stratifié avec une formation de cils et une sécrétion de mucus importante (Kreft et al., 2015; Sonntag et al., 2022; Stewart et al., 2012). De plus, ce modèle forme des jonctions serrées et est la seule lignée cellulaire avec une haute résistance électrique trans-épithéliale ($TEER \geq 1000 \Omega/\text{cm}^2$) (Ji et al., 2022; Min et al., 2016; Stewart et al., 2012). En comparaison avec des cellules primaires, la confluence est plus longue à atteindre avec le

modèle Calu-3 et des différences d'expression de ZO-1 et de localisation de la β -tubuline IV sont observées (Stewart et al., 2012).

Concernant les modèles alvéolaires, la lignée cellulaire tumorale **A549** a été développée il y a 40 ans et provient d'un adénocarcinome pulmonaire. Ces cellules représentent des cellules épithéliales alvéolaires de type II, capables de sécréter du surfactant (Lieber et al., 1976). Cependant, des études contrastées sur la capacité de ce modèle à former des jonctions serrées à l'IAL bien sont rapportées (Cooney & Hickey, 2011; Rothen-Rutishauser et al., 2008). Les cellules **NCI-H441** proviennent du liquide péricardique d'un patient atteint d'un adénocarcinome du poumon et présentent des caractéristiques de l'épithélium pulmonaire bronchiolaire, notamment les cellules Club (Hermanns et al., 2004). Cultivé à l'IAL, ce modèle forme des monocouches de cellules polarisées qui sont électriquement étanches et expriment divers transporteurs de médicaments clés, tels que la glycoprotéine P, de façon similaire à celle observée dans les cellules épithéliales alvéolaires humaines (Lakhdar et al., 2022). Ces cellules sont donc utilisées pour étudier le transport cellulaire (Salomon et al., 2014).

Les avantages des lignées cellulaires sont, entre autres, leur facilité d'utilisation, leur longue durée de vie et le coût modeste des expériences (Zavala et al., 2020). Cependant, ces lignées cellulaires respiratoires cultivées à l'IAL présentent quelques limitations, que ce soit au niveau organisationnel de l'épithélium, dans la formation des jonctions serrées ou leur capacité limitée dans la fonction muco-ciliaire (Hiemstra et al., 2018). Cela peut conduire à une sous-estimation ou une sur-estimation des effets des particules ou autres polluants.

3.2.3 Les cellules primaires

L'utilisation de cellules primaires humaines cultivées à l'IAL est considérée comme une meilleure alternative que les lignées cellulaires pour reconstruire l'épithélium pulmonaire. En effet, leurs caractéristiques phénotypiques et génotypiques sont mieux conservées que les lignées cellulaires. De plus, elles représentent une alternative intéressante à l'expérimentation animale et peuvent être utilisées aussi bien pour des expositions aiguës que pour des expositions répétées (Zavala et al., 2020).

La culture primaire de cellules épithéliales bronchiques humaines comporte plusieurs désignations dans la littérature : **NHBE** pour « **Normal Human Bronchial Epithelial Cells** », PBEC pour « Primary Bronchial Epithelial Cells » ou encore hBEC pour « human Bronchial Epithelial Cells ». Ces cellules proviennent de biopsies de l'épithélium trachéo-bronchique humain et sont des modèles proches physiologiquement de l'épithélium respiratoire lorsqu'ils sont cultivés à l'IAL. En effet, les cellules NHBE ont la capacité de se différencier et d'exprimer des marqueurs des cellules ciliées (β -tubuline IV), à mucus (MUC5AC) et basales (RNase 7) ainsi que des jonctions serrées (ZO-1 et E-cadhérine) et des desmosomes (Amatngalim et al., 2015; Bhowmick & Gappa-Fahlenkamp, 2016; Juarez-Facio et al., 2022; Stewart et al., 2012), permettant l'organisation en un épithélium pseudo-stratifié pourvu d'une fonction muco-ciliaire (Juarez-Facio et al., 2022; Nordberg et al., 2020; Rayner et al., 2019; Sotty et al., 2019). Dès 14 jours de différenciation, ce modèle cellulaire présente des cellules basales, des cellules à mucus et des cellules ciliées (**Figure 15**). Cependant, ce modèle ne contient pas de cellules neuroendocrines et très peu voire pas de cellules « club » (Boei et al., 2017; Davis et al., 2015).

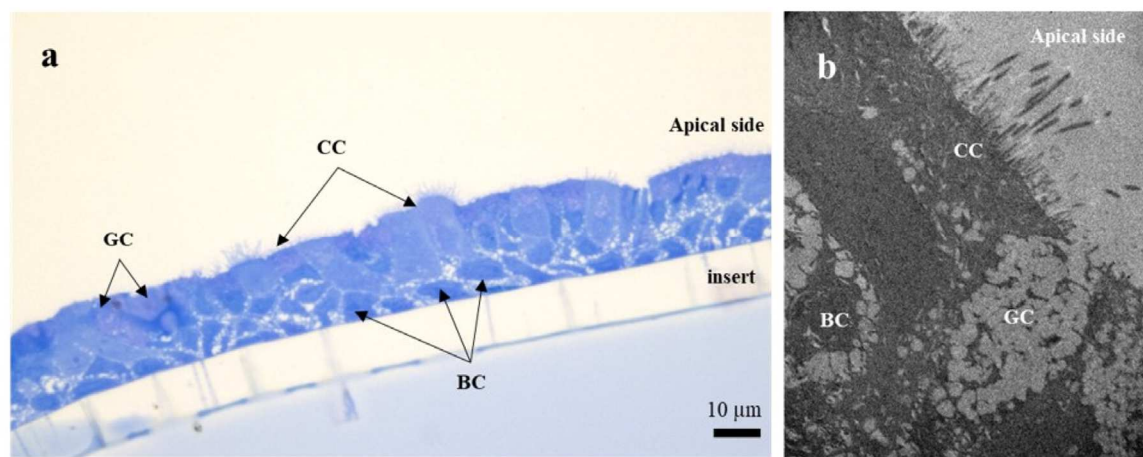


Figure 15. Structure cellulaire du modèle NHBE après 14 jours de différenciation à l'IAL. a : microscopie optique de NHBE colorées au bleu de Toluidine. b : microscopie électronique Bright-field de NHBE (large field of view). BC : cellules basales ; CC : cellules ciliées ; GC : cellules à mucus. Adapté de (Juarez-Facio et al., 2022).

Afin de représenter une portion plus distale de l'épithélium respiratoire, le modèle **SAEC (Small Airway Epithelial Cells)** provenant de cellules épithéliales bronchiolaires est le plus souvent cultivé en immergé (Sisler et al., 2015, 2018; Wu et al.,

2020; W. Zhang et al., 2019). Cultivable à l'IAL, ce modèle peut se différencier en épithélium muco-ciliaire avec une sécrétion de mucus et la formation de jonctions serrées bien fonctionnelles (Lan et al., 2021; C. R. Svensson et al., 2016; Thaikoottathil et al., 2009).

Les possibilités d'isoler et de cultiver les cellules de l'épithélium alvéolaire humain sont plus limitées que celles permettant d'obtenir un épithélium bronchique. Malgré des avancées dans leur isolement, les AEC2 isolées ont une durée de vie très limitée en culture et se différencient spontanément en AEC1 (Fujino et al., 2012).

Pour surmonter la limitation de la disponibilité des cellules primaires, des modèles cultivés à l'IAL sont disponibles dans le commerce. Les modèles de voies respiratoires humaines (EpiAirway™) développés par la société MatTek (MatTek, USA) et MucilAir™ développés par la société Epithelix (Epithelix Sarl, Suisse) comptent plus de 30 donneurs provenant d'individus sains et malades (patients asthmatiques, patients atteints de BronchoPneumopathie Chronique Obstructive (BPCO), fumeurs). Le principal avantage des modèles cultivés à l'IAL disponibles dans le commerce est leur longue durée de vie (3-12 mois), ce qui permet de réaliser des études d'exposition répétée ou chronique.

3.2.4 Co-cultures, organoïdes et organe-sur-puce

La culture en IAL a permis également le développement de modèles *in vitro* multicellulaires ou **co-cultures**, plus complexes à mettre en place, représentant la barrière pulmonaire, incluant différents types de cellules (cellules épithéliales, macrophages, cellules endothéliales et/ou cellules dendritiques), primaires ou de lignées cellulaires (Chortarea et al., 2015; Dekali et al., 2014; Hiemstra et al., 2018; Klein et al., 2013; Pohl et al., 2009; Zavala et al., 2020). Des modèles de co-culture sont également commercialisés par les sociétés MatTek et Epithelix.

Les **organoïdes** sont définis comme un système de culture de plusieurs types cellulaires d'un organe, présentant certaines fonctions de celui-ci et les cellules sont regroupées et organisées de façon similaire à l'organe (Lancaster & Knoblich, 2014). A ce jour, seules quelques études ont développé des organoïdes pulmonaires (Dye et al., 2015; Longmire et al., 2012; Mondrinos et al., 2014). Cependant, ces systèmes ne sont pas

facilement applicables pour mimer des expositions par inhalation, telles que les cultures à l'IAL et présentent des défis techniques supplémentaires en raison de la nature tridimensionnelle de la culture et des composants de sa matrice (Hiemstra et al., 2018).

Les **organes sur puce** ou « **organ-on-a-chip** » sont des modèles d'organes issus de la micro-ingénierie qui contiennent généralement plusieurs types cellulaires et un dispositif de microfluidique permettant l'apport continu de nutriments et l'élimination des déchets. Le dispositif peut également recréer des mouvements respiratoires physiologiques par application de vide dans les chambres latérales de la puce par étirement mécanique de la membrane sur laquelle repose le dispositif. Ce système peut permettre de recréer la barrière alvéolo-capillaire (Huh et al., 2010; Stucki et al., 2015).

3.2.5 Récolte des particules

Pour reproduire une inhalation à des particules, il est tout d'abord nécessaire de récolter celles-ci. Les particules peuvent être collectées à l'aide de différents appareils de prélèvement, constitués d'un ou plusieurs impacteurs. Un seul impacteur peut être utilisé pour une seule taille de particules d'intérêt, deux impacteurs sont généralement utilisés pour récolter les PM₁₀ et les PM_{2.5} et des impacteurs en cascades constitués de plusieurs impacteurs sont également utilisés afin de couvrir plusieurs tailles de particules (Kumar et al. 2021). Ces différents types d'impacteurs sont composés de filtres en quartz, en téflon, en polyuréthane ou en polytétrafluoroéthylène. Par la suite, l'extraction des particules des filtres peut être réalisée par diverses techniques. Généralement, l'extraction se fait par sonication dans des solvants organiques, tels que du méthanol, ou dans des solvants aqueux tels que l'eau. Le choix du solvant entraîne des modifications des propriétés physico-chimiques initiales des particules. Par exemple, l'extraction par des solvants organiques peut changer la taille et la composition chimique des particules, alors que l'extraction dans des solvants aqueux peut aussi dissoudre certains éléments inorganiques (P. Kumar et al., 2021). Des contaminations par les composants des filtres peuvent aussi survenir lors de la sonication. Il est également possible de récupérer la totalité des particules par grattage des filtres. Il n'y a pas donc pas de méthode parfaite pour l'extraction des particules, et les techniques choisies doivent être ajustées pour une extraction optimale des composés d'intérêt. Après récolte, la remise en suspension des particules dans un solvant adéquat est une étape cruciale. Par exemple, la remise en

suspension dans des milieux de culture cellulaire peut changer la chimie et l'état d'agrégation des particules et modifier leurs effets biologiques (S. Chen et al., 2013). La remise en suspension dans de l'eau avec une sonication des solutions apparaît comme étant une approche plus pertinente pour préparer des suspensions de particules de façon reproductible pour les essais toxicologiques (Cohen et al., 2013). Ainsi, la caractérisation physicochimique des particules avant et après remise en suspension est essentielle pour établir des relations plus précises entre les propriétés des particules et la réponse cellulaire.

3.2.6 Méthodes d'exposition

Pour évaluer la toxicité *in vitro* des particules dans des conditions expérimentales les plus proches des conditions réelles, plusieurs paramètres sont à prendre en compte : choix du modèle cellulaire et de sa méthode de culture, méthode de récolte, d'extraction et de remise en suspension des particules, choix des doses et des durées d'exposition ainsi que de la méthode d'exposition.

De nombreuses études sur la toxicologie respiratoire des particules sont réalisées par exposition en immergé, par simple ajout de particules au milieu de culture des cellules. C'est une méthode d'exposition simple et rapide, permettant d'utiliser une large gamme de concentrations et d'étudier de nombreux paramètres biologiques. Cependant, ce mode d'exposition est peu pertinent car peu représentative des conditions physiologiques (**partie 3.3.3**). De plus, des interactions entre les composés du milieu de culture et les particules peuvent survenir, pouvant altérer leur granulométrie et leur composition chimique, modifiant ainsi leur toxicité cellulaire (Kooter et al., 2016; Loret et al., 2016; Zavala et al., 2020). De plus, l'une des principales limites est le contrôle de la dosimétrie exacte des particules mises en contact avec les cellules (A. G. Lenz et al., 2009; A.-G. Lenz et al., 2013).

Afin de mimer de manière optimale la voie d'exposition par inhalation des particules, plusieurs systèmes ont été développés pour réaliser une exposition à l'IAL, avec des systèmes non commercialisés (Upadhyay & Palmberg, 2018) ou commercialisés par les sociétés Vitrocell Systems ou Cultex Laboratories. Ces systèmes permettent de

travailler à une dosimétrie mieux définie et à une efficacité d'exposition plus élevée (Lacroix et al., 2018). Par exemple, le système d'exposition IAL de Vitrocell® est conçu pour l'exposition directe et contrôlée, à un flux d'aérosols, directement sur des cellules cultivées sur insert (**Figure 16**).

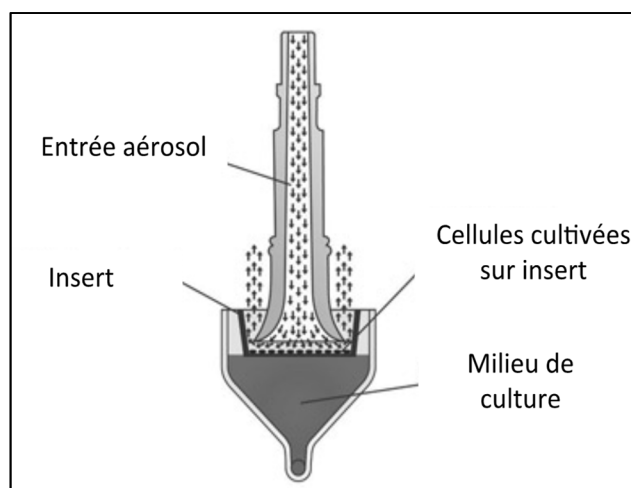


Figure 16. Schéma d'un système d'exposition à l'IAL (Vitrocell®).

Bien que ces systèmes soient théoriquement idéals, pour une exposition au plus proche des conditions réelles (Bhowmick & Gappa-Fahlenkamp, 2016; Upadhyay & Palmberg, 2018; Zavala et al., 2020), ils sont coûteux et très complexes, nécessitant de grandes quantités de particules et de lourds protocoles d'optimisation pour contrôler plusieurs paramètres tels que le flux d'air, la sédimentation, la quantité de particules déposées ou le dépôt homogène à la surface des cellules. De plus, une autre limitation de ces systèmes est la durée d'exposition qui ne peut excéder 6h en raison du dessèchement de la surface de l'épithélium, entraînant un stress et la mort cellulaire surtout avec l'utilisation de lignées cellulaires (Hiemstra et al., 2018).

Pour s'affranchir de ces limites, une méthode alternative aux expositions immergée et à l'IAL s'est développée, l'exposition en pseudo-IAL (Nordberg et al., 2020; Tomašek et al., 2016). Elle consiste à déposer un petit volume de suspension de particules, au pôle apical, de cellules cultivées à l'IAL. Une étude s'est intéressée à l'effet de l'immersion en apical sur la différenciation du modèle NHBE cultivé à l'IAL pendant 21 jours, sur des inserts de 1,2 cm de diamètre (Gerovac et al., 2014). Les résultats montrent qu'un volume apical supérieur à 250 µl entraîne une inhibition de la différenciation des

cellules ciliaires, par inhibition de facteurs de transcription impliqués dans leur différenciation. En dessous de ce volume, la différenciation en cellules ciliées est maintenue. Ainsi, une exposition en pseudo-air liquide, avec un dépôt d'une suspension de particules d'un volume inférieure à 250 μ l semble adapté pour être au plus proche des conditions réelles d'expositions. De plus, cette méthode permet d'utiliser moins de quantité de particules que les autres méthodes d'expositions (Gerovac et al., 2014).

3.3 Mécanismes de toxicité des particules

Ici sont présentés les principaux mécanismes d'action impliqués dans la toxicité des particules sur la base de la littérature scientifique concernant les particules liées à la pollution de l'air.

3.3.1 Rétention des particules, internalisation et remodelage de l'épithélium

En fonction de la localisation des particules dans l'appareil respiratoire, le temps nécessaire pour les éliminer est très variable entre les voies aériennes supérieures, la région trachéo-bronchique et la région alvéolaire. Dans les voies aériennes supérieures, il faut environ 10 minutes pour transporter les particules déposées des voies respiratoires nasales vers le tractus gastro-intestinal alors qu'au niveau trachéo-bronchique, les particules peuvent être épurées entre moins d'une heure et deux jours (C.-S. Wang, 2005). La rétention des particules dépend également de leurs propriétés physico-chimiques. Par exemple, la clairance mesurée de particules de Fe_2O_3 insolubles d'un diamètre compris entre 1 et 10 μ m est estimée entre 30h et 40h pour une respiration calme (7,5 respirations/min) et de 24h pour une respiration plus rapide (15 respirations/min) (C.-S. Wang, 2005). Au niveau alvéolaire, la vitesse d'élimination des particules par les macrophages est très lente. En conséquence, des particules insolubles peuvent rester dans la région alvéolaire pendant des centaines de jours ou plus. Les particules hautement solubles peuvent se dissoudre en quelques minutes après le dépôt (C.-S. Wang, 2005).

Ainsi malgré le mécanisme de la clairance muco-ciliaire permettant d'épurer les voies respiratoires, la rétention de particules au sein des poumons est mise en évidence chez des personnes vivant dans des villes polluées (Brauer et al., 2001). Cette étude

montre que chez des personnes vivant à Mexico, exposées à une concentration moyenne annuelle de $66 \mu\text{g}/\text{m}^3$ de PM_{10} , les concentrations en particules dans les poumons sont nettement supérieures à celles retrouvées dans les poumons de personnes vivant à Vancouver et exposées à de faibles niveaux de PM_{10} ($14 \mu\text{g}/\text{m}^3$). La même équipe a montré que la paroi des voies respiratoires des personnes ayant vécu longtemps dans la ville de Mexico était beaucoup plus fibreuse et plus riche en muscle lisse comparé aux poumons des personnes vivant à Vancouver (Churg et al., 2003).

Des études *in vitro* ont pu confirmer la biopersistence des particules dans l'épithélium respiratoires et des perturbations structurales et fonctionnelles de celui-ci. Par exemple des particules de diesel (DEP) et des $\text{PM}_{2.5}$ ont été retrouvées 5 semaines après expositions de NHBE différenciées (Boublil et al., 2013). Les particules étaient incluses dans des vésicules situées dans le cytoplasme en apical suggérant une exocytose (Boublil et al., 2013). De même, après 3h d'exposition à des nanoparticules (NP) d'oxyde de cuivre et de TiO_2 (Moschini et al., 2013) ou après 24h à des DEP (Mazzarella et al., 2007) ou après 1h à des NP de plastique (M. Xu et al., 2019), les particules ont été retrouvées dans des vésicules au niveau du cytoplasme ou du noyau de cellules A549. L'internalisation après expositions aux $\text{PM}_{2.5}$ sur le modèle BEAS-2B a entraîné des altérations morphologiques cellulaires telles qu'un changement de forme en fuseau et la formation de trous paracellulaires (Dornhof et al., 2017). Les particules sont capables également de causer des dommages structurels et fonctionnels aux mitochondries (X. Jin et al., 2018; N. Li, Sioutas, et al., 2003). Des perturbations de l'intégrité membranaire sont observées après 3h d'exposition à des PM_{10} et des DEP sur le modèle A549, notamment une dissociation de ZO-1 et une internalisation de l'occludine (Caraballo et al., 2011). Après 24h d'exposition de cellules BEAS-2B à des microparticules de plastique (10 ou $1000 \mu\text{g}/\text{m}^2$), une diminution de l'expression de ZO-1 et une réduction de la TEER chez les BEAS-2B ont été observées (Dong et al., 2020). Le stress oxydant a été démontré comme inducteur de la phosphorylation de ZO-1 et ainsi perturbant les jonctions serrées (Sethi et al., 2019). De plus, une perte de l'intégrité de la barrière épithéliale apparaît comme une étape clé dans le développement de la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) (Sethi et al., 2019). Enfin, le remodelage de l'épithélium tel que la fibrose, la distorsion des petites voies respiratoires et l'hyperplasie musculaire en association avec une accumulation de particules dans la paroi bronchique ont été

identifiés dans les poumons de femmes chroniquement exposées aux PM (Churg et al., 2003).

3.3.2 Stress oxydant

De nombreuses études ont montré que les effets délétères des particules sur la cible respiratoire sont causés par un stress oxydant et une inflammation (H. Chen et al., 2022; Falcon-Rodriguez et al., 2016). Le stress oxydant est défini comme étant « un déséquilibre entre les systèmes oxydants et les défenses antioxydantes, en faveur des oxydants, conduisant à une perturbation de la signalisation et du contrôle redox et/ou à des dommages moléculaires » (Sies 2015). Le stress oxydant résulte d'une production accrue d'ERO ou d'une diminution des défenses antioxydantes ou des deux simultanément (Møller et al., 2014). À l'état physiologique, ces ERO sont produits majoritairement par la chaîne mitochondriale respiratoire mais aussi par les monoamines oxydases (MAOs), les CYP450 ou encore la NAD(P)H oxydase et par les cellules phagocytaires du système immunitaire inné telles que les macrophages alvéolaires et les polynucléaires neutrophiles (Valavanidis et al., 2013). Ils régulent des processus de signalisation pour le métabolisme, le cycle cellulaire, les systèmes redox cellulaires ou encore les mécanismes de mort cellulaire (Brookes et al., 2002; Thannickal & Fanburg, 2000). À des concentrations élevées, les ERO sont dangereux pour les organismes vivants et peuvent causer des dommages oxydatifs à tous les principaux constituants cellulaires tels que les lipides membranaires, les protéines ou l'ADN (Migdal & Serres, 2011). Parmi les ERO, on retrouve des espèces radicalaires très réactives comme l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) et le radical hydroxyle ($^{\bullet}OH$) ainsi que des molécules non radicalaires comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2).

Les particules peuvent générer un stress oxydant à travers trois voies interdépendantes (Niemann et al., 2017) (**Figure 17**) :

1. Génération spontanée d'ERO par les particules sans interaction avec les tissus biologiques. Les ERO peuvent être produits par des réactions redox entre les différents composés de la surface des particules.

2. Induction par les particules du relargage de cytokines et de médiateurs oxydants par activation des cellules inflammatoires tels que les macrophages (**partie 3.3.3**).
3. Génération d'ERO par des interactions entre les particules et la cellule : activation d'enzymes pro-oxydantes et diminution des défenses antioxydantes.

Ces trois voies peuvent être stimulées par les particules elles-mêmes, à travers la libération de constituants solubles, ou par des réactions chimiques intermédiaires de différents constituants avec les fluides biologiques.

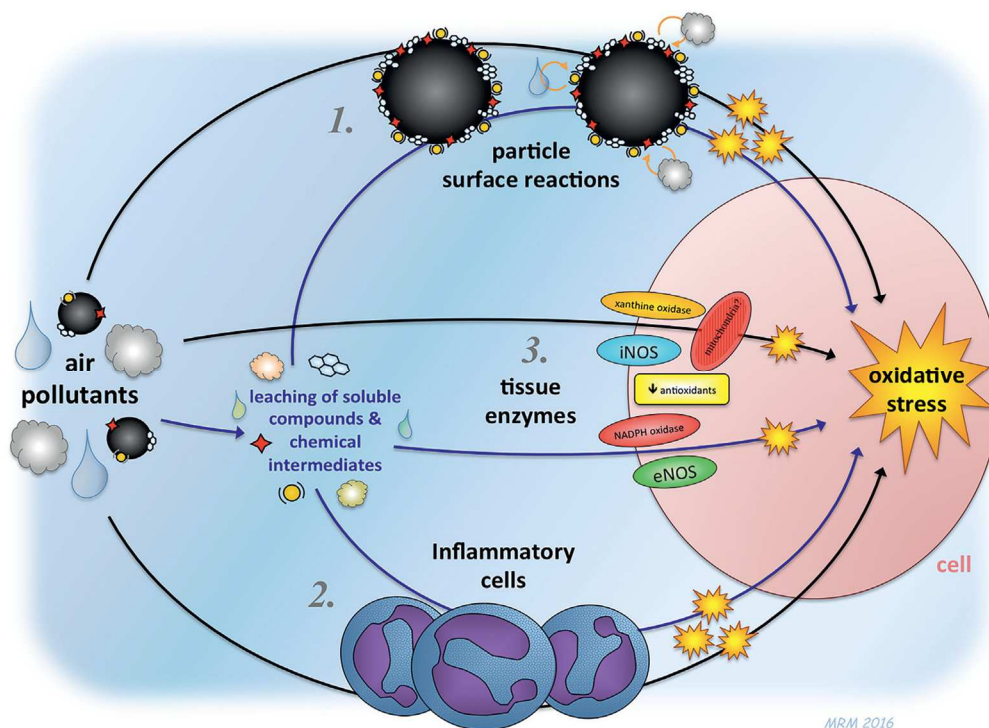


Figure 17. Mécanismes des particules pouvant causer un stress oxydant. D'après (Niemann et al., 2017).

Lorsqu'il y a une production accrue d'ERO, deux voies de signalisation impliquées dans l'induction des défenses antioxydantes sont activables par les particules, la voie du facteur nucléaire à l'érythroïde-2-like-2 (Nrf-2) et celle du récepteur aryl hydrocarbène (AhR) (Pardo et al., 2020) (**Figure 17**). Les gènes cibles antioxydants sont, entre autres, les superoxydes dismutases (SOD), la catalase (CAT), les glutathions peroxydases (GPx), l'hème-oxygénase-1 (HO-1) et la NAD(P)H quinone oxyréductase (NQO-1) (Gangwar et al., 2020). Lors d'un changement de l'état de l'homéostasie rédox, Nrf-2 initialement lié à Keap-1 dans le cytosol transloque dans le noyau pour se fixer à des éléments de réponses antioxydants (ARE) activant en partie la transcription de gènes cibles protecteurs contre

le stress oxydant. Une exposition aux métaux hydrosolubles présents dans des particules tels que le Fe, le Zn et le Cu peuvent induire une réponse antioxydante dépendante de l'activation de la voie Nrf-2 (Lovera-Leroux et al., 2015; Pardo et al., 2015, 2016; H. Zhang et al., 2012). Le mécanisme d'activation résulte de la formation d'ERO par les métaux, comme le Fe via la réaction de Fenton qui produit l'espèce radicalaire la plus délétère du stress oxydant, $\cdot\text{OH}$ (Li et al. 2003). Des composés comme les HAP sont capables de se fixer au AhR et d'induire sa translocation dans le noyau pour se fixer sur des éléments de réponses aux xénobiotiques (XRE) conduisant à la transcription des gènes de phase I du métabolisme des xénobiotiques et des gènes protecteurs contre le stress oxydant (Stevens, Mezrich, et Bradfield 2009) (**Figure 18**).

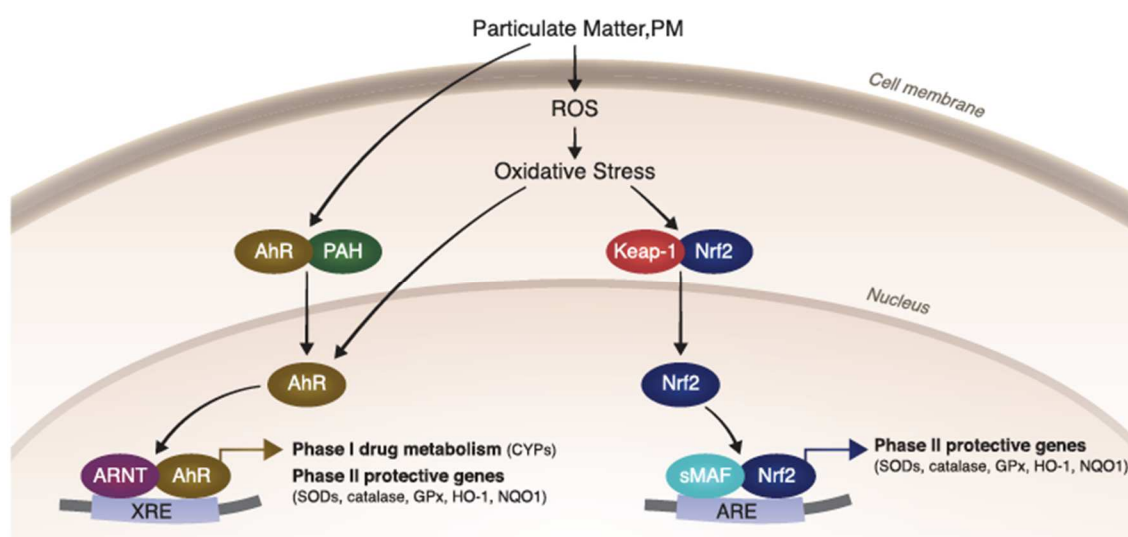


Figure 18. Activation des voies AhR et Nrf-2 par les particules. D'après Pardo et al. 2020.

L'activation des enzymes de phase I telles que les cytochromes P450 (CYP) métabolisent souvent les HAP en quinones puis en semiquinones (Moorthy et al., 2015; Valavanidis et al., 2013). Lorsque les semiquinones sont réduites à nouveau en quinones dans un processus appelé cycle redox des quinones, une production excessive d'ERO peut être générée (Zheng et al., 2020). La **Figure 19** illustre le cycle redox des quinones de HAP représentatifs de DEP tels que le naphtalène, le B(a)P, le phénanthrène et l'anthracène (N. Li, Hao, et al., 2003). L'induction de l'expression du CYP450 1A1 par le AhR va réduire le HAP en quinone, libérant un électron qui entraîne la formation de semiquinones. Le recyclage des semiquinones en quinones par la NADPH cytochrome P450 reductase conduit à la formation d' $\text{O}_2^{\cdot-}$.

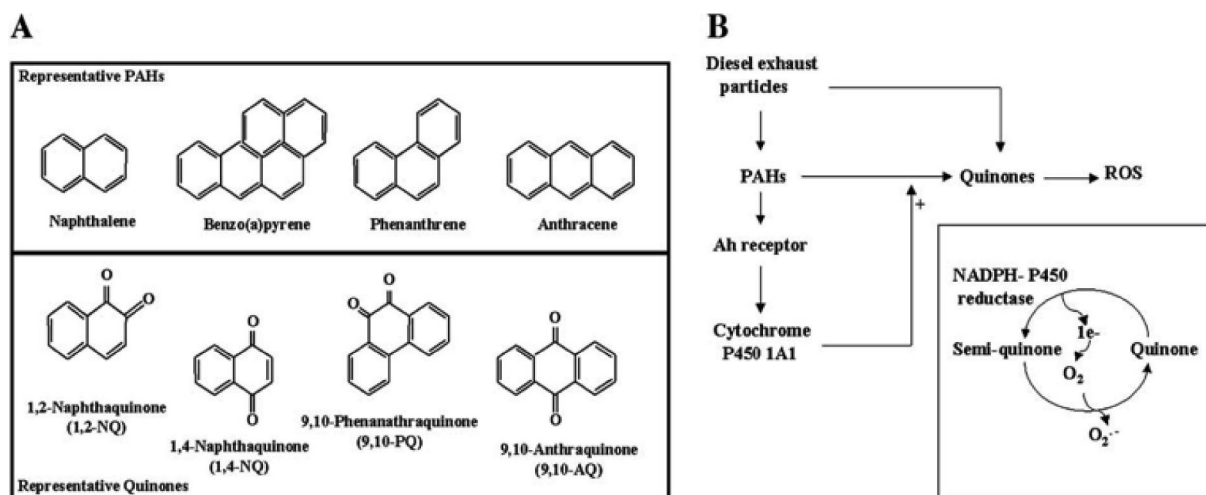


Figure 19. Cycle rédox des quinones à partir des composés organiques. (A) HAP représentatifs et quinones correspondantes. (B) Schéma réactionnel de la métabolisation des HAP en quinone et cycle de recyclage des quinones. D'après (N. Li, Hao, et al., 2003).

Pour maintenir l'équilibre rédox cellulaire lors d'une production excessive d'ERO, l'organisme dispose d'un ensemble complexe de défenses antioxydantes enzymatiques inductibles par les voies décrites ci-dessus, et des défenses non enzymatiques telles que le glutathion réduit (GSH) et des vitamines comme l'acide ascorbique (AA).

De nombreuses études montrent qu'une exposition à différents types de particules induit une augmentation de la production d'ERO et une diminution des défenses antioxydantes. Les **SOD** sont les premières lignes de défenses contre le stress oxydant, elles assurent toutes la dismutation d' $O_2^{\bullet-}$ en H_2O_2 (N. Li, Hao, et al., 2003). Par exemple, une exposition de 24h à 48h à des $PM_{2.5}$ d'origine industrielle (Fe et acier) ou urbaines cause une augmentation des ERO et une diminution des expressions géniques et protéiques des SOD-1 et SOD-2 ainsi qu'une diminution de leurs activités dans des cellules A549 (Deng, Zhang, et al., 2013 b), des cellules nasales (Hong et al., 2016) ou dans des cellules endothéliales pulmonaires (Cui et al., 2020). De même, des DEP sont capables de générer des ERO et de diminuer les expressions géniques des SOD après 2h d'exposition dans des cellules BEAS-2B (Seriani et al., 2016).

La **catalase** est une enzyme impliquée dans la réduction de l' H_2O_2 en H_2O (N. Li, Hao, et al., 2003). Son expression ou son activité est également diminuée après exposition aux particules en lien avec une augmentation des ERO (Chirino et al., 2010; Deng, Zhang, et al., 2013; Hong et al., 2016). Les **glutathions peroxydases** catalysent également la

réduction de l'H₂O₂ en H₂O mais aussi la réduction des peroxydes d'origine lipidique en présence de GSH.

Une surproduction d'ERO et une surexpression des enzymes **HO-1** et **NQO-1** dans des cellules pulmonaires exposées au DEP, aux PM_{2.5} ou aux particules ultrafines est observée (Baulig et al., 2009; Crobeddu et al., 2017; Deng, Rui, et al., 2013; Frias et al., 2020; Juarez-Facio et al., 2022; N. Li, Sioutas, et al., 2003; Niu et al., 2020; Pardo et al., 2015).

Le **GSH** est un antioxydant non enzymatique constitué d'un groupements thiol (-SH), aux propriétés réductrices qui permet de piéger des ERO conduisant à l'oxydation du GSH en GSSG. Ainsi, le ratio GSH/GSSG est un très bon indicateur du stress oxydant (Araujo & Nel, 2009). Une diminution du ratio GSH/GSSG est observée dans des cellules BEAS-2B et NHBE après exposition à des DEP (N. Li et al., 2002), à des PM₁₀ (Chirino et al., 2010) dans des cellules A549, à des PM_{2.5} dans des cellules BEAS-2B (C. Zhao et al., 2020) et 16HBE (Niu et al., 2020) et chez la souris (Pardo et al., 2015).

Les **acides ascorbique et urique** sont des antioxydants présents dans la couche périciliaire pulmonaire (Haleng et al., 2007). Ce sont des piègeurs de •OH, d'O₂•⁻ et du radical peroxy ROO•. L'acide ascorbique joue également un rôle dans la protection contre la formation des peroxydes lipidiques, en régénérant la vitamine E à partir de la forme radicalaire produite par sa réaction avec les radicaux lipidiques (Haleng et al., 2007).

Lorsque les systèmes antioxydants sont dépassés, des concentrations élevées d'ERO peuvent causer des dommages oxydatifs à tous les principaux constituants cellulaires tels que les lipides, les protéines ou l'ADN (Migdal & Serres, 2011; Valavanidis et al., 2013). La détection de marqueurs de génotoxicité, telles que des bases oxydées de l'ADN ou d'adduits encombrants, a été documentée dans des études de biosurveillance chez l'homme et a conduit à une association positive entre particules et dommages à l'ADN (Bräuner et al., 2007; Vinzents et al., 2005). La formation d'adduits à l'ADN et la formation de 8-hydroxy-2'-déoxyguanosine (8-OH-dG), un marqueur de dommages à l'ADN, ont été mises en évidence *in vitro* après exposition à des particules urbaines et industrielles (André et al., 2010; Vattanasit et al., 2014). Ces lésions à l'ADN ou à d'autres biomolécules peuvent conduire à une mort cellulaire par apoptose, autophagie ou nécrose après exposition à différents types de particules (Deng, Zhang, et al., 2013; Durga et al., 2014; Thannickal & Fanburg, 2000; Upadhyay & Palmberg, 2018).

3.3.3 Inflammation

Dans la **partie 3.3.2**, il a été montré que les particules induisent un stress oxydant à travers divers mécanismes. L'un de ces mécanismes est la capacité des particules à induire une inflammation directe du tissu pulmonaire par activation des macrophages et/ou des neutrophiles qui vont augmenter la production d'ERO et participer au stress oxydant (Losacco & Perillo, 2018). En réponse à ce stress, les cellules épithéliales bronchiques vont produire des cytokines pro-inflammatoires pouvant entraîner une inflammation aiguë (C.-C. Cho et al., 2018). Ainsi, la relation entre le stress oxydant et l'inflammation est complexe et semble avoir des effets synergiques (**Figure 20**) (H. Chen et al., 2022).

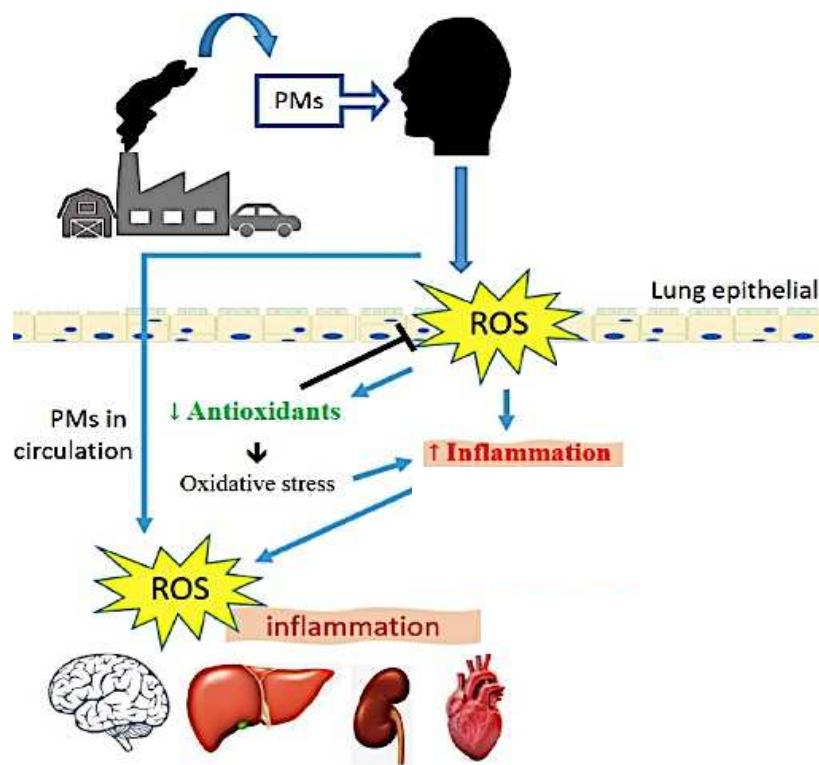


Figure 20. Représentation schématique du stress oxydant et de l'inflammation induits par une exposition aux particules au niveau de l'appareil respiratoire et des autres organes vitaux auxquels les particules ou les composés désorbés accèdent via la circulation sanguine. Adapté de (H. Chen et al., 2022).

La réponse inflammatoire pulmonaire est caractérisée par une variété de médiateurs qui sont sécrétés par les macrophages alvéolaires et les cellules épithéliales. Les cellules épithéliales des voies respiratoires humaines produisent des cytokines chimio attractives dont le rôle est de stimuler la migration des cellules inflammatoires vers le site de l'agression, telles que l'interleukine-8 (IL-8), la chimiokine des monocytes

1 (MCP-1) ou CCL5/RANTES (Mills et al., 1999). L'IL-8 est synthétisée et libérée en grande quantité par les cellules épithéliales respiratoires et est l'un des plus puissants activateurs et médiateurs des neutrophiles. Les cellules épithéliales sécrètent également des cytokines multifonctionnelles comme l'interleukine-1 β (IL-1 β), l'interleukine-6 (IL-6), l'interleukine-11 (IL-11) et le facteur de nécrose tumorale (TNF- α) (Mills et al., 1999). Celles-ci ont des effets pro-inflammatoires pléiotropes sur une variété de cellules cibles, notamment l'activation des lymphocytes-B et des monocytes. Ainsi, de nombreuses études ont montré que des expositions à différents types de particules telles que les DEP, PM₁₀, PM_{2.5} ou PM_{0.1} induisent l'expression et/ou la sécrétion d'IL-6, d'IL-8, d'IL-1 β ou de TNF- α dans des cellules épithéliales bronchiques (Bengalli et al., 2019; Dieme et al., 2012; Holder et al., 2008; Juarez-Facio et al., 2022; Luo et al., 2021; Son et al., 2020; Totlandsdal et al., 2010; Vattanasit et al., 2014).

L'inflammation est souvent associée à des modifications structurelles de l'épithélium. Par exemple, certaines cytokines comme le TNF- α associé à l'IFN- γ peuvent induire des modifications de la localisation des protéines des jonctions serrées conduisant alors à une perte de l'intégrité de l'épithélium (Coyne et al., 2002). Il a été montré qu'une exposition de cellules NHBE différenciées à des particules de l'air intérieur en mode pseudo-IAL modifiait l'expression de plusieurs gènes, notamment des gènes impliqués dans la réponse immunotoxique (Nordberg et al., 2020). Les résultats de cette étude montrent également des modifications de l'épithélium tels que la présence de lacunes entre les couches de cellules et des pertes d'adhésion des cellules entre elles sans pour autant qu'il y ait de modification de la fonction de barrière (Nordberg et al., 2020).

L'inflammation est donc un mécanisme majeur expliquant la toxicité des particules or elle est impliquée dans le développement de pathologies respiratoires telles que l'asthme, la BPCO et la fibrose, souvent associées à des modifications de l'épithélium (Falcon-Rodriguez et al., 2016). Par ailleurs, de telles réponses ne se limitent pas aux poumons mais se produisent également dans d'autres organes. Les particules peuvent activer le système rédox et le système inflammatoire à un niveau systémique conduisant à un dysfonctionnement de plusieurs organes, y compris le cerveau, le système cardiovasculaire, les reins et le foie (**Figure 20**) (H. Chen et al., 2022; Gangwar et al., 2020).

L'ensemble de ces travaux montre que les particules de diverses origines induisent une production d'ERO associée à une diminution des défenses antioxydantes conduisant à un stress oxydant et à une inflammation de l'épithélium pulmonaire. Ainsi, la toxicité des particules d'origine pyrotechnique pourrait être médiée par les mêmes mécanismes que ceux précédemment décrits.

3.4 Potentiel oxydant des particules

L'induction d'un stress oxydant par les particules est le principal mécanisme de toxicité à l'origine d'effets néfastes sur la santé. Par conséquent de nombreuses équipes ont étudié une métrique d'exposition biologique pertinente, le potentiel oxydant (PO), comme outil prédictif d'effets sur la santé et de réponses cellulaires aux particules. Le PO est défini comme la capacité des particules ou des composés liés aux particules à générer des ERO, ou à oxyder des substrats cibles tels que des antioxydants, mesurables dans des conditions acellulaires (Caumo et al., 2022; Øvrevik, 2019). En effet, les espèces chimiques rédox actives présentes dans les particules, de nature organique et inorganique, facilitent la génération des ERO (**partie 3.3**). Depuis quelques années, la mesure du PO des particules semble être un indicateur de toxicité plus pertinent que les outils de mesures plus conventionnels reposant sur la concentration massique ou sur la concentration en nombre (Bates et al., 2019; Daellenbach et al., 2020; Sarnat et al., 2016). Le PO présente l'avantage d'intégrer les propriétés physico-chimiques des particules (composition chimique, surface spécifique, granulométrie). Actuellement, il existe de nombreuses méthodes acellulaires pour mesurer le PO des particules :

- Mesure de la déplétion en antioxydants tels que l'acide ascorbique (AA) et le glutathion réduit (GSH), dans un fluide de revêtement des voies respiratoires (RTLf) synthétique
- Test du dithiothréitol (DTT)
- Méthodes de fluorimétrie avec des sondes à base de fluorescéine telles que la 2',7'-dichloro-dihydrofluorescéine (DCFH)
- La résonance paramagnétique électronique (RPE).

Comparé aux tests cellulaires pour mesurer le stress oxydant, les méthodes acellulaires présentent les avantages d'être non invasives, rapides, peu coûteuses, faciles à mettre en oeuvre et adaptées à l'automatisation.

La mesure du PO par ces différentes méthodes conduit à une grande variation de résultats selon le test utilisé pour un même type de particules. En effet, certains tests ont la capacité de mesurer l'ensemble des ERO, des ERO spécifiques, d'autres espèces réactives ou encore l'oxydation d'antioxydants (Øvrevik, 2019). De plus, les tests ont des sensibilités variables à l'égard des différents constituants chimiques des particules (Bates et al., 2019) ainsi que de leur taille (An et al., 2022; Khoshnamvand et al., 2022). Les différentes sources de particules contribuent également à la variabilité des réponses entre les tests. Par exemple, des corrélations entre les sources de combustion de trafic « hors échappement » et le PO^{AA} de PM_{2.5} a été montré tandis que les émissions des particules provenant de sites de sidérurgie, de la combustion de fioul et des émissions non polluantes du trafic contribuent de manière significative au PO^{DTT} (Moufarrej et al., 2020). Ainsi, afin de prendre en considération au mieux l'ensemble des espèces pouvant contribuer au PO des particules et d'évaluer leur toxicité globale, il est nécessaire d'utiliser plusieurs méthodes de mesure du PO (Conte et al., 2017; Fang et al., 2016; Janssen et al., 2014). Les tests du DTT et de la déplétion en antioxydants sont les méthodes les plus couramment utilisées et sont très complémentaires puisqu'ils ne sont pas sensibles aux mêmes espèces chimiques et sources de particules (Caumo et al., 2022; Moufarrej et al., 2020).

3.4.1 Test de déplétion des antioxydants dans le RTLF

Le RTLF représente la première interface chimique ou zone de contact que rencontre les particules inhalées. Le RTLF riche en antioxydants, tels que l'AA, le GSH et l'urée (Ayres et al., 2008) a un rôle protecteur crucial des voies respiratoires protégeant les poumons contre des dommages oxydatifs. Il existe plusieurs variantes de ce test, soit AA et GSH, soit AA seul, soit avec ajout d'urée (Gao et al., 2020). La déplétion des antioxydants reflète la mesure directe de l'activité oxydante des particules. Le test de déplétion en AA et GSH repose sur la quantification des concentrations finales en antioxydants après incubation des particules dans un RTLF synthétique contenant des concentrations physiologiques en AA et en GSH à 200 µM, à pH 7,0 (Zielinski et al., 1999).

Cette méthode apparaît plus sensible aux métaux qu'aux composés organiques. En effet dans la littérature, il est rapporté que le Fe (Ayres et al., 2008; Gao et al., 2020; Godri et al., 2011), le Cu (Janssen et al., 2014; Visentin et al., 2016) ainsi que le Pb, le Zn et le Mg (Bates et al., 2019) oxydent l'AA. La déplétion du GSH serait exclusivement attribuée au Cu (Ayres et al., 2008; Gao et al., 2020) mais aussi dans une moindre mesure à l'Al et au Fe (Godri et al., 2010) ainsi qu'au Pb (Godri et al., 2011). Par ailleurs, la spéciation des métaux joue un rôle important dans la mesure du PO. Par exemple, la réactivité des différents états d'oxydation du Fe est significativement différente dans l'oxydation de l'AA, avec le Fe (III) qui serait plus réactif que le Fe (II) (Gao et al., 2020).

À ce jour, il semblerait qu'une seule étude se soit intéressée au PO de particules provenant d'activités pyrotechniques et aux associations avec leur composition chimique (Godri et al., 2010b). Le PO a été mesuré par le test de déplétion en antioxydants (AA et GSH) et a été comparé à celui généré par des particules émises par le trafic routier. Les résultats de cette étude montrent que les particules de feux d'artifices induisent une plus forte déplétion du GSH que les particules du trafic routier et que seul l'AA est oxydé par les particules du trafic routier. Les métaux des particules du trafic routier (Ba, Mo, Fe, Cu) et des feux d'artifices (Pb, Sr) sont associés à la déplétion du GSH. Les métaux des particules du trafic routier excepté le Cu sont également associés à la déplétion de l'AA. Cette étude met en évidence toute la complexité de la mesure du PO, avec des sensibilités aux tests très différentes en fonction de la composition chimique des particules.

La déplétion en AA semble généralement ne pas être associée positivement à des effets sur la santé (Atkinson et al., 2016; Canova et al., 2014; Fang et al., 2016; Tonne et al., 2012) contrairement à celle en GSH. Weichenthal et al., 2016 ont mené une longue étude de cohorte (1991- 2009), sur l'association causale entre le PO de PM_{2.5} ambiants collectées sur une trentaine de sites et la mortalité dans la région d'Ottawa, Canada. Des corrélations entre le PO^{GSH} et le développement de cancer du poumon et la mortalité cardiométabolique ont été observés. Une autre étude rapporte une association positive entre le PO^{GSH} de PM_{2.5} et un biomarqueur de l'inflammation des voies respiratoires impliqué dans l'asthme infantile (fraction expirée d'oxyde nitrique) (Maikawa et al., 2016). Cependant, le caractère prédictif du PO^{GSH} est discutable puisque d'autres auteurs n'ont pas retrouvé d'association avec des effets sanitaires (Strak et al., 2012). Concernant

les réponses cellulaires, il est retrouvé des associations entre les déplétions de l'AA et du GSH et la formation d'ERO intracellulaires (Crobeddu et al., 2017; He et al., 2018).

3.4.2 Test du dithiothréitol (DTT)

Le dosage du DTT permet de mesurer la capacité des particules/composés rédox actifs adsorbés sur les PM à transférer des électrons du DTT à l'oxygène générant des radicaux superoxydes (Fang et al., 2015). Le DTT agit comme un substitut des agents réducteurs biologiques tels que le NADH ou le NADPH (Calas et al., 2018). La **Figure 21** présente le schéma réactionnel de l'oxydation du DTT. Dans un premier temps (**Fig 21.a**), le DTT est oxydé par des espèces actives rédox adsorbés sur les particules pour donner sa forme disulfure qui donne un électron à l'oxygène moléculaire dissous, formant $O_2^{\bullet-}$. L' $O_2^{\bullet-}$ peut se transformer en H_2O_2 et en O_2 . Le taux de DTT-disulfure formé est proportionnel à la concentration d'ERO dans l'échantillon, lorsque le DTT est ajouté en excès dans la réaction. Dans la deuxième étape (**Fig 21.b**), le DTT restant réagit avec du DTNB (acide 5,5-dithiobis(2-nitrobenzoïque)) pour générer du DTT-disulfure et du TNB (2-nitro-5-thiobenzoïque) qui est l'espèce «colorée» mesurée par spectrophotométrie.

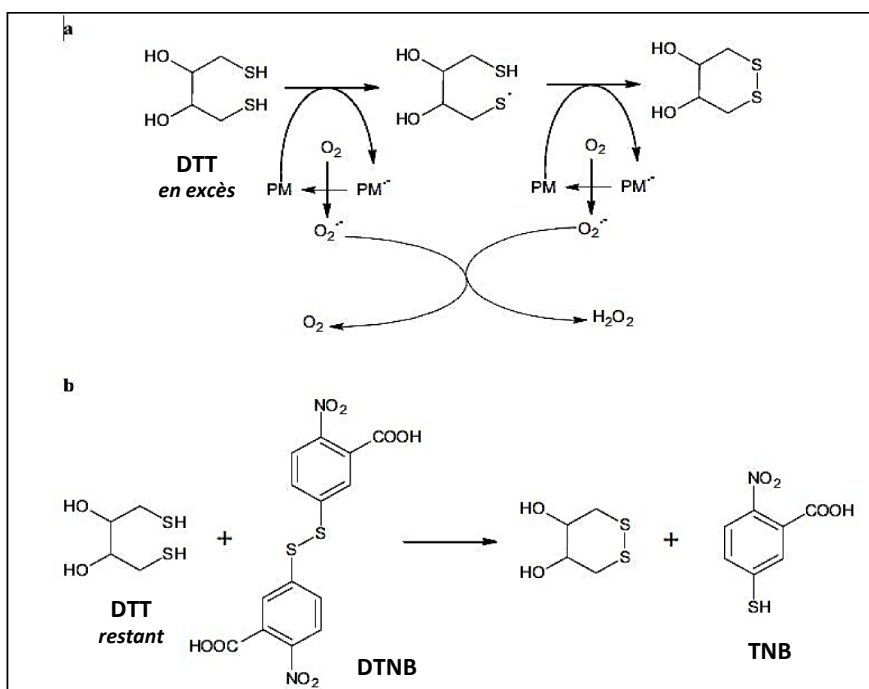


Figure 21. Oxydation du dithiothréitol (DTT) par des espèces actives rédox dans les particules avec ensuite formation d'ERO. b. Réaction du DTT avec l'acide 5,5' dithiobis(2-nitrobenzoïque) (DTNB). D'après (Visentin et al., 2016)

Cette méthode consiste généralement à mesurer la consommation du DTT en fonction du temps mais elle peut être réalisée en point final après un temps donné. Le taux de consommation du DTT est proportionnel à la concentration d'espèces redox-actives formées dans l'échantillon de particules.

La sensibilité de cette méthode a été étudiée par Charrier & Anastasio, 2012, en testant différents composés redox actifs généralement présents sur des PM_{2.5} d'origines urbaines et rurales. Les résultats de cette étude montrent que le DTT est particulièrement sensible aux métaux de transition, notamment le Cu et le Mg mais aussi à d'autres métaux tels que le Co, le V, le Ni et le Pb. Le Fe oxyde faiblement le DTT mais ses concentrations dans les particules sont souvent très élevées, suggérant une forte contribution à sa déplétion. Concernant les composés organiques, les quinones sont bien plus réactives que les métaux, notamment la phénanthrènequinone, la 1,2 naphthoquinone et la 1,4-naphthoquinone. Il semblerait que les HAP ne soient pas des composés redox actifs. Enfin, selon cette étude, les métaux étant généralement en plus fortes concentrations dans les PM_{2.5}, ils contribueraient à 80% de la déplétion du DTT alors que les quinones compteraient pour 20%. La sensibilité du test DTT pour les métaux et les quinones est largement décrite dans la littérature (Calas et al., 2018; A. K. Cho et al., 2005; Crobeddu et al., 2017; Fang et al., 2016; Gao et al., 2020; Moufarrej et al., 2020; Verma et al., 2015).

La détermination du PO mesuré par le test du DTT (PO^{DTT}) semble être prédictive d'effets sur la santé ou de réponses cellulaires. Par exemple, le PO^{DTT} est retrouvé positivement associé à une augmentation des visites aux urgences pour de l'asthme et de l'insuffisance cardiaque (Bates et al., 2015; Fang et al., 2016), à une augmentation de l'incidence et de la prévalence de symptômes asthmatiques et de rhinites chez des enfants suivis depuis la naissance jusqu'à leurs 14 ans (Yang et al., 2016). On retrouve également une association positive avec le développement d'une inflammation des voies respiratoires chez des jeunes sujets asthmatiques (Delfino et al., 2013; Janssen et al., 2015).

De même, des études de toxicité *in vitro* montrent que le PO^{DTT} de particules atmosphériques semble être un bon outil prédictif de cytotoxicité (Steenhof et al., 2011), de formation d'ERO (Crobeddu et al., 2017; Delfino et al., 2013) et de l'induction de l'expression de gènes, tels que le *TNF-α* (Karavalakis et al., 2017; Q. Liu et al., 2014) ou

HO-1 (Crobeddu et al., 2017; Karavalakis et al., 2017). L'équipe de Crobeddu et al., 2017 montre également une corrélation entre la déplétion du DTT et l'augmentation de l'expression des gènes *IL-6*, *SOD-1* et *CYP1A1*.

3.4.3 Autres méthodes de mesures du PO

Deux autres techniques sont très répandues pour mesurer le PO des particules et plus particulièrement la formation de radicaux libres. La RPE permet de mesurer la production de $\text{HO}^\bullet$ par piégeage avec le 5,5-diméthyl-pyrroline-N-oxyde (Shi et al., 2003). La mesure du PO par RPE apparaît sensible aux métaux (Gao et al., 2020), notamment le Cu et le Fe, le Ba, le Mn, le Ni, le V (Janssen et al., 2014; Künzli et al., 2006). Cette méthode ne semble pas avoir ou uniquement de faibles associations avec des réponses biologiques et des effets sanitaires (Øvrevik, 2019).

Des méthodes de fluorimétrie utilisant la sonde 2',7'-dichlorodihydrofluorescéine (DCFH) permet également de mesurer le PO des particules. Cette méthode peut détecter de nombreux radicaux libres ($\text{NO}_2^\bullet$, $\text{HO}^\bullet$, ONOO^- , H_2O_2 etc...) (Øvrevik, 2019) qui vont oxyder la sonde en un composé fluorescent la dichlorofluorescéine (DCF). Danielsen et al., 2011 rapporte que le PO de particules issues de la combustion du bois et les effets *in vitro* observés sur des cellules A549, tels que la production de ERO intracellulaires et la modulation de l'expression de divers gènes de l'inflammation ne sont pas corrélés. Une autre étude montre un manque de corrélation de cette méthode avec des effets cellulaires. Seule une faible corrélation (0,499) entre cette méthode de mesure du PO de $\text{PM}_{2.5}$ et une augmentation de l'expression du *CYP1A1* est rapporté (Crobeddu et al., 2017).

Bien qu'il existe un grand nombre d'études aux résultats contrastés sur l'apport de la mesure du PO de particules comme outil prédictif de leur toxicité, les tests de déplétion du DTT et en antioxydants (AA et GSH) semblent être les plus pertinents et les plus simples à utiliser. Ces deux méthodes permettent d'apporter des informations complémentaires sur le mécanisme d'action des particules ainsi que des informations sur les composés chimiques pouvant être impliqués dans leur toxicité.

Objectifs de la thèse

Les fumigènes s'inscrivent dans le cadre des activités pyrotechniques et induisent de nombreuses atteintes pulmonaires à des degrés de sévérités différentes. Les fumigènes sont largement utilisés dans le domaine militaire, pour la signalisation et le camouflage et dans une moindre mesure par les civils. Ces différentes utilisations sont liées en grande partie aux propriétés physico-chimiques des particules en suspension dans l'air qui caractérisent le nuage de fumée de chaque type de fumigène. Très peu d'études se sont intéressées à la toxicité par inhalation de la fraction particulaire des fumigènes contrairement aux particules de l'air ambiant qui sont connues pour être impliquées dans le développement de pathologies respiratoires. A ce manque de connaissance s'ajoute le fait que les compositions peuvent être très variables d'un fabricant à l'autre et que l'évaluation de la toxicité *in vivo* demeure contraignante et éthiquement discutable. Ainsi, **l'objectif général de ma thèse a été d'évaluer la toxicité respiratoire de particules issues de la combustion de fumigènes par des approches *in vitro*.**

Pour répondre à cet objectif, nous avons étudié la fraction particulaire d'un fumigène de signalisation de couleur rouge (RSS), d'un fumigène anti-intrusion (AIS) et d'un fumigène de camouflage à base d'hexachloroéthane (HC-OS), principalement utilisés dans un cadre militaire. De nombreuses études portant sur la toxicité des particules ambiantes, telles que les particules liées aux trafic routier, aux activités industrielles ou encore aux processus de combustion ont mis en évidence un mécanisme de toxicité ubiquiste, le stress oxydant. Trois axes de travail ont été définis :

- Évaluation de la toxicité des particules réalisée par la mesure de leur potentiel oxydant (PO), à l'aide de deux méthodes acellulaires différentes : la déplétion en antioxydants et le test du DTT
- Évaluation de la toxicité aiguë des particules par une approche *in vitro* impliquant l'utilisation de modèles de cellules primaires épithéliales trachéo-bronchiques (NHBE) et bronchiolaires (SAEC) cultivés à l'interface air liquide (IAL), représentatifs de l'épithélium respiratoire
- Étude de la toxicité des particules après des expositions répétées sur un modèle d'épithélium pseudo-stratifié mucociliaire (NHBE).

La stratégie expérimentale est résumée dans la **Figure 22**.

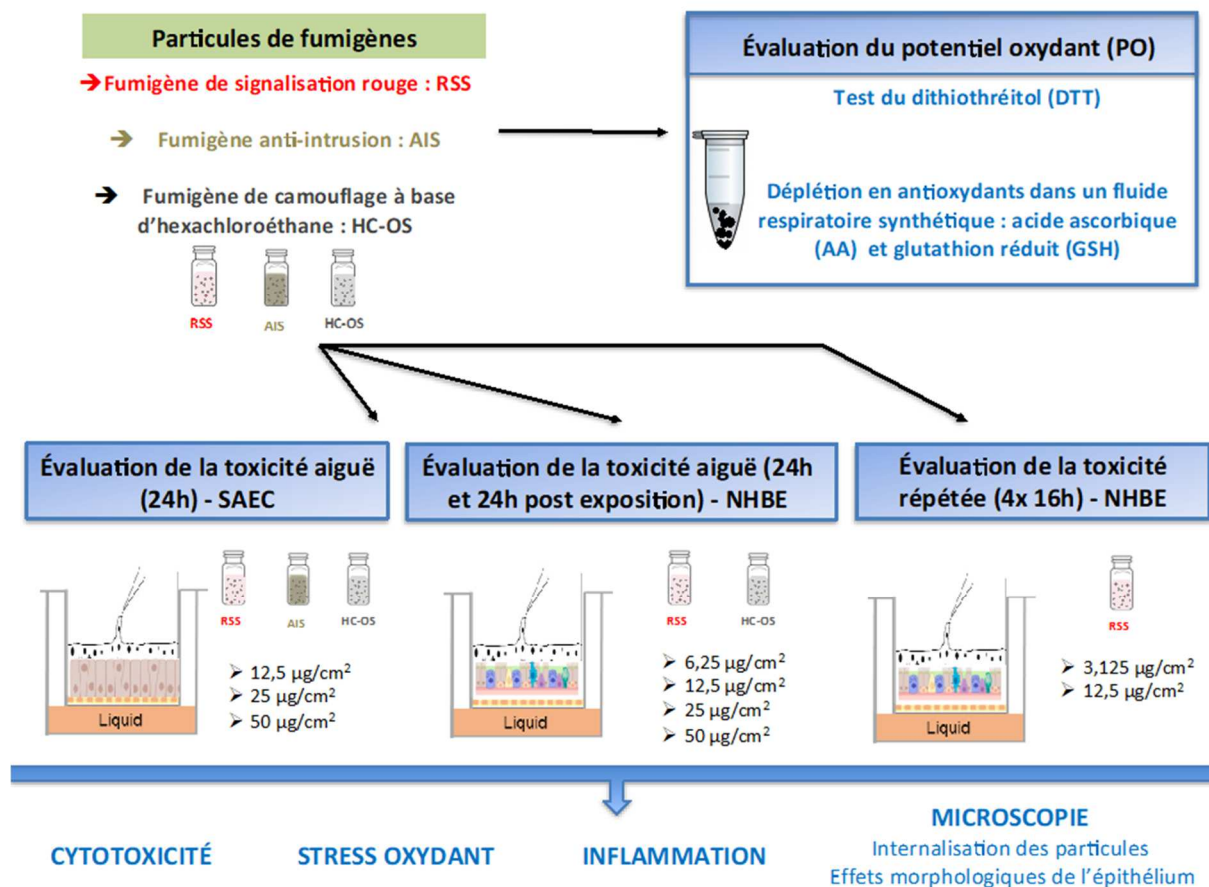


Figure 22 : Stratégie expérimentale

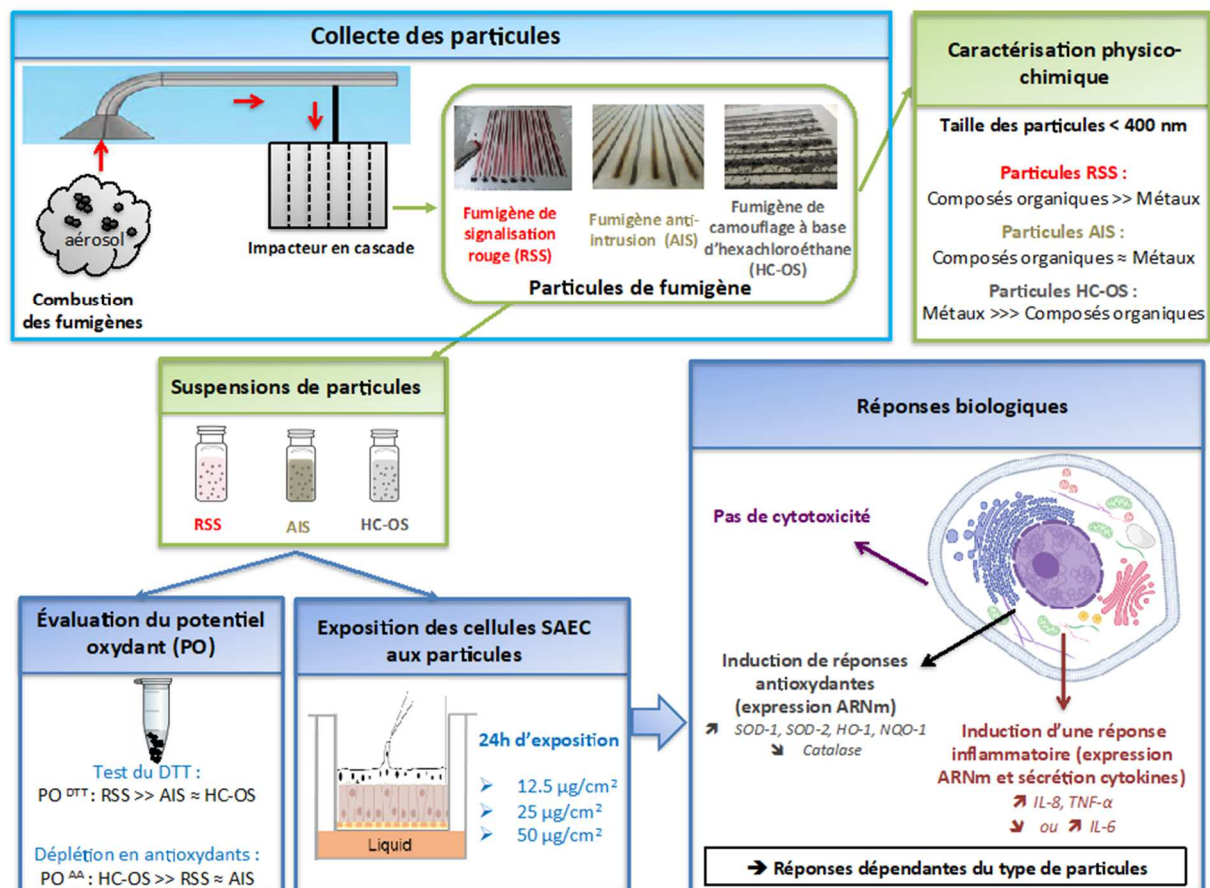
Résultats

1. Article 1

Oxidative potential and *in vitro* toxicity of particles generated by pyrotechnic smokes in human small airway epithelial cells

Violaine Martin de Lagarde, Tiphaine Rogez-Florent, Fabrice Cazier, Dorothee Dewaele, Francine Cazier-Dennin, Alexane Ollivier, Marion Janona, Sophie Achard, Véronique André, Christelle Monteil, Cécile Corbière

1.1 Résumé graphique



1.1 Contexte

Les fumigènes s'inscrivent dans le cadre des activités pyrotechniques et sont largement utilisés dans le domaine militaire, pour la signalisation et le camouflage et dans une moindre mesure par les civils. Hormis les risques d'explosion et d'incendie, la combustion de fumigènes conduit à l'inhalation de particules en suspension aux propriétés physico-chimiques complexes. Les risques sanitaires liés à leur exposition sont très peu documentés alors que la toxicité des particules issues de la pollution urbaine sur la cible respiratoire est très bien connue.

1.2 Objectifs

Cette étude a eu pour objectifs de caractériser les propriétés physico-chimiques de la fraction particulaire de différents fumigènes, d'évaluer leur potentiel oxydant et d'explorer leur toxicité *in vitro*. Les particules ont été récoltées après combustion d'un fumigène de signalisation de couleur rouge (RSS), d'un fumigène anti-intrusion (AIS) et d'un fumigène de camouflage à base d'hexachloroéthane (HC-OS). Le modèle de cellules épithéliales bronchiolaires SAEC cultivé à l'interface air-liquide (IAL) a été choisi pour cette étude.

1.3 Principaux résultats

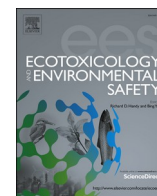
La caractérisation physico-chimique des particules révèle que la majorité des particules ont un diamètre inférieur à 400 nm, indiquant qu'elles peuvent pénétrer profondément dans l'appareil respiratoire et atteindre des régions distales. Les particules RSS présentent la fraction organique la plus élevée (quinones et hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) tels que des dérivés du naphthalène et de l'anthracène) des trois échantillons caractérisés et sont également riches en métaux (K (7,6 mg/g), Sb (3,4 mg/g), S et Ba (0,1 -1 mg/g)). Les particules AIS contenaient principalement du K (3,0 mg/g), Al, Na (0,1 -1 mg/g) et des composés organiques appartenant à la famille des triterpénoïdes. Les particules de HC-OS sont principalement métalliques avec des concentrations très élevées en Al (105,9 mg/g), Fe (12,1 mg/g), Ca (9,6 mg/g), K (1,8 mg/g) et Zn, Sn, Mg, S (0,1 -1 mg/g).

Le stress oxydant est le principal mécanisme de toxicité induit par les particules à l'origine du développement de pathologies respiratoires. Ainsi, de nombreuses études ont mesuré le potentiel oxydant (PO) de particules dans l'objectif de l'utiliser comme un outil prédictif d'effets sur la santé et de réponses cellulaires aux particules. Le PO est défini comme la capacité des particules ou des composés liés aux particules à générer des ERO, ou d'oxyder des substrats cibles tels que des antioxydants, mesurables dans des conditions acellulaires (Caumo et al., 2022; Øvrevik, 2019). Le PO des particules de fumigènes a été mesuré à l'aide de deux méthodes différentes en utilisant trois concentrations (70 ; 140 et 280 µg/ml) : la déplétion en antioxydants (acide ascorbique (AA) et glutathion (GSH)) dans un fluide respiratoire synthétique et le test du dithiotréitol (DTT). Les résultats de la déplétion en antioxydants ont montré que les particules ont oxydé uniquement à l'AA, avec une plus grande proportion des particules HC-OS à dépler l'AA. La mesure du PO par le test du DTT a montré que les particules RSS étaient les plus oxydantes alors que les particules AIS et HC-OS avaient des valeurs de PO similaires et inférieures à celles des particules RSS. Toutes les concentrations de particules ont induit une déplétion du DTT.

La toxicité *in vitro* a été évaluée par exposition des SAEC pendant 24h à diverses concentrations de particules (12,5 ; 25 et 50 µg/cm² correspondant à 70 ; 140 et 280 µg/ml). La viabilité cellulaire, mesurée par le test du MTT, n'a pas été affectée mais toutes les particules ont induit une réponse antioxydante avec des modifications significatives de l'expression des ARNm antioxydants (*SOD-1 et -2, catalase, HO-1, NQO-1*). Ces modifications varient en fonction de la concentration et du type de particule. Les particules RSS semblent induire une plus grande réponse oxydante au vu des ratios d'expressions nettement supérieures aux autres particules. L'expression génique et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires ont été analysées (*IL-6, IL-8, TNF-α*). Il en ressort que les particules HC-OS ont induit une réponse inflammatoire plus importante que les autres particules, marquée par des augmentations de l'expression des trois marqueurs étudiés à toutes les concentrations, avec des ratios d'expressions importants pour l'IL-8 ainsi que de la sécrétion de l'IL-6 et l'IL-8. Ainsi, les particules HC-OS riches en métaux ont induit une déplétion de l'AA et une plus grande réponse inflammatoire alors que les particules RSS riches en composés organiques ont induit une plus grande réponse antioxydante probablement en lien avec leur plus forte capacité à dépler le DTT.

1.4 Conclusion

En conclusion, les particules des trois types de fumigènes possèdent un potentiel oxydant montré par deux méthodes complémentaires. Les particules ont induit des réponses antioxydantes et inflammatoires avec une réponse cellulaire spécifique aux types de particules et suggérant une réponse adaptative puisqu'aucune cytotoxicité n'a été observée. Cette étude a permis d'améliorer les connaissances sur les propriétés physico-chimiques des particules de fumigènes et leur toxicité cellulaire. L'approche scientifique développée ici pourrait être utilisée pour étudier d'autres types de particules d'origine pyrotechnique.



Oxidative potential and in vitro toxicity of particles generated by pyrotechnic smokes in human small airway epithelial cells

Violaine Martin de Lagarde^a, Tiphaine Rogez-Florent^a, Fabrice Cazier^b, Dorothée Dewaele^b, Francine Cazier-Dennin^c, Alexane Ollivier^a, Marion Janona^a, Sophie Achard^d, Véronique André^a, Christelle Monteil^a, Cécile Corbière^{a,*}

^a Normandie Univ UNIROUEN, UNICAEN, ABTE, 14000 Caen, 76000 Rouen, France

^b Univ. Littoral Côte d'Opale, CCM - Centre Commun de Mesures, Dunkerque, France

^c Univ. Littoral Côte d'Opale, EA 4492 - UCEIV - Unité de Chimie Environnementale et Interactions sur le Vivant, SFR Condorcet FR CNRS 417, Dunkerque, France

^d Univ. de Paris, Faculté de Pharmacie, Inserm UMR1153 - CRESS, HERA "Health Environmental Risk Assessment", Paris, France

ARTICLE INFO

Edited by Dr Fernando Barbosa

Keywords:

Pyrotechnic smokes

Particles

Physico-chemical characterization

Oxidative Potential

Small Airway Epithelial Primary Cells

Toxicity

ABSTRACT

Pyrotechnic smokes are widely used in civilian and military applications. The major issue arise from the release of particles after smoke combustion but the health risks related to their exposure are poorly documented whereas toxicity of airborne particles on the respiratory target are very well known. Therefore, this study aimed to explore the in vitro toxicity of the particle fraction of different pyrotechnic smokes.

Particles from a red signalling smoke (RSS), an hexachloroethane-based obscuring smoke (HC-OS) and an anti-intrusion smoke (AIS) were collected from the cloud. RSS particles displayed the highest organic fraction (quinones and polycyclic aromatic hydrocarbons) of the three samples characterized. AIS particles contained K and cholesterol derivatives. HC-OS particles were mainly metallic with very high concentrations of Al, Fe and Ca. Intrinsic oxidative potential of smoke particles was measured with two assays. Depletions of DTT by RSS particles was greater than depletion obtained with AIS and HC-OS particles but depletion of acid ascorbic (AA) was only observed with HC-OS particles. *In vitro* toxicity was assessed by exposing human small airway epithelial cells (SAEC) to various concentrations of particles. After 24 h of exposure, cell viability was not affected but significant modifications of mRNA expression of antioxidant (*SOD-1* and *-2*, *catalase*, *HO-1*, *NQO-1*) and inflammatory markers (*IL-6*, *IL-8*, *TNF-α*) were observed and were dependent on smoke type. Particles rich in metal, such as HC-OS, induced a greatest depletion of AA and a greatest inflammatory response, whereas particles rich in organic compounds, such as RSS, induced a greatest DTT depletion and a greatest antioxidant response.

In conclusion, the three smoke particles have an intrinsic oxidative potential and triggered a cell adaptive response. Our study improved the knowledge of particle toxicity of pyrotechnic smokes and scientific approach developed here could be used to study other type of particles.

1. Introduction

Pyrotechnic smokes have been systematically used since World War I and still remain effective on the modern battlefield. They are used for military exercises and operations to reduce the enemy visibility or obscure objects, or for signalling and marking positions. Law enforcement officers also use them for security and protection. In addition, civil population during festive, social, cultural, political or sports events can

use pyrotechnic smokes.

Many types of pyrotechnic smokes with various initial compositions exist but few data about the toxicity of the emitted products after pyrotechnic reactions are available. At the end of the 1990s, the first reports of smokes toxicity were published by the US National Research Council ([National Research Council \(US\) Subcommittee on Military Smokes and Obscurants, 1997; 1999a; 1999b](#)) to establish exposure guideline levels for both military in training and public residing or

Abbreviations: RSS, red signalling smoke; HC-OS, hexachloroethane-based obscuring smoke; AIS, anti-intrusion smoke.

* Correspondence to: Normandie Univ, UNIROUEN, UNICAEN, ABTE, 76000 ROUEN, France UFR Santé, Bâtiment recherche, 22 boulevard Gambetta, 76000, France.

E-mail address: cecile.corbiere@univ-rouen.fr (C. Corbière).

<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.113637>

Received 6 February 2022; Received in revised form 20 April 2022; Accepted 10 May 2022

Available online 20 May 2022

0147-6513/© 2022 The Author(s). Published by Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

working near military-training facilities. These reports showed that smokes from different pyrotechnic smokes (hexachloroethane, red phosphorus, white phosphorus, metallic and colored smokes) caused various pulmonary damages (irritation, respiratory distress, dyspnoea, coughing, oedema, inflammation) after acute exposure and can lead to death if exposure occurs in confined spaces. However, it was highlighted a lack of data and thus, the necessity to develop new knowledge to better understand the potential toxicity of pyrotechnic smokes. Most studies on the toxicity of pyrotechnic smokes were carried out on animal models. However, for ethical reasons considering animal welfare, their use is questionable (3Rs principle: Replacement, Reduction, and Refinement; (Tannenbaum and Bennett, 2015)). Thus, the evaluation of the health impact of pyrotechnic smokes is a challenge requiring new experimental approaches close to human physiological conditions, as the use of primary cells cultivated at the air-liquid interface (ALI) (Hawley et al., 2014; Juarez Facio et al., 2022b; Lan et al., 2021). In order to understand smokes toxicity on the respiratory airways, very few in vitro studies have been carried out, by exposing pulmonary cell lines to total aerosol after smoke combustion (Hemmilä et al., 2007a; Hemmilä et al., 2007b; Hemmilä et al., 2010; van Hulst et al., 2017). Depending on the smoke's type, a moderate to strong reduction in cell viability was observed. In addition, strong genotoxicity was shown with orange smoke compared to red, yellow or purple ones.

Combustion of pyrotechnic smokes generate large amounts of particles giving to the smokes their characteristics, i.e. colored for a signalling smoke (Hemmilä et al., 2010), or with excellent hiding capacity dependent of the particle size of the aerosol for obscuring smokes (Hemmilä et al., 2007a; Koch, 2008). To our knowledge, no study was carried out to explore smoke particle toxicity whereas relationship between airborne particles exposure and health, related to cardio-pulmonary diseases, has been well-documented (Chiu and Yang, 2013; Habre et al., 2014; Madrigano et al., 2013; Nachman and Parker, 2012; Smith et al., 2020). Experimental studies have shown that smaller particles induce stronger effects than larger particles, due to their larger surface area to mass ratio (Oberdörster et al., 2005), but there is a need to consider their chemical compositions.

One of the most studied toxic mechanisms of particles is related to their ability to generate an oxidative stress by production of reactive oxygen species (ROS), when the cell's antioxidant defences are saturated (Janssen et al., 2014). High levels of ROS can then trigger various redox-sensitive signalling cascades associated with airway inflammation (Betts et al., 2013). Compounds adsorbed on particle surface, such as organic compounds or metals, are responsible for oxidative stress (Chen et al., 2021; Williams et al., 2017). ROS could be formed upon direct contact with lung lining fluid and epithelial cells (Øvrevik et al., 2015) but could also come from in vivo biotransformation of particle components.

The development of predictive tools of toxicity reflecting the oxidative potential (OP) of particles to characterize air pollution exposure have been arising (Künzli et al., 2006). The OP of particles is defined by their ability to produce ROS and/or oxidize target substrate. Different acellular methods are used but the dithiothreitol (DTT) and the antioxidant (AO) depletion assays appeared to be the most relevant assays and have demonstrated interesting complementary results (Ayes et al., 2008; Bates et al., 2019; Crobeddu et al., 2017). Thus, the tests developed for airborne particle toxicity would be very suitable for studying the toxicity of particles from pyrotechnic smokes.

This study was carried out in order to investigate the particle toxicity produced by three different types of smoke by combining acellular and cellular in vitro tests, as well as a physicochemical characterization. For this purpose, two military smokes were used, a red signalling smoke (RSS), an obscuring hexachloroethane-based smoke (HC-OS) and an anti-intrusion smoke (AIS) for civil uses. Firstly, smoke particles were collected directly from the cloud, and were characterized physico-chemically. In order to apply the 3Rs ethical principle, particle toxicity was assessed using both primary small airway epithelial cells

(SAEC) cultivated at Air-Liquid Interface (ALI) and acellular assays in order to measure the intrinsic OP of particles. The biological activity was evaluated by cell viability, antioxidant and pro-inflammatory responses 24 h post exposure.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals and materials

Unless otherwise specified, chemicals were purchased from Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA.

2.2. Smoke description and PM sampling

Three smoke formulations were used: a Red Signaling Smoke (RSS) used in military field and composed of potassium chlorate, lactose and red organic dye; an Hexachloroethane based Obscuring Smoke (HC-OS) used in military field and composed of hexachloroethane, aluminum oxide, iron oxide and calcium carbonate; an Anti-Intrusion Smoke (AIS) used in by civil population and composed of Potassium chlorate, lactose and organic acids.

Particles collecting from pyrotechnic smoke assays were performed in DGA Land Systems Technical Center. Particles from smokes were collected with cascade impactors placed at 1.5 m high (Staplex – Model Sierra 235) connected to a high volume pump (80 m³/h) close to the smoke source (1–2 m) and during all the smoke emitting phase (10–20 min). Cascade impactors were equipped with five impaction stages (collecting respectively particles of 7.2 – 3.0 – 1.5 – 0.95 – 0.49 µm) completed by a quartz back-up filter allowing impaction of particles < 0.49 µm. The impactor's sampling was placed to dry under a laminar flow bench for 24 h before particle collection by scrapping, stage by stage. Then, particles were weighed and collected in sterile vials and stored at 4 °C. Particles were pooled and suspended in sterile ultra-pure water for toxicological assays (1 mg/mL). Particle suspensions were placed on sterilized vials and sonicated by the Cup-Horn method (Betts et al., 2013) in order to avoid biological and chemical contaminations. They were stored at – 20 °C until use.

2.3. Physico-chemical characterization

Simultaneously to particle sampling by impaction, particle concentration (particles/cm³) and size distribution of aerosols were determined in real time conditions with two analysers: an optical particle sizer (OPS 3330, TSI Instrument) for aerosols between 0.3 µm and 10 µm (divided into 16 size classes) and a scanning mobility particle sizer (SMPS 3910, TSI instrument) for aerosols between 10 nm and 400 nm (divided into 13 size classes). The particles collected on the impaction stages and the back-up filter were characterized by Elementary analysis (C, H, N, S) (GC-TCD Flash 2000, Thermo instruments), ionic chromatography (ICS 5000, Thermo instruments) for anion species (Cl⁻ and NO₃⁻) and cation species (K⁺ and NH₄⁺), gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC CP 3800/MS 1200MS, Varian) for organic compounds including polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) derivatives. Inductively coupled plasma equipped with an optical emission spectroscopic detector (ICP-OES 6300 DUO, Thermo Instruments) was used to analyse total and water soluble metals (Al, As, B, Ba, Ca Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, P, Pb, S, Sb, Sn, Sr, Ti, V and Zn). Soxhlet extraction with dichloromethane was performed to extract the organic components. Soluble ions and metals were obtained by lixiviation of particles in ultrapure water during 20 min in an ultrasonic bath. A microwave digestion (Xpress, CEM) was performed with nitric acid to obtain the total metal fraction.

2.4. Oxidative potential of smoke particles

The two assays were optimized and validated with diesel exhaust

particles (DEP) collected from a Fiat motor (2004) and TiO₂ nanoparticles (anatase 99%, Acros Organics, Belgique), used respectively as positive and negative control (Fig. A.1).

2.4.1. Antioxidant depletion assay (AO) in a synthetic respiratory tract lining fluid (RTLFL)

Antioxidant depletion assay was based on the analysis of a synthetic respiratory tract lining fluid (RTLFL) (Ayres et al., 2008). RTLFL described by Zielinski et al. (1999) is composed by ascorbic acid (AA, 200 µM) and glutathione (GSH, 200 µM), concentrations usually present in RTLFL from normal and non-smoking subject. Antioxidant solutions were prepared in 0.9% NaCl at pH 7.4 to reflect normal human airway secretions. Particles were incubated for 4 h at 37 °C in RTLFL. Concentrations used for these assays, 70–280 µg/mL, corresponding to concentrations used for exposure, 12.5 µg/cm² to 50 µg/cm². After incubation, samples were centrifuged for 5 min at 12,000g at 4 °C to remove particles. The supernatants were then filtered using Nylon 0.45 µM syringe filters (Cloup, France). The final concentrations of AA, GSH and GSSG were quantified by an Agilent High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) 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 × 150 mm, 2.7 µm) with guard EC-C18 (3 mm) maintained at 25 °C. The injection volume was 1 µL. Potassium hydrogen phosphate (10 mM, pH 3) was used as mobile phase (100%), with 0.6 mL min⁻¹ as flow rate. The UV data were collected at 220 nm. The method was validated in term of specificity, response function, precision and linearity according to the ICH Q2(R1) guidelines. The LOD and the LOQ were respectively equal to 0.12 µM and 0.4 µM for AA, 0.3 µM and 0.9 µM for GSH and 0.24 µM and 0.8 µM for GSSG. The linearity was assessed by least squares regression and yielded good determination coefficients ($R^2 = 0.9999$, $y = 7255.7x - 4.7647$ for AA, $R^2 = 0.9998$, $y = 2935.7x - 0.2493$ for GSH and $R^2 = 0.9996$, $y = 8884.9x - 0.3844$ for GSSG). The intra-day precision showed relative standard deviation (RSD %) lesser than 2%. The inter-day precision showed RSD% better than 3%. Percentage of depletion was calculated as described by.

: $OP^{AA} \text{ or } OP^{GSH} = 100 - (AA \text{ or } GSH \text{ concentration in the sample} / AA \text{ or } GSH \text{ concentration in blank}) \times 100$. GSSG production was calculated as: $OP^{GSSG} = 100 + (GSSG \text{ concentration in the sample} / GSSG \text{ concentration in blank}) \times 100$.

2.4.2. Dithiothreitol assay (DTT assay)

This assay was commonly used to assess the progressive oxidation of DTT by particles (Cho et al., 2005). This method measures the rate of loss of DTT upon incubation with particles. Under the assay conditions, the reaction is proportional to the concentration of the redox active species of the particles. Particles (70–280 µg/mL) were incubated with 200 µM DTT in 0.10 M phosphate buffer (0.08 M Na₂HPO₄ and 0.02 M NaH₂PO₄, pH 7.4, Chelex-treated to eliminate certain effects of metals) in 96-well plate for 1 h at 37 °C. Then, plates were centrifuged for 15 min at 2100g and 4 °C. An equal volume of 2.5 mM of 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB) and supernatant was mixed and absorbance was measured at 412 nm (Safas Xenius, Monaco). Percentage of depletion was calculated as described by Crobeddu et al., 2017: $OP^{DTT} = 100 - (DTT \text{ concentration in the sample} / DTT \text{ concentration in the blank}) \times 100$.

2.5. SAEC culture and particles treatment

Human small airway epithelial cells (SAEC, Lonza, Basel, Switzerland), were firstly grown for 7 days in a T-75 cm² flask with expansion medium supplemented with 0.1% (v/v) penicillin/streptomycin (10 Units/mL; GIBCO, USA), and maintained at 37 °C in 95% humidified air with 5% CO₂. Due to the unavailability of Small Airway Growth Medium™ and S-ALI™ Differentiation Media (Lonza) after 2018, PneumaCult-Ex medium and PneumaCult™-ALI Differentiation medium (STEMCELL Technologies, Vancouver, Canada) were used for

SAEC expansion phase and differentiation phase, respectively, for all the experiments. The medium was replaced every two days. Between 80% and 90% confluency, SAEC were trypsinized and seeded at 110,000 cells/insert on transwells polyester permeable membrane cell culture inserts (12 mm diameter, pore size 0.4 µm, Costar, Corning®) pre-coated with a 30 µg/mL collagen solution (Rat Tail Collagen Type 1, Corning®) in PBS for 1 h at 37 °C. At confluence, cells were placed under air-liquid interface (ALI) condition by removing the apical medium and replacing the basal medium by PneumaCult-ALI medium. After 7 days of culture at ALI conditions, the exposures were performed by directly depositing particle suspensions of RSS, HC-OS and AIS (12.5; 25 and 50 µg/cm²) on apical side (200 µL) during 24 h at 37 °C in a humidified 5% CO₂ atmosphere. As a reference control, cells were exposed to 200 µL PBS under the same conditions.

2.6. Cell viability assay

Cell viability was evaluated using the MTT assay measuring the mitochondrial dehydrogenase activity in viable cells. After exposure, basal medium was replaced by MTT reagent (5 mg/mL) diluted (1:10) in fresh PneumaCult-ALI medium. After 3 h of incubation at 37 °C, basal medium was discarded and formazan crystals were dissolved with a solution of SDS 10%/HCl 0.1 N overnight. MTT reduction was quantified by measuring the light absorbance at 570 nm (SAFAS Xenius, Safas, Monaco) using six replicates. Each test was repeated independently at least three times. Results are expressed as % viability = (Absorbance in the sample / Absorbance in the control PBS) × 100.

2.7. mRNA expression measurements by quantitative real time RT-PCR

After 24 h of exposure, cells were rinsed with PBS and total RNA were extracted with TRI-REAGENT® (Sigma-Aldrich, France) according to the manufacturer's recommendations. After DNase treatment (Invitrogen, Life Technologies), RNA were quantified by Nanodrop 2000 (Thermo Scientific) and integrity was analyzed with a Bioanalyseur 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, USA). RNA Integrity Numbers of the samples were > 9. Reverse transcription (RT) of 1 µg of total RNA was performed using oligo (dT) primers with AffinityScript QPCR cDNA Synthesis Kit™ (Agilent Technologies). Quantitative PCR was performed with Brilliant III Ultra-fast SYBR Green QPCR Master Mix (Agilent Technologies) following manufacturer's recommendations using a thermocycler (Stratagene Mx3005P Agilent Technologies). cDNA was amplified using specific primers (Table A.1) and melting curve analysis was performed to verify the amplification of a single product following these conditions: 3 min at 95 °C; 40 cycles of 10 s at 95 °C, 20 s at 60 °C; 1 min at 95 °C; 30 s at 55 °C and 30 s at 95 °C.

Standard curves were generated for each qPCR to calculate the efficiency of the amplification and only qPCR with an efficiency of 1.8–2.1 were used for analysis. The cycle threshold (Ct) values were determined and normalized by the ddCt method with GAPDH as housekeeping gene (Livak and Schmittgen, 2001). Results are expressed by mean of $2^{-(ddCt)}$ ± SD of at least four independent experiments.

2.8. Quantification of cytokines released by SAEC cells

The basal cell culture media were collected directly after 24 h of exposure, centrifuged for 5 min at 13,000g and frozen at – 80 °C until use. Levels of IL-8, IL-6 and TNF-α released into the culture medium were measured using commercially enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits (Cohesion Biosciences, London, UK) according to the manufacturer's instructions. The optical density of samples was measured at 450 nm with a microplate reader (SAFAS Xenius, Safas, Monaco). Cytokines concentrations were subsequently calculated from standard curves and expressed in pg/mL (mean ± SD of three independent experiments).

2.9. Statistical analysis

Results were obtained from at least three independent experiments. Statistical analyses were performed by a One-way Analysis Of Variance (ANOVA). Concerning data from cytotoxicity, gene expression and cytokine secretion, the differences between treatment and control groups (PBS group) were analyzed by a non-parametric Mann-Whitney test and data of oxidative potential of particles was analyzed with Dunnett's test using GraphPadPrism v9 software. Values of $p \leq 0.05$ are considered to be statistically significant.

3. Results

3.1. Physico-chemical characterization of RSS, HC-OS and AIS particles

3.1.1. Particle size analysis

Table 1 presents: 1) the average of the total amount of particles (particles/cm³) emitted during the peak of emission 2) the part of the main size of particles detected for each type of smoke.

An example of particle number profile for HC-OS is given in Fig. A.2. If we compare the number of particles detected by both OPS and SMPS, it appears that most of the particles are below 400 nm. AIS is the smoke grenade that generates the largest amount of particles/cm³. The data of the particle counters are consistent with the samplings performed on the impactor's stages: most of the particles are collected on the last stages of the impactors (0.95 = −0.49 μm) and on the back-up filters.

3.1.2. Elemental analysis and metals

The elemental analysis showed a high concentration of carbon (70.1% and 68.3%), hydrogen (5.5% and 9.4%) and nitrogen (8% and 0.3%) respectively for RSS and AIS particles whereas sulphur was not detectable (< 0.5%). Particles from HC-OS are very poor in carbon (2.3%) compared to RSS and AIS particles, they contain 4.9% of hydrogen and there is no detectable concentration of nitrogen and sulphur.

The metal analysis (Table 2) indicated that high levels of potassium were observed for all smoke particles. HC-OS particles were highly concentrated in metals since we measured very high levels of Al, Fe and Ca as well as moderate levels of Zn, Sn, Mg, S, Na and Cu. RSS particles contained very high levels of Sb as well as Ba and S. AIS particles were mainly composed of Al, Na, S and Sb.

Concerning water-soluble metals in particle suspension (Table A.2), we noticed the presence of the same major metals than in the total fraction but not always in the same proportion. K and Na were the main water soluble metals (1–10 μg/mL) detected in RSS and AIS particle suspension in addition with Sb in RSS particles suspension and B in AIS particles suspension. Traces of Ca, Al, Mg, S, Ba, Fe, Pb, and Zn were also measured in RSS and AIS particle suspensions. For HC-OS particles, very high levels of Al (saturated), Ca, Fe, K and Sn (>10 μg/mL), Mg, Zn, Na, S (1–10 μg/mL) were measured and numerous other metals in the concentration range 0.1–1 μg/mL (B, Ba, Cr, Cu, Mn, P, Pb, Ti) were

Table 1

Real time number of particles emitted in the cloud.

particles / cm ³		RSS	AIS	HC-OS
10–400 nm (SMPS data)	total for all size	250,000–860,000	450,000–1 200,000	430,000
	main sizes	65,000–270,000 (154 & 274 nm)	131,000–269,000 (154 nm) 94,000–313,000 (205 nm)	130,000 (205 nm)
0.3–10 μm (OPS data)	total for all size	38,000	62,000	45,000
	main sizes	5 000–12 000 (0.5 & 1 μm)	20,000 (0.3 μm)	11,500 (0.3 μm)

Table 2

Total metals concentrations in RSS, AIS and HC-OS particles collected on impactor.

Total metals concentrations (mg/g)	RSS	AIS	HC-OS
> 1	K (7.6), Sb (3.4)	K (3.0)	Al (105.9), Fe (12.1), Ca (9.6), K (1.8)
0.1–1	S (0.5), Ba (0.2)	Al (0.6), Na (0.2), S (0.2)	Zn (0.94), Sn (0.9), Mg (0.8), S (0.8) Na (0.1), Cu (0.1)
0.01–0.1	Al (0.07), Zn (0.05), Na (0.03), Cr (0.02), P (0.02), Cu (0.01), Pb (0.01), Sn (0.01)	Sb (0.08), Cu (0.08), Sn (0.03), Fe (0.02), P (0.02), Pb (0.01), Zn (0.01)	Cr (0.09), Pb (0.09), Sb (0.04), Mn (0.03), P (0.03), Ba (0.02), Ni (0.02), Ti (0.02)

detected.

3.1.3. Ions analysis

The ionic chromatography analysis exhibited that RSS and AIS particles were highly concentrated in nitrates (NO₃: RSS, 19.5 mg/g; AIS, 5.5 mg/g). Potassium was abundant in the three samples (K⁺: RSS, 11.4 mg/g; AIS, 3.4 mg/g; HC-OS, 1.6 mg/g) as well as chlorides, which are extremely high in HC-OS sample (Cl[−]: RSS, 8.1 mg/g; AIS, 4.5 mg/g; HC-OS, 215.8 mg/g).

3.1.4. Organic components detection

The organic compounds detected in the smoke particles were quite different from one pyrotechnic smoke to another. Numerous organic molecules were detected in RSS and AIS. HC-OS particles that were poor in carbon contain fewer compounds, the main one being hexachlorobenzene. Several chlorinated aromatic or polyaromatic compounds (i.e. octachlorostyrene, octachloronaphtalene), methylated derivatives of PAH, alkanes and phthalates were also detected in HC-OS particles (Table 3). RSS particles contained a large set of aromatic molecules containing nitrogen (aromatic amines and nitriles), which is consistent with its elementary analysis (N, 8%) and also oxygenated aromatic molecules. These molecules are for example oxygenated or nitrogenous PAHs such as quinolines, naphtalene-naphtalenylxyloxy, naphtalenol, methyl-naphtalenol, amino-methyl-naphtalenol, methyl dibenzofurane, benzo(b) naphto(2,3-d) furan and/or isomers, hydroxycarbazole, benz(cd) indol-2(1H) one and/or isomers, dimethyl phenantrolone, benz(a) or (c) acridine and isomers, benz(a) or (c) acridinone, methyl benz(a) fluorenone and/or isomers. RSS contains also diazenes, alkanes and quinones such as trimethyl-anthraquinone (Table 3). Compounds identified in AIS are mainly polycyclic compounds such as cholesterol derivatives (mass: 218, 250, 273). Examples of molecular structures detected in the particles are presented in Table 3.

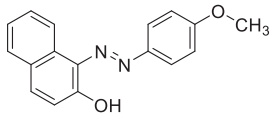
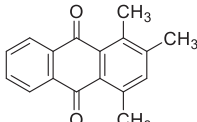
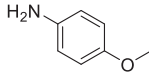
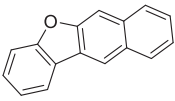
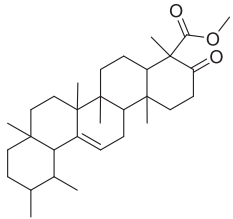
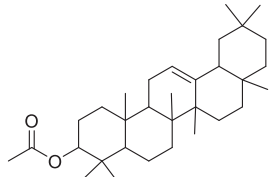
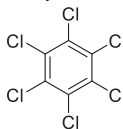
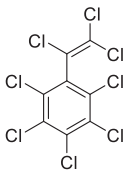
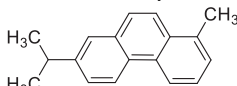
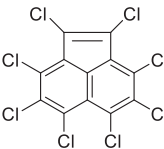
In smoke particles suspension, no solubilization of organic compounds in any smoke was observed suggesting that organic molecules remained adsorbed on the particulate fraction.

3.2. Oxidative potential

Antioxidant depletion assay (AO) was realized in a synthetic respiratory tract lining fluid (RTLFL). As shown in Fig. 1A, among all smoke particles, HC-OS particles were the most reactive sample by providing 11%, 22% and 42% of ascorbic acid (AA) depletion at 70, 140 and 280 μg/mL (or 12.5, 25 and 50 μg/cm²) respectively, depleting in a dose-dependent manner compared to the control. Smoke particles from RSS and AIS induced a low AA depletion, 3% (70 μg/mL) to 6% (280 μg/mL) and 3% (140 μg/mL) to 5% (280 μg/mL), respectively. Smokes particles did not cause any depletion of GSH and any production of GSSG

Table 3

Type of organic compounds detected in RSS, AIS and HC-OS particles collected on impactor.

RSS				
	1-[(E)-2-(4-methoxyphenyl) diazenyl]-2-naphthol	1,2,4-trimethylantracene-9,10-dione	4-anisidine	Benzo [b] naphto [2,3-d] furan
AIS				
	Methyl 3-oxours-12-en-24-oate		(3α)-Olean-12-en-3-yl acetate	
HC-OS				
	Hexachlorobenzene	Octachlorostyrene	Phenanthrene, 1-methyl-7-(1-methylethyl)	Acenaphthylene, octachloro

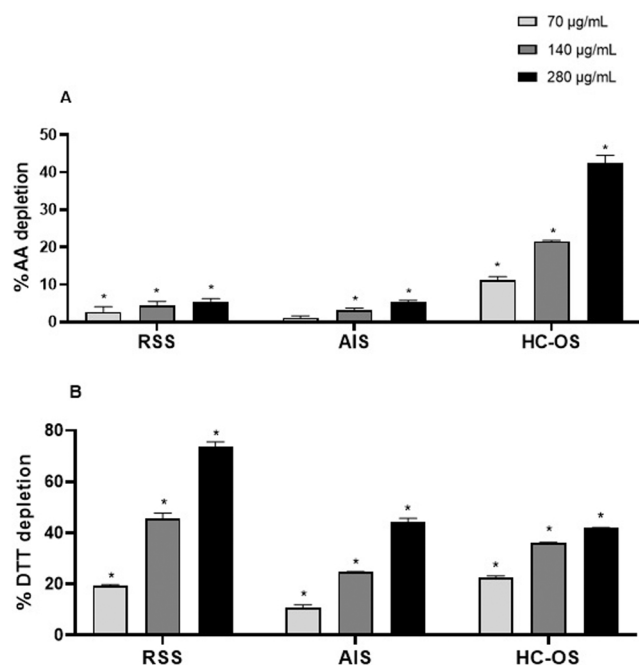


Fig. 1. Percentage of AA depletion relatively to free-particles control after 4 h of incubation in RTLF with RSS, AIS and HC-OS particles (A). Percentage of DTT depletion relatively to free-particles control after 1 h of incubation with RSS, AIS and HC-OS particles (B). Data are expressed as mean value $\pm$ SD of at least three independent experiments carried out in triplicates. * $p \leq 0.05$ (Dunnett's test).

(Fig. A.3).

Dithiothreitol assay (DTT) was dose dependently depleted by all smoke particles (Fig. 1B) but RSS seemed to be the most reactive sample. At 280 $\mu\text{g/mL}$, RSS particles showed a maximum depletion of 74% whereas AIS and HC-OS particles exhibited a lower but similar maximum of OP^{DTT} around 44%. At lower doses, we noticed that depletion of HC-OS particles (22%, 70 $\mu\text{g/mL}$; 36%, 140 $\mu\text{g/mL}$) was

significantly higher than depletion from AIS particles (11%, 70 $\mu\text{g/mL}$; 25%, 140 $\mu\text{g/mL}$).

3.3. Cell viability

Small airway epithelial cells (SAEC) were exposed for 24 h to suspended particles from RSS, AIS and HC-OS at 12.5, 25 and 50 $\mu\text{g/cm}^2$. The results of cell viability assessed on SAEC cells using the MTT assay are shown in Fig. 2. None of the three types of smoke particles induced any decrease in cell viability whatever the concentration tested.

Since particles had an intrinsic oxidative potential and despite the absence of a cytotoxic response after exposure, we chose to further characterize the cellular response by analyzing both antioxidant and inflammatory gene expression.

3.4. Antioxidant response

Fig. 3 presents the modulation of the mRNA expressions of superoxide dismutases-1 (*SOD-1*) and -2 (*SOD-2*), catalase, NADPH quinone oxidoreductase-1 (*NQO-1*) and heme oxygenase-1 (*HO-1*) after 24 h of exposure of SAEC to RSS (Fig. 3A), AIS (Fig. 3B) and HC-OS particle suspensions (Fig. 3C). For all concentrations, particles from RSS induced a significant increase of *SOD-2*, *HO-1* and *NQO-1* mRNA levels. At 50 $\mu\text{g/cm}^2$, expressions of *HO-1* and *NQO-1* were strongly increased by 14.4-fold and 10.0-fold respectively while *SOD-2* expression was moderately increased by 3.0-fold. Expressions of *SOD-1* and catalase were not altered compared to the control. An exposure to AIS particles generated a significant increase of *HO-1* and *NQO-1* expressions at all tested concentrations (1.5-fold to 3.3-fold, *HO-1*; 2.5-fold to 7.4-fold, *NQO-1*) compared to PBS control. At the highest dose of exposure, a statistically significant but moderate increase expression of *SOD-1* (1.3-fold) and *SOD-2* (2.1-fold) expressions was observed while catalase expression was slightly reduced (0.64-fold). HC-OS particles exposure induced overexpression of *NQO-1* at 25 $\mu\text{g/cm}^2$ (2.3-fold) and 50 $\mu\text{g/cm}^2$ (3.1-fold). For all concentrations, we noticed an increase of *SOD-2* expression (2.5-fold to 3.4-fold) and a reduction of catalase expression (0.66–0.54-fold²). No effects on *SOD-1* and *HO-1* mRNA levels were observed.

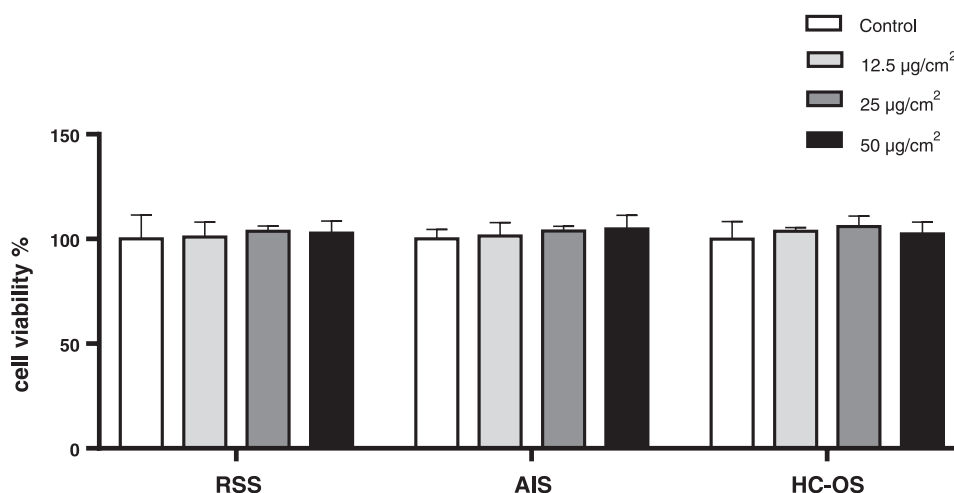


Fig. 2. Cell viability results from the MTT assay. SAEC were exposed during 24 h to RSS, AIS and HC-OS particles to a range of concentrations (12.5; 25; 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$). The results are presented as percentage of cell viability compared to control (cells cultured with PBS). Data were expressed as mean value $\pm$ SD of at least three independent experiments carried out in replicates.

3.5. Inflammatory response

The pro-inflammatory response was characterized by measuring mRNA expression changes (Fig. 4A) and secretion (Fig. 4B) of IL-6, IL-8 and TNF- α cytokines 24 h after exposure to smoke particles from RSS, AIS and HC-OS.

Concerning RSS and whatever the concentrations, IL-8 mRNA level was highly induced by 7.0-fold. IL-8 cytokine secretion was significantly increased only at the highest concentration reaching a maximum level of 11,000 pg/mL. IL-6 mRNA level was significantly reduced by 0.6-fold at 25 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ and 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. But, the cytokine secretion did not decrease significantly. We noticed a non-significant increase of TNF- α expression. In addition, we did not detect TNF- α secretion after any smoke particles exposure. AIS particles generated a significant increase of IL-8 expression (5.2-fold) at 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ but a non-significant effect on the cytokine secretion compared with control. About IL-6 mRNA and cytokine secretion, no modification was observed. AIS particles caused a slight significant rise of TNF- α expression by 2-fold at all concentrations tested. Concerning HC-OS particles, they produced a strong inflammatory response in SAEC. Indeed, after 24 h of exposure, expressions of all cytokines were significantly induced by all concentrations, especially IL-8 (13.5 fold, 12.5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$; 9.4 fold, 25 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$; 13.5 fold, 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$). The secretion of this cytokine was also significantly increased by 3-fold. A moderate but significant increase of IL-6 gene expression was noticed by 2.0-fold but the cytokine secretion was only observed at the highest dose tested (2.0-fold) compared to control. Expression of TNF- α is significantly increased by 3.4–4.0-fold but the increase in cytokine secretion could not be confirmed.

4. Discussion

While the evidence for the health adverse effects of atmospheric particles has been growing, there is very few data on the toxicity of particles generated by pyrotechnic smokes. Yet exposure to such smoke particles can occur in military, professional, festive, sporting and civilian fields. In order to fulfill this lack of knowledge, we intended to gain information on the physicochemical characterization, intrinsic oxidative properties (OP) and biological responses of human small airway epithelial cells (SAEC) after exposure to particles from two military smokes (RSS and HC-OS) and one used by civilians (AIS).

The physicochemical characterization shown that, for the three types of smokes, the most majority of the formed particles had a diameter lower than 400 nm leading to the capacity to penetrate deeply into the airways after inhalation and to reach small airway region (Geiser and

Kreyling, 2010). This small diameter justified the relevant choice of SAEC model to study toxicity of the smoke particles. Other studies on particles from colored signaling smokes (red, orange, violet and yellow) exhibited larger sizes than us, smaller than 2.1 μm (vanHulst et al., 2017) or 1 μm (Hemmilä et al., 2007b). To our knowledge, except analysis of particle size, chemical compositions of smoke particles have never been studied. The most noticeable findings are that each smoke exhibits a specific chemical signature. In RSS particles, we noticed high level of Sb, which could be related to the grenade propellant composition (Dalby et al., 2010) that may differ between smokes. RSS and AIS particles presented metal levels in accordance with other studies on combustion particles (Danielsen et al., 2011; Deng, Zhang et al., 2013; Visentin et al., 2016) whereas metals levels of HC-OS were exceptionally high (Al, Fe, Zn and Cu). Furthermore, RSS and AIS particles appeared to be more organic than HC-OS particles. Indeed, RSS particles contain a large set of aromatic molecules containing nitrogen and oxygenated aromatic molecules related to initial chemical compositions and especially to the red dye of the smoke, such as diazenes. AIS particles contained mainly polycyclic compounds like cholesterol derivatives whereas HC-OS particles contained low amounts of chlorinated molecules.

Oxidative stress triggering pro-inflammatory response is considered as the main mechanism of particle toxicity and oxidative potential (OP) of the smoke particles could be a relevant indicator to characterize this effect. The OP has the advantage to integrate the physicochemical properties of particles such as size, chemical composition and/or surface reactivity. Results showed that ascorbic acid (AA) was only depleted by HC-OS particles compared to RSS and AIS particles and no type of smoke particles affected glutathione depletion. Our results of OP^{AA} were consistent to other studies showing that metals drove the AA response (Bates et al., 2019; Visentin et al., 2016; Yu et al., 2018) since HC-OS particles exhibited the highest OP^{AA} value. Among metals composition of HC-OS particles, Al (Godri et al., 2011), total Fe (Godri et al., 2010; Janssen et al., 2014) and soluble Fe (Koehler et al., 2014) as well as total Zn (Godri et al., 2011) have been reported to impact OP^{AA}. OP^{DTT} results demonstrated that DTT was higher depleted by RSS particles compared to HC-OS and AIS particles. About the DTT assay, numerous studies reported high sensitivity to metals, especially Cu, Mn, Co, Vi, Ni and Pb (Koehler et al., 2014) but also sensitivity to quinones (Calas et al., 2018; Cho et al., 2005; Fang et al., 2016; Verma et al., 2015). However, usually typical ambient PM_{2.5} samples are richer in metals than in organic compounds, so it suggests that metals dominate the DTT response (Conte et al., 2017; Fang et al., 2016; Janssen et al., 2014). The singular response of RSS particles is probably related to the numerous

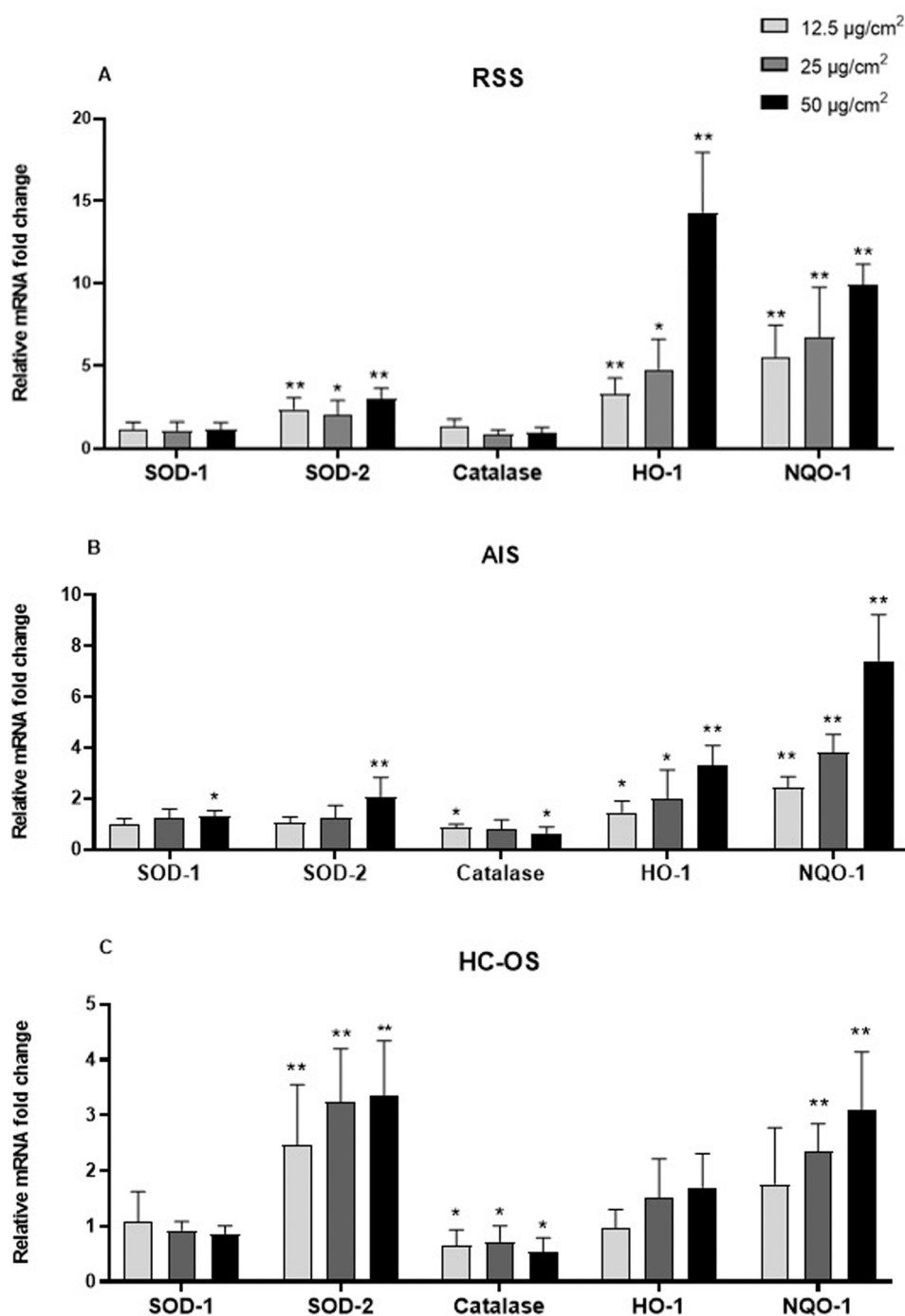


Fig. 3. Antioxidant mRNA expression after 24 h of exposure to RSS (A), AIS (B) and HC-OS (C) particles (12.5, 25, 50 µg/cm²). SOD-1 and -2, superoxide dismutases-1 and -2; NQO-1, NADPH quinone oxydoreductase-1; HO-1, heme oxygenase-1. Data were expressed as mean value $\pm$ SD of at least three independent experiments carried out in replicates. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ (Mann-Whitney test) indicate significant differences to the control (PBS).

organic compounds and metals included in the particle composition. Indeed, some studies reported correlations between total PAH or some specific molecules such as anthracene, pyrene, benzo(a)anthracene, chrysene and indenopyrene with OP^{DTT} (Calas et al., 2018; Crobeddu et al., 2017; Gao et al., 2020). According to literature and our results, it seems difficult to identify the specific components that drive the DDT assay. Thus, the difference in sensitivity of each OP to certain types of chemical components provide complementary information on the link between OP and particle composition. Our results point out the need to use several assays to assess the OP of particles, which is in accordance with several studies on OP (Conte et al., 2017; Fang et al., 2016; Janssen

et al., 2014).

In this study, for the first time the biological effects of smoke particles were evaluated on a human pulmonary model cultivated at ALI. The exposure of SAEC for 24 h to RSS, AIS and HC-OS particles did not influence cell viability. Several Finnish studies (Hemmilä et al., 2007a, 2007b, 2010) were carried out by exposing bronchial cells (BEAS-2B) for 5 min with a time recovery of 48 h to total aerosol of different types of colored smokes (red, orange, blue, green, violet, purple and yellow) and screening smokes (red phosphorus), an hexachloroethane (HC) based smoke used as a reference. These studies revealed that red signalling and HC smokes decreased cell viability to 16% and 37% respectively as

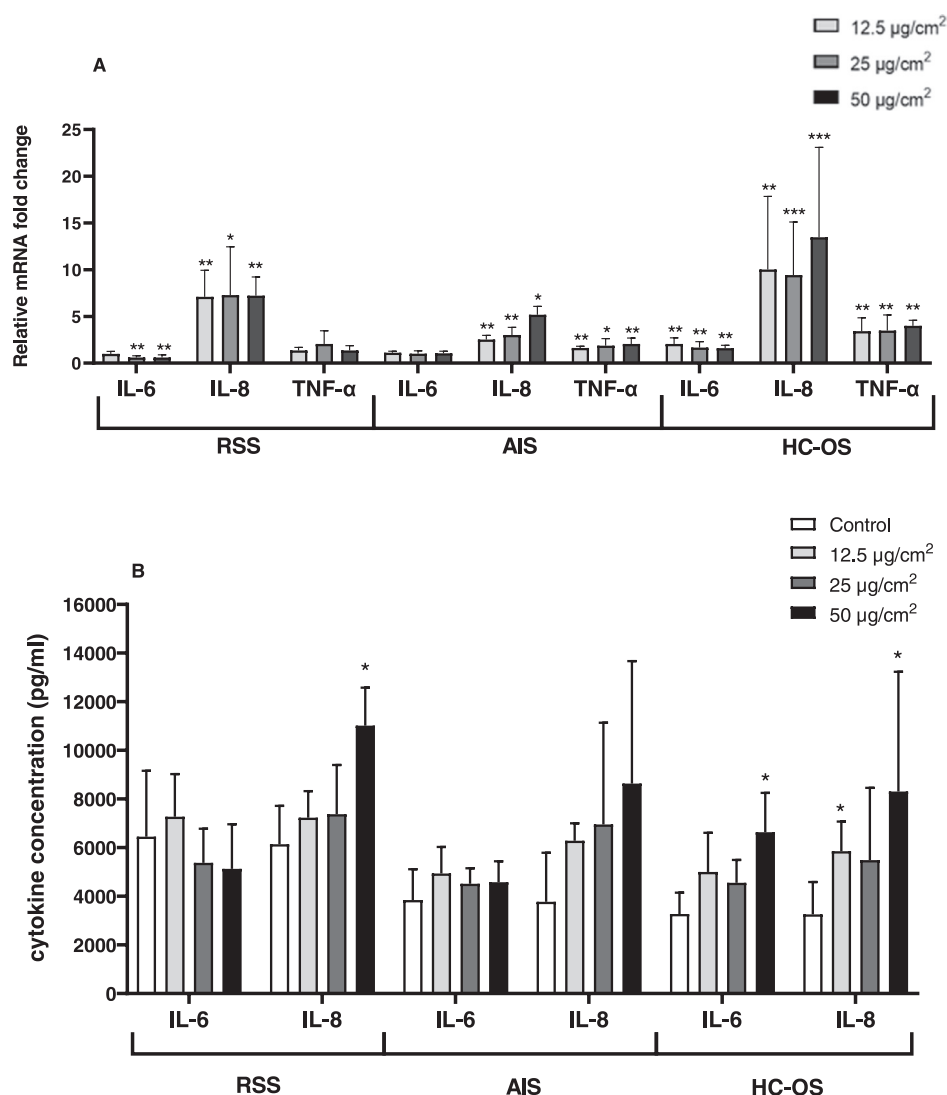


Fig. 4. mRNA expressions (A) and cytokines secretion (B) of cytokines in PBS control and after 24 h of exposure to RSS, AIS and HC-OS particles (12.5, 25, 50 µg/cm²). Data were expressed as mean value ± SD of at least three independent experiments carried out in replicates. **p* ≤ 0.05, ***p* ≤ 0.01, ****p* ≤ 0.001 (Mann-Whitney test) indicate significant differences to the control (PBS).

compared with unexposed cells. Furthermore, two types of red phosphorus were studied, one did not affect cell viability and the second one induced a decrease to 65% of viability. An another in vitro study evaluated the cytotoxic effects of three red smokes from different manufacturer on alveolar cells (A549 cells) cultivated at ALI (van Hulst et al., 2017), only one generated a cytotoxic effect (>10%). Because we worked only on the particulate fraction of smokes, it was difficult to compare our results with these previous studies, which performed exposure to total aerosols, including gas phase. However, numerous studies on particles toxicity reported various cytotoxicity responses. Regarding SAEC model, an exposure of 1 h (Svensson et al., 2016) or 24 h to metallic nanoparticle (Wu et al., 2020) or 24 h to surgical smoke (Sisler et al., 2018) reduced cell viability in SAEC while 48 h of exposure to diesel exhaust particles (DEP) did not induce any cytotoxicity (Zhang et al., 2019). Time of exposure and physicochemical characteristics of particles could explain the different biological responses. In addition, concentrations of particles used have to be considered. In works cited above, concentrations used are lowest than ours. However, concentrations of PM_{2.5} used in the work of Lan et al., 2021 on SAEC cells are closed to those tested in our study and results on viability are very

similar. Exposure of 24 h could be considered as a long time of exposure but it could represent a residual particles deposition in the lower respiratory tract (Geiser and Kreyling, 2010; Lan et al., 2021). Our results showed that smoke particles tested exhibit an intrinsic oxidative potential at the lowest concentration tested without inducing any cytotoxicity after 24 h of exposure. However, it seems important to explore key events such as antioxidant and inflammation responses because these mechanisms could be the earliest steps in the hierarchical biological effect (Xiao et al., 2003) after exposure to smokes particles.

Our results highlighted an induction of an antioxidant response by over expression of *HO-1* mRNA after exposure to RSS and AIS particles as well as over expression of *NQO-1* expression after exposures to the all types of smoke particles. These results are consistent with other studies that showed over expression of *HO-1* and *NQO-1* in pulmonary cells exposed to DEP, PM_{2.5} or ultrafine particles (Crobeddu et al., 2017; Deng, Rui et al., 2013; Frias et al., 2020; Juarez-Facio et al., 2022b). Organic components are able to cross the membrane barrier and activate Nrf2 pathway that regulates expression of *HO-1* and *NQO-1* (Hawley et al., 2014). The antioxidant response generated by RSS and AIS particles may be explained by their rich composition in PAH. Indeed, the

phenanthrene, naphthalene and quinones, that also composed RSS particles have been reported to induce expression of *Nrf2* (Chowdhury et al., 2018; Klein et al., 2017) and subsequently *HO-1* expression (Li et al., 2004). Compelling evidence showed that PM_{2.5} or DEP compromised antioxidant protective capacity by reducing expression of *SOD-1* and *SOD-2* (Cui et al., 2020; Seriani et al., 2016; Wang et al., 2019). These data are not in line with our findings since *SOD-2* expression is over expressed by all smoke particles. However, it is well known that antioxidant response is time-dependent (Deng, Zhang et al., 2013; Hawley et al., 2014), therefore studying the expression of genes in a time-dependent manner seems necessary. In addition, enzymatic activities of these antioxidant proteins might be realized to confirm efficient antioxidant response. Nevertheless, RSS particles seem to induce a stronger antioxidant response than AIS and HC-OS particles. That suggests a potential link with its high capacity to deplete DTT. Indeed, significant correlations between the DTT assay and genes expression of antioxidants (*HO-1* and *SOD-2*) were reported (Crobbeddu et al., 2017; Karavalakis et al., 2017; Li et al., 2003). Overexpression of these antioxidant genes could be interpreted as an adaptive response to oxidative stress induced by smokes particles (Ballweg et al., 2014; Cantin, 2010; Marchini et al., 2013).

Smoke particles exposure has been shown to activate an antioxidant response in SAEC, which could be a consequence of ROS production. This key event could then trigger inflammation by increasing the synthesis of pro-inflammatory cytokines. *IL-8* expression was significantly induced by all smoke particles type whereas *IL-6* expression was only induced by particles from HC-OS. Several studies using different cell models have demonstrated that different types of particles induced various cytokines expression and secretion, which is in line with our findings. Increased mRNA levels of *IL-6*, *IL-8* or *TNF-α* is observed after DEP, PM_{2.5} or ultrafine particles exposures (Bengalli et al., 2019; Juarez-Facio et al., 2022b; Luo et al., 2021; Totlandsdal et al., 2010; Vattanasit et al., 2014). Expression of *IL-6* and *IL-8* could also be down regulated as it was previously reported with ultrafine particles exposure of BEAS-2B cells (Juarez-Facio et al., 2022a). Comparing our results with in vitro studies using SAEC grown at ALI, the occurrence of PM_{2.5} surrogates to over-secrete *IL-6* but not *IL-8* was recently reported (Lan et al., 2021). Moreover, it was shown that several metallic nanoparticles were able to induce different cytokines secretion (Svensson et al., 2016) and that printer-emitted-particles were able to produce *IL-6* and *IL-8* (Sisler et al., 2018). Our results showed moderate secretion of cytokines that seems to be in accordance with the activation of antioxidant responses suggesting an adaptive cell response (Cao et al., 2015; Fattman et al., 2003; Marchini et al., 2013). Overall, HC-OS particles appeared to induce a stronger inflammatory response and they were the only particles able to oxidize AA. The high content of metals in HC-OS particles probably drive the inflammatory response. Indeed, Fe, Al and Mn levels have shown to be crucial for the pro-inflammatory effects on the respiratory system (Shao et al., 2018) as well as Cu, Ni and Zn, which are able to induce cytokines release in BEAS-2B cells (Van Den Heuvel et al., 2016). Our results indicated a link between OP and the inflammatory response. However, various studies reported that in vitro inflammatory reactions is not associated with any OP assay (Gerlofs-Nijland et al., 2013; He et al., 2018; Øvrevik, 2019). To what extent particle composition is responsible for OP and biological responses as well as the link between OP and biological markers needs to be further characterized.

5. Conclusion

In conclusion, to our knowledge this is the first study characterizing the physico-chemical properties of smoke particles, assessing their oxidative potential and studying the biological effects on a small airway cell model grown at ALI. This study highlighted the importance to consider differences in chemical composition of smoke particles, when evaluating OP and in vitro biological effects. The combination of two

assays for OP assessment could provide complementary information on particle composition and relative contribution of chemical components on oxidative properties of smoke particles. Our results showed that particles triggered an adaptive antioxidant response leading to a moderate pro-inflammatory response. Additionally, we observed that OP^{DTT} and OP^{AA} could be good indicators for in vitro antioxidant and inflammatory responses, respectively. Finally, our study pointed out the need to further investigations on smoke particle toxicity in order to establish exposure guidelines in the scope of professional recurrent exposures. Scientific approach developed here could be used to study particles from other pyrotechnic activities such as domestic and commercial fireworks or gun fires at shooting ranges.

CRediT authorship contribution statement

Violaine Martin de Lagarde: Formal analysis, Investigation, Methodology, Visualization, Writing – original draft, Writing – review & editing. **Tiphaine Rogez-Florent:** Data curation, Formal analysis, Methodology, Resources, Software, Supervision, Validation, Writing – review & editing. **Fabrice Cazier:** Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Methodology, Writing – review & editing. **Dorothee Dewaele:** Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Methodology, Writing – review & editing. **Francine Cazier-Dennin:** Conceptualization, Methodology, Writing – review & editing. **Alexane Ollivier:** Investigation, Methodology. **Marion Janona:** Investigation, Methodology. **Sophie Achard:** Conceptualization, Writing – review & editing. **Véronique André:** Conceptualization, Writing – review & editing. **Christelle Monteil:** Conceptualization, Funding acquisition, Project administration, Supervision, Validation, Writing – review & editing. **Cécile Corbière:** Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Project administration, Resources, Software, Supervision, Validation, Visualization, Writing – review & editing.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

This work was supported by the Agence Nationale de la Recherche Française [ANR Astrid, Grant number ANR-15-ASTR-0023], as well as the Agence de l'Innovation de Defense (AID) and the Regional Council of Normandy for a Ph.D. scholarship. We thank the Direction Générale de l'Armement (DGA) for technical assistance during use of pyrotechnic smokes and for support in carrying out the study.

Appendix A. Supporting information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at doi:10.1016/j.ecoenv.2022.113637.

References

- Ayres, J.G., Borm, P., Cassee, F.R., Castranova, V., Donaldson, K., Ghio, A., Harrison, R. M., Hider, R., Kelly, F., Kooter, I.M., Marano, F., Maynard, R.L., Mudway, I., Nel, A., Sioutas, C., Smith, S., Baeza-Squiban, A., Cho, A., Duggan, S., Froines, J., 2008. Evaluating the toxicity of airborne particulate matter and nanoparticles by measuring oxidative stress potential—a workshop report and consensus statement. *Inhal. Toxicol.* 20 (1), 75–99. <https://doi.org/10.1080/08958370701665517>.
- Ballweg, K., Mutze, K., Königshoff, M., Eickelberg, I. O., Meiners, S., 2014. Cigarette smoke extract affects mitochondrial function in alveolar epithelial cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 307 (11), L895–L907. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00180.2014>.
- 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 (8), 4003–4019. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b03430>.
- Bengalli, R., Zerbini, A., Marchetti, S., Longhin, E., Priola, M., Camatini, M., Mantecchia, 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>.
- Betts, J.N., Johnson, M.G., Rygielwicz, P.T., King, G.A., Andersen, C.P., 2013. Potential for metal contamination by direct sonication of nanoparticle suspensions. *Environ. Toxicol. Chem.* 32 (4), 889–893. <https://doi.org/10.1002/etc.2123>.
- Calas, A., Uzu, G., Kelly, F.J., Houdier, S., Martins, J.M.F., Thomas, F., Molton, F., Charron, A., Dunster, C., Olette, A., Jacob, V., Besombes, J.-L., Chevrier, F., Jaffrez, J.-L., 2018. Comparison between five acellular oxidative potential measurement assays performed with detailed chemistry on PM10 samples from the city of Chamonix (France). *Atmos. Chem. Phys.* 18 (11), 7863–7875. <https://doi.org/10.5194/acp-18-7863-2018>.
- Cantin, A.M., 2010. Cellular response to cigarette smoke and oxidants: adapting to survive. *Proc. Am. Thorac. Soc.* 7 (6), 368–375. <https://doi.org/10.1513/pats.201001-014AW>.
- Cao, Y., Jantzen, K., Gouveia, A.C., Skovmand, A., Roursgaard, M., Loft, S., Møller, P., 2015. Automobile diesel exhaust particles induce lipid droplet formation in macrophages in vitro. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 40 (1), 164–171. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2015.06.012>.
- Chen, H., Samet, J.M., Bromberg, P.A., Tong, H., 2021. Cardiovascular health impacts of wildfire smoke exposure. *Part Fibre Toxicol.* 8 (1), 2. <https://doi.org/10.1186/s12989-020-00394-8>.
- Chiu, H.-F., Yang, C.-Y., 2013. Short-term effects of fine particulate air pollution on ischemic stroke occurrence: a case-crossover study. *J. Toxicol. Environ. Health Part A* 76 (21), 1188–1197. <https://doi.org/10.1080/15287394.2013.842463>.
- Cho, A.K., Sioutas, C., Miguel, A.H., Kumagai, Y., Schmitz, D.A., Singh, M., Eiguen-Fernandez, A., Froines, J.R., 2005. Redox activity of airborne particulate matter at different sites in the Los Angeles Basin. *Environ. Res.* 99 (1), 40–47. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2005.01.003>.
- Chowdhury, P.H., He, Q., Lasitzka Male, T., Brune, W.H., Rudich, Y., Pardo, M., 2018. Exposure of lung epithelial cells to photochemically aged secondary organic aerosol shows increased toxic effects. *Environ. Sci. Technol. Lett.* 5 (7), 424–430. <https://doi.org/10.1021/acs.estlett.8b00256>.
- Conte, E., Canepari, S., Frasca, D., Simonetti, G., 2017. Oxidative potential of selected PM components. *Proceedings* 1 (5), 108. <https://doi.org/10.3390/ecas2017-04131>.
- 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>.
- 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>.
- Dalby, O., Butler, D., Birkett, J.W., 2010. Analysis of gunshot residue and associated materials—a review. *J. Forensic Sci.* 55 (4), 924–943. <https://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2010.01370.x>.
- Danielsen, P.H., Møller, P., Jensen, K.A., Sharma, A.K., Wallin, H., Bossi, R., Autrup, H., Mølhave, L., Ravanat, J.-L., Briedé, J.J., de Kok, T.M., Loft, S., 2011. Oxidative stress, DNA damage, and inflammation induced by ambient air and wood smoke particulate matter in human A549 and THP-1 cell lines. *Chem. Res. Toxicol.* 24 (2), 168–184. <https://doi.org/10.1021/tx100407m>.
- Deng, X., Rui, W., Zhang, F., Ding, W., 2013. PM2.5 induces Nrf2-mediated defense mechanisms against oxidative stress by activating PI3K/AKT signaling pathway in human lung alveolar epithelial A549 cells. *Cell Biol. Toxicol.* 29 (3), 143–157. <https://doi.org/10.1007/s10565-013-9242-5>.
- Deng, X., Zhang, F., Rui, W., Long, F., Wang, L., Feng, Z., Chen, D., Ding, W., 2013. PM2.5-induced oxidative stress triggers autophagy in human lung epithelial A549 cells. *Toxicol. Vitro* 27 (6), 1762–1770. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2013.05.004>.
- Fang, T., Verma, V., Bates, J.T., Abrams, J., Klein, M., Strickland, M.J., Sarnat, S.E., Chang, H.H., Mulholland, J.A., Tolbert, P.E., Russell, A.G., Weber, R.J., 2016. Oxidative potential of ambient water-soluble PM_{2.5} in the southeastern United States: contrasts in sources and health associations between ascorbic acid (AA) and dithiothreitol (DTT) assays. *Atmos. Chem. Phys.* 16 (6), 3865–3879. <https://doi.org/10.5194/acp-16-3865-2016>.
- Fattman, C.L., Schaefer, L.M., Oury, T.D., 2003. Extracellular superoxide dismutase in biology and medicine. *Free Radic. Biol. Med.* 35 (3), 236–256. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(03\)00275-2](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(03)00275-2).
- 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 antioxidant response in human bronchial epithelial cells exposed to diesel exhaust particles. *Sci. Rep.* 10 (1), 3704. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59930-3>.
- Gao, D., Ripley, S., Weichenhals, 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.* 151, 7–25. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.04.028>.
- Geiser, M., Kreyling, W.G., 2010. Deposition and biokinetics of inhaled nanoparticles. *Part. Fibre Toxicol.* 7, 2. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-7-2>.
- Gerlofs-Nijland, M.E., Totlandsdal, A.I., Tzankiozis, T., Leseman, D.L.A.C., Samaras, Z., Låg, M., Schwarze, P., Ntziachristos, L., Cassee, F.R., 2013. Cell toxicity and oxidative potential of engine exhaust particles: impact of using particulate filter or biodiesel fuel blend. *Environ. Sci. Technol.* 47 (11), 5931–5938. <https://doi.org/10.1021/es305330y>.
- Godri, K.J., Duggan, S.T., Fuller, G.W., Baker, T., Green, D., Kelly, F.J., Mudway, I.S., 2010. Particulate matter oxidative potential from waste transfer station activity. *Environ. Health Perspect.* 118 (4), 493–498. <https://doi.org/10.1289/ehp.0901303>.
- Godri, K.J., Harrison, R.M., Evans, T., Baker, T., Dunster, C., Mudway, I.S., Kelly, F.J., 2011. Increased oxidative burden associated with traffic component of ambient particulate matter at roadside and urban background schools sites in London. *PLoS One* 6 (7), e21961. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021961>.
- Habre, R., Moshier, E., Castro, W., Nath, A., Grunin, A., Rohr, A., Godbold, J., Schachter, N., Kattan, M., Coull, B., Koutrakis, P., 2014. The effects of PM2.5 and its components from indoor and outdoor sources on cough and wheeze symptoms in asthmatic children. *J. Expo. Sci. Environ. Epidemiol.* 24 (4), 380–387. <https://doi.org/10.1038/jes.2014.21>.
- Hawley, B., L'Orange, C., Olsen, D.B., Marchese, A.J., Volckens, J., 2014. 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 (2), 505–514. <https://doi.org/10.1093/toxsci/ktu147>.
- He, R.-W., Shirmohammadi, F., Gerlofs-Nijland, M.E., Sioutas, C., Cassee, F.R., 2018. Pro-inflammatory responses to PM0.25 from airport and urban traffic emissions. *Sci. Total Environ.* 640–641, 997–1003. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.05.382>.
- Hemmilä, M., Hihkiö, M., Kasanen, J.-P., Turunen, M., Hautamäki, M., Pasanen, A.-L., Linnainmaa, K., 2007a. In vivo and in vitro evaluation of the acute toxicity, the genotoxicity, and the irritation potency of two hexachloroethane-based pyrotechnic smokes. *J. Toxicol. Environ. Health Part A* 70 (14), 1167–1181. <https://doi.org/10.1080/15287390701252691>.
- Hemmilä, M., Hihkiö, M., Linnainmaa, K., 2007b. Evaluation of the acute toxicity and genotoxicity of orange, red, violet and yellow pyrotechnic smokes in vitro. *Propellants Explos. Pyrotech.* 32 (5), 415–422. <https://doi.org/10.1002/prep.200700046>.
- Hemmilä, M., Hihkiö, M., Kasanen, J.-P., Turunen, M., Järvelä, M., Suhonen, S., Pasanen, A.-L., Norppa, H., 2010. Cytotoxicity and genotoxicity in vitro and irritation potency in vivo of two red phosphorus-based pyrotechnic smokes. *Mutat. Res.* 701 (2), 137–144. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2010.06.007>.
- Janssen, N.A.H., Yang, A., Strak, M., Steenhof, M., Hellack, B., Gerlofs-Nijland, M.E., Kuhlbusch, T., Kelly, F., Harrison, R., Brunekreef, B., Hoek, G., Cassee, F., 2014. Oxidative potential of particulate matter collected at sites with different source characteristics. *Sci. Total Environ.* 472, 572–581. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.11.099>.
- Juarez-Facio, A.T., Yon, J., Corbière, C., Rogez-Florent, T., Castilla, C., Lavanant, H., Mignot, M., Devouge-Boyer, C., Logie, C., Chevalier, L., Vaugeois, J.-M., Monteil, C., 2022a. Toxicological impact of organic ultrafine particles (UFPs) in human bronchial epithelial BEAS-2B cells at air-liquid interface. *Toxicol. Vitro* 78, 105258. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2021.105258>.
- 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., 2022b. Development of a standardized in vitro approach to evaluate microphysical, chemical, and toxicological properties of combustion-derived fine and ultrafine particles. *J. Environ. Sci.* 113, 104–117. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2021.06.001>.
- Karavalakis, G., Gysel, N., Schmitz, D.A., Cho, A.K., Sioutas, C., Schauer, J.J., Cocker, D. R., Durbin, T.D., 2017. Impact of biodiesel on regulated and unregulated emissions, and redox and proinflammatory properties of PM emitted from heavy-duty vehicles. *Sci. Total Environ.* 584–585, 1230–1238. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.01.187>.
- 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 (1), 7. <https://doi.org/10.1186/s12989-017-0186-4>.
- Koch, E.-C., 2008. Special materials in pyrotechnics: V. Military applications of phosphorus and its compounds. *Propellants Explos. Pyrotech.* 33 (3), 165–176. <https://doi.org/10.1002/prep.200700212>.
- Koehler, K.A., Shapiro, J., Sameenoi, Y., Henry, C., Volckens, J., 2014. Laboratory evaluation of a microfluidic electrochemical sensor for aerosol oxidative load. *Aerosol Sci. Technol.* 48 (5), 489–497. <https://doi.org/10.1080/02786826.2014.891722>.
- Künzli, N., Mudway, I.S., Götschi, T., Shi, T., Kelly, F.J., Cook, S., Burney, P., Forsberg, B., Gauderman, J.W., Hazenkamp, M.E., Heinrich, J., Jarvis, D., Norbäck, D., Payo-Losa, F., Poli, A., Sunyer, J., Borm, P.J.A., 2006. Comparison of oxidative properties, light absorbance, and total and elemental mass concentration of ambient PM 2.5 collected at 20 European Sites. *Environ. Health Perspect.* 114 (5), 684–690. <https://doi.org/10.1289/ehp.8584>.
- Lan, Y., Ng, C.T., Ong, C.N., Yu, L.E., Bay, B.H., 2021. Transcriptomic analysis identifies dysregulated genes and functional networks in human small airway epithelial cells exposed to ambient PM2.5. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 208, 111702. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111702>.
- 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 (4), 455–460. <https://doi.org/10.1289/ehp.6000>.
- Li, N., Alam, J., Venkatesan, M.I., Eiguen-Fernandez, A., Schmitz, D., Di Stefano, E., Slaughter, N., Killeen, E., Wang, X., Huang, A., Wang, M., Miguel, A.H., Cho, A., Sioutas, C., Nel, A.E., 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 (5), 3467–3481. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.5.3467>.

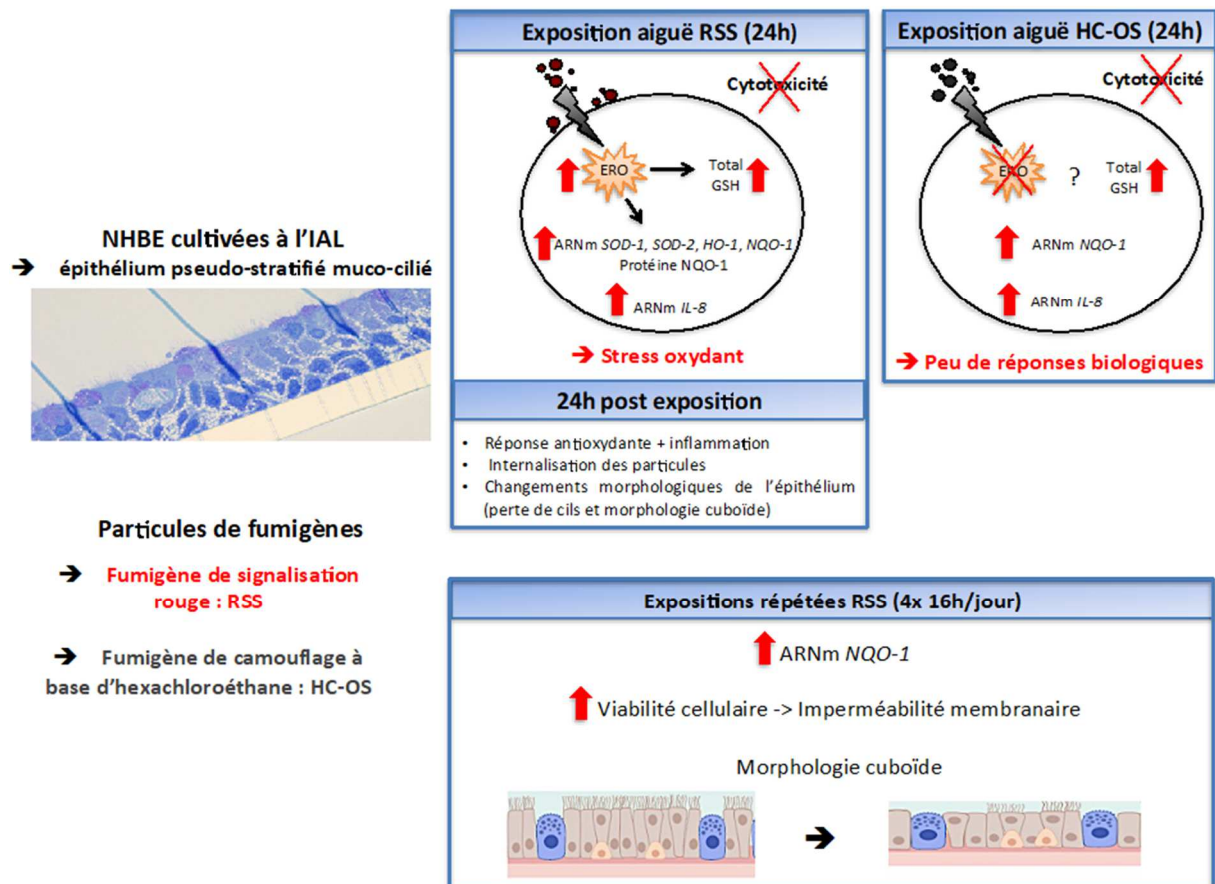
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* 25 (4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.
- Luo, F., Guo, H., Yu, H., Li, Y., Feng, Y., Wang, Y., 2021. PM2.5 organic extract mediates inflammation through the ER β pathway to contribute to lung carcinogenesis in vitro and vivo. *Chemosphere* 263, 127867. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127867>.
- Madrigano, J., Kloog, I., Goldberg, R., Coull, B.A., Mittleman, M.A., Schwartz, J., 2013. Long-term Exposure to PM 2.5 and Incidence of Acute Myocardial Infarction. *Environ. Health Perspect.* 121 (2), 192–196. <https://doi.org/10.1289/ehp.1205284>.
- Marchini, T., Magnani, N.D., Paz, M.L., Vanasco, V., Tasat, D., González Maglio, D.H., Alvarez, S., Evelson, P.A., 2013. Time course of systemic oxidative stress and inflammatory response induced by an acute exposure to Residual Oil Fly Ash. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 274 (2), 274–282. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2013.11.013>.
- Nachman, K.E., Parker, J.D., 2012. Exposures to fine particulate air pollution and respiratory outcomes in adults using two national datasets: a cross-sectional study. *Environ. Health* 11 (1), 25. <https://doi.org/10.1186/1476-069X-11-25>.
- National Research Council (US) Subcommittee on Military Smokes and Obscurants, 1997. *Toxicity of Military Smokes and Obscurants, Volume 1*. National Academies Press.
- National Research Council (US) Subcommittee on Military Smokes and Obscurants, 1999a. *Toxicity of Military Smokes and Obscurants*. National Academies Press.
- National Research Council (US) Subcommittee on Military Smokes and Obscurants, 1999b. *Toxicity of Military Smokes and Obscurants, Volume 3*. National Academies Press.
- Oberdörster, G., Oberdörster, E., Oberdörster, J., 2005. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ. Health Perspect.* 113 (7), 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 (19), 4772. <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 (3), 1399–1440. <https://doi.org/10.3390/biom5031399>.
- 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.* 23 (10), 9862–9870. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6228-x>.
- Shao, J., Wheeler, A.J., Chen, L., Strandberg, B., Hinwood, A., Johnston, F.H., Zosky, G. R., 2018. The pro-inflammatory effects of particulate matter on epithelial cells are associated with elemental composition. *Chemosphere* 202, 530–537. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.03.052>.
- Sisler, J.D., Shaffer, J., Soo, J.-C., LeBouf, R.F., Harper, M., Qian, Y., Lee, T., 2018. In vitro toxicological evaluation of surgical smoke from human tissue. *J. Occup. Med. Toxicol.* 13 (1), 12. <https://doi.org/10.1186/s12995-018-0193-x>.
- Smith, J.D., Barratt, B.M., Fuller, G.W., Kelly, F.J., Loxham, M., Nicolosi, E., Priestman, M., Tremper, A.H., Green, D.C., 2020. PM2.5 on the London Underground. *Environ. Int.* 134. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.105188> (105188).
- Svensson, C.R., Ameer, S.S., Ludvigsson, L., Ali, N., Alhamdow, A., Messing, M.E., Pagels, J., Gudmundsson, A., Bohgard, M., Sanfins, E., Kåredal, M., Broberg, K., Rissler, J., 2016. Validation of an air-liquid interface toxicological set-up using Cu, Pd, and Ag well-characterized nanostructured aggregates and spheres. *J. Nanopart. Res.* 18 (4), 86. <https://doi.org/10.1007/s11051-016-3389-y>.
- Tannenbaum, J., Bennett, B.T., 2015. Russell and Burch's 3Rs then and now: the need for clarity in definition and purpose. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.: JAALAS* 54 (2), 120–132.
- Totlandsdal, A.I., Cassee, F.R., Schwarze, P., Refsnes, M., Låg, M., 2010. Diesel exhaust particles induce CYP1A1 and pro-inflammatory responses via differential pathways in human bronchial epithelial cells. Part. *Fibre Toxicol.* 7 (1), 41. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-7-41>.
- Van Den Heuvel, R., Den Hond, E., Govarts, E., Colles, A., Koppen, G., Staelens, J., Mampaey, M., Janssen, N., Schoeters, G., 2016. Identification of PM 10 characteristics involved in cellular responses in human bronchial epithelial cells (Beas-2B). *Environ. Res.* 149, 48–56. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2016.04.029>.
- van Hulst, M., Langenberg, J.P., de Klerk, W.P.C., Alblas, M.J., 2017. Acute toxicity resulting from human exposures to military smokes. *Propellants Explos. Pyrotech.* 42 (1), 17–23. <https://doi.org/10.1002/prep.201600223>.
- Vattanasiit, U., Navasumrit, P., Khadka, M.B., Kanitwihayanun, J., Promvijit, J., Autrup, H., Ruchirawat, M., 2014. Oxidative DNA damage and inflammatory responses in cultured human cells and in humans exposed to traffic-related particles. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 217 (1), 23–33. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2013.03.002>.
- Verma, V., Fang, T., Xu, L., Peltier, R.E., Russell, A.G., Ng, N.L., Weber, R.J., 2015. Organic aerosols associated with the generation of reactive oxygen species (ROS) by water-soluble PM 2.5. *Environ. Sci. Technol.* 49 (7), 4646–4656. <https://doi.org/10.1021/es505577w>.
- Visentin, M., Pagnoni, A., Sarti, E., Pietrogro, M.C., 2016. Urban PM2.5 oxidative potential: importance of chemical species and comparison of two spectrophotometric cell-free assays. *Environ. Pollut.* 219, 72–79. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.09.047>.
- Wang, H., Shen, X., Liu, J., Wu, C., Gao, J., Zhang, Z., Zhang, F., Ding, W., Lu, Z., 2019. The effect of exposure time and concentration of airborne PM2.5 on lung injury in mice: a transcriptome analysis. *Redox Biol.* 26, 101264. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101264>.
- Williams, L.J., Chen, L., Zosky, G.R., 2017. The respiratory health effects of geogenic (earth derived) PM10. *Inhal. Toxicol.* 29 (8), 342–355. <https://doi.org/10.1080/08958378.2017.1367054>.
- Wu, Z., Shi, P., Lim, H.K., Ma, Y., Setyawati, M.I., Bitounis, D., Demokritou, P., Ng, K.W., Tay, C.Y., 2020. Inflammation increases susceptibility of human small airway epithelial cells to pneumonic nanotoxicity. *Small* 16 (21), 2000963. <https://doi.org/10.1002/sml.202000963>.
- Xiao, G.G., Wang, M., Li, N., Loo, J.A., Nel, A.E., 2003. Use of proteomics to demonstrate a hierarchical oxidative stress response to diesel exhaust particle chemicals in a macrophage cell line. *J. Biol. Chem.* 278 (50), 50781–50790. <https://doi.org/10.1074/jbc.M306423200>.
- Yu, H., Wei, J., Cheng, Y., Subedi, K., Verma, V., 2018. Synergistic and antagonistic interactions among the particulate matter components in generating reactive oxygen species based on the dithiothreitol assay. *Environ. Sci. Technol.* 52 (4), 2261–2270. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b04261>.
- Zhang, W., Li, Q., Tang, M., Zhang, H., Sun, X., Zou, S., Jensen, J.L., Liou, T.G., Zhou, A., 2019. A multi-scale approach to study biochemical and biophysical aspects of resveratrol on diesel exhaust particle-human primary lung cell interaction. *Sci. Rep.* 9 (1), 18178. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54552-w>.
- Zielinski, H., Mudway, I.S., Bérubé, K.A., Murphy, S., Richards, R., Kelly, F.J., 1999. Modeling the interactions of particulates with epithelial lining fluid antioxidants. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 277 (4) <https://doi.org/10.1152/ajplung.1999.277.4.L719> (L719–L7726).

2. Article 2

Toxicity of acute and repeated exposures to particles from pyrotechnic smokes in normal human bronchial epithelial (NHBE) cells 3D culture

Violaine Martin de Lagarde et al- in preparation

2.1 Résumé graphique



2.2 Contexte

Les fumigènes sont principalement utilisés dans un cadre militaire, pour le camouflage et la signalisation, lors d'opérations ou pendant les entraînements des soldats.

Les fumigènes de camouflage à base d'hexachloroéthane (HC) et les fumigènes colorés (rouge, orange, jaune, vert, bleu, violet) provoquent de nombreux effets pulmonaires, à des degrés de sévérité différents. Les fumigènes sont un mélange complexe de produits chimiques dont la combustion génère un aérosol, composé de gaz et de particules en suspension. Ces particules sont des particules fines voire ultrafines qui sont donc capables de se déposer profondément dans l'appareil respiratoire. Les mécanismes cellulaires liés à l'inhalation de ces particules sur la toxicité respiratoire de ces fumigènes ont été très peu étudiés. Dans notre précédente étude, nous avons montré que des particules de différents types de fumigènes possédaient un potentiel oxydant et étaient capables d'induire des réponses antioxydantes et inflammatoires sur un modèle de cellules épithéliales bronchiolaires (SAEC) cultivé à l'IAL.

2.3 Objectifs

Dans cette étude, nous nous sommes focalisés sur deux types de fumigène, un fumigène de signalisation de couleur rouge (RSS) et un fumigène de camouflage à base d'hexachloroéthane (HC-OS) permettant de générer deux types de particules caractérisées lors de la première étude. L'objectif ici a été d'explorer davantage les mécanismes cellulaires impliqués, après expositions aiguës (24h) ou répétées (4 traitements de 16h/jour) et en particulier le stress oxydant et les changements morphologiques associés. Pour cela, nous avons choisi un modèle cellulaire trachéo-bronchique (NHBE), présentant un phénotype proche de l'épithélium physiologique. Ce modèle permet en effet d'obtenir un épithélium pseudo-stratifié mucociliaire, adapté à l'étude des mécanismes d'action toxique et aux expositions répétées.

2.4 Principaux résultats

Après exposition de 24h aux particules de fumigènes, aucun effet significatif sur la viabilité cellulaire (MTT, cycle cellulaire, production d'ATP). Une production rapide d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) est détectée après expositions d'1h et 4h aux particules RSS, production prolongée après 24h d'exposition. En réponse à cette production d'ERO, nous observons une forte réponse antioxydante caractérisée par une augmentation du glutathion total, de l'expression génique de *SOD-1*, *SOD-2*, *HO-1* et *NQO-1* ainsi qu'une augmentation de l'expression protéique de NQO-1. De plus, 24h après la fin de l'exposition, les expressions de *SOD-1*, *SOD-2* et *NQO-1* sont toujours augmentées ainsi

que l'expression protéique de NQO-1. Une exposition de 24h aux particules HC-OS n'a n'induit qu'une faible réponse antioxydante, sans production d'ERO, se traduisant par une augmentation de l'ARNm de *NQO-1* et d'une augmentation de la concentration en glutathion total.

Une augmentation du marqueur pro-inflammatoire IL-8 au niveau de son expression génique est observée pour les deux types de particules, plus prononcée pour les particules RSS qui augmentent l'expression de l'*IL-8* à toutes les concentrations testées. Enfin, l'expression de l'*IL-8* est toujours induite 24h après la fin de l'exposition aux particules RSS, ce qui indique des effets durables après l'exposition.

Une étude réalisée par microscopie électronique a par ailleurs permis de mettre en évidence une internalisation des particules et des changements morphologiques de l'épithélium tels qu'une perte de cils, 24h après la fin de l'exposition aiguë aux particules RSS.

Après des expositions répétées, les particules RSS ont montré une faible réactivité, marquée seulement par une augmentation de l'expression de *NQO-1*. Cependant, nous avons relevé une augmentation faible mais significative de la viabilité cellulaire, à la dose la plus forte, qui semble être en lien avec une augmentation de l'imperméabilité de l'épithélium ainsi qu'avec les changements morphologiques cubiques des cellules.

2.5 Conclusion

En conclusion, les particules RSS ont induit après exposition aiguë un stress oxydant, caractérisé par une production d'ERO, une augmentation des défenses antioxydantes et de marqueurs inflammatoires. Cette réponse est maintenue 24h après la fin de l'exposition, probablement en lien avec l'internalisation des particules et les changements morphologiques de l'épithélium observés. Les particules HC-OS ont généré une réponse plutôt adaptative des cellules NHBE après exposition aiguë, marquée par une faible réponse antioxydante. Aucun stress oxydant n'a été mis en évidence après les expositions répétées aux particules RSS mais les changements morphologiques ont été persistants. Ce travail a permis de montrer que les cellules NHBE cultivées à l'IAL constituent un modèle pertinent pour évaluer la toxicité des particules. L'ensemble de ces résultats a permis de mieux appréhender les mécanismes de toxicité des particules de fumigène et les modifications morphologiques de l'épithélium respiratoire.

Toxicity of acute or repeated exposures to particles from pyrotechnic smokes in normal human bronchial epithelial (NHBE) cells 3D culture

Violaine Martin de Lagarde^{1*} et al

Université de Rouen Normandie, UNIROUEN, ABTE, 76000 Rouen, France

Université de Caen Normandie, UNICAEN, ABTE, 14000 Caen, France

Université de Rouen Normandie, UNIROUEN, INSA Rouen, CNRS, GPM-UMR6634, 76000 Rouen, France

Université du Littoral Côte d'Opale, CCM - Centre Commun de Mesures, 59 375 Dunkerque, France

Université du Littoral Côte d'Opale, EA 4492 - UCEIV - Unité de Chimie Environnementale et Interactions sur le Vivant, SFR Condorcet FR CNRS 417, 59 375 Dunkerque, France.

Université de Paris, Faculté de Pharmacie, Inserm UMR1153 – CRESS, HERA « Health Environmental Risk Assessment », 75005 Paris, France

*Corresponding authors: Cécile Corbière, Violaine Martin de Lagarde, Normandie Univ, UNIROUEN, UNICAEN, ABTE, 76000 ROUEN, France UFR Santé, Bâtiment recherche, 22 boulevard Gambetta, 76000 Rouen +33235148522 E-mail: cecile.corbiere@univ-rouen.fr ; violaine.delagarde@gmail.com

Abstract

Hexachloroethane (HC) based smokes and colored pyrotechnic smokes are widely used in the military field, as screening and signalling smokes, that are reported to cause pulmonary toxic effects in humans and in animal studies. Toxicity of pyrotechnic smokes might be caused by the inhalation of particles that composed the smoke and gives the desired pyrotechnic effect. In a previous study, we showed that smoke particles from a red signalling smoke (RSS) and from an HC obscuring smoke (HC-OS) have an intrinsic oxidative potential and induce an adaptive response in human small airway epithelial cells after an acute exposure. Thus, the aim of this study was to further explore the underlying mechanisms of toxicity, in particular oxidative stress response of RSS and HC-OS particles, by using a 3D model of normal human bronchial epithelial cells (NHBE) cultured at the air-liquid interface (ALI). Acute exposure (24h) to RSS particles induced an oxidative stress response characterized by ROS production, increases of glutathione level and *SOD-1*, *SOD-2*, *Catalase*, *HO-1*, *NQO-1* and *IL-8* mRNA, as well as NQO-1 protein expression. Acute exposure to HC-OS particles induced a weak antioxidant response, characterized by increases of glutathione level and *NQO-1* mRNA. We noticed that 24h post exposure to RSS particles, antioxidant response was still induced. Additionally, 24h post exposure to RSS particles revealed internalization of particles and morphological changes in NHBE cells like loss of cilia and a more cubic epithelium. Because of the strong responses induced by acute exposure to RSS particles, we performed repeated exposures on cells. Surprisingly, repeated exposures did not induce oxidative stress while cubic changing aspects of NHBE cells were more obvious to observe. Thus, although further studies are needed to understand the mechanisms underlying these cubic changes, these results revealed differences in toxicity responses between the two types of particles, characterized by an RSS particles-induced oxidative stress as well as morphologic changes. Overall, this study provides a better overview of the toxic effects of pyrotechnic smoke particles whose toxic risks were very little studied.

Keywords

Pyrotechnic smoke particles, normal human bronchial epithelial cells, primary 3D culture, acute and repeated exposures, oxidative stress, internalization

Abbreviations

RSS: red signalling smoke; HC-OS: hexachloroethane-based obscuring smoke

1. Introduction

Pyrotechnics are defined by the area of technology that deals with the application of self-contained and self-sustained exothermic chemical reactions of solids to produce heat, light, sound, smoke, motion, combinations of these, and/or useful reaction products (Kosanke et al., 2013). Pyrotechnics are very well known in form of fireworks displays, a major source of entertainment on holidays and special events all over the world. A major application of pyrotechnics is the military field for the production of light, ignite devices used in the artillery and production of smokes for signaling and obscuring or screening, in operations or for the training of soldiers. Pyrotechnics smokes are a complex mixture of several compounds including an oxidizer, a reducing agent which is the fuel, and various other additives, generating an aerosol, composed of gas and particles in suspension, allowing the desired pyrotechnic effect (Hemmilä, Hihkiö, & Linnainmaa, 2007).

The most commonly screening smoke used is one based with hexachloroethane (HC) and a metallic fuel, usually zinc (Zn) (Conkling & Morcella, 2018), generating a greyish-white smoke (ZnCl_2) with excellent hiding capacity. Exposure to HC/Zn based smoke on soldiers is reported to cause mucosal irritation, coughing, sore throat, nausea, and vomiting, within the several hours to one day, followed by a second wave of respiratory inflammation (dyspnoea, cough, fever, and malaise) taking up to several weeks to abate (El Idrissi et al., 2017). Delayed inflammatory response may trigger by inhaled ZnCl_2 particles (El Idrissi et al., 2017). In some cases, in confined spaces, exposure to ZnCl_2 smoke can lead to death (Holmes, 1999; Macaulay & Mant, 1964; Pettilä et al., 2000). *In vivo* studies are in line with those symptoms observed in humans (National Research Council (U.S.), 1997b). For signaling purposes a diversity of colored smokes are used, composed of an organic dye generally from the anthraquinone family. Toxicity of exposure to colored smokes have never been reported in humans except for individual dyes that showed to cause skin irritation (National Research Council (U.S.), 1999). *In vivo* studies on aerosol generated by various colored smokes showed pulmonary irritations (salivation, dyspnea up to seven days after exposure) and damages like pulmonary necrosis, mucosa desquamation, alveolar oedema, chronic pneumoniae or pulmonary inflammation (National Research Council (U.S.), 1999). More recently, a report realized in rats of a red smoke composed of 1-isopropylamino-anthraquinone showed that repeated exposures caused hyperplasia of the nasal epithelium, sometimes accompanied by degeneration of the nasal mucosa (Crouse et al., 2017). After 4 weeks of rest, these nasal lesions had disappeared.

The cellular mechanisms underlying the respiratory toxicity of colored and HC based smokes have been little studied (Hemmilä et al., 2010, 2013; Hemmilä, Hihkiö, Kasanen, et al., 2007a; Hemmilä, Hihkiö, & Linnainmaa, 2007; van Hulst et al., 2013). HC-based smokes like HC/Zn or HC/Zn/2,4,6-trinitrotoluene (TNT) have been reported to strongly reduce cell viability and have genotoxic effects on BEAS-2B cells (Hemmilä et al., 2010; Hemmilä, Hihkiö, Kasanen, et al., 2007a). Colored smoke is often composed of mixtures of dyes whose proportions may vary from one manufacturer to another. Depending on their chemical composition, colored smokes can have cytotoxic and genotoxic effects on BEAS-2B and A549 cells (Hemmilä et al., 2013; Hemmilä, Hihkiö, & Linnainmaa, 2007; van Hulst et al., 2013). However, the pathophysiological mechanisms of combustion products from pyrotechnic smokes inducing pulmonary toxicity remains unclear.

Beside the risks of explosion and the direct inhalation of gas, toxicity of pyrotechnic smokes can come from the inhalation of particles. Thus, occupational exposure toxicity of pyrotechnic smokes of military personnel have been rising concerns about the health risks associated with their use. Short term exposure is often indicated to cause irritation of the upper respiratory tract and also affects deeper airways, but there are still many uncertainties about the severity of these health effects, particularly after repeated exposures. It is well known that toxicity of air pollution particles have been linked to their small size allowing to reach distal lung region (Kwon et al., 2020; Terzano et al., 2010) and by their complex chemical composition of ions, metals, organic compounds and biological contaminants (Kelly & Fussell, 2015; Steenhof et al., 2011). According to the smoke type, the particles emitted have various sizes, with an aerodynamic diameter $< 5 \mu\text{m}$ (Karlsson et al., 1991), or $< 2 \mu\text{m}$ (Hemmilä et al., 2013; van Hulst et al., 2017), or $< 1 \mu\text{m}$ (Hemmilä, Hihkiö, & Linnainmaa, 2007), or $< 400 \text{ nm}$ (Martin de Lagarde et al., 2022). Our previous study showed that smoke particles from a red signalling smoke (RSS) or an hexachloroethane-based obscuring smoke (HC-OS) are highly concentrated in ions (NO_3^- , K^+ , Cl^-), in metal elements (Al, Ba, Ca, Cu, Fe, K, Mg, Na, S, Sb, Sn, Zn,) and in organic components (quinones, chlorinated organic components and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) like naphthalene derivatives) (Martin de Lagarde et al., 2022). The results from this study demonstrated that the both types of smoke particles have an intrinsic oxidative potential and were able to induce an antioxidant and inflammatory responses in primary Small Airway Epithelial Cells (SAEC) that was dependant of particle composition. Particles mediated antioxidant response associated with inflammation are well known mechanisms of oxidative stress that could lead to airway epithelium damages (Falcon-Rodriguez et al., 2016; Sethi et al., 2019). 3D pulmonary cell models such as normal human

bronchial epithelial cells (NHBE) grown at air-liquid interface (ALI) appeared to be very relevant to study particle toxicity as well as internalization of particles and structural changes of the airway epithelium (Aufderheide et al., 2015; Boublil et al., 2013; Ghio et al., 2013; Platel et al., 2020; Sotty et al., 2019).

Thus, the aim of this study was to explore the oxidative stress mediated by RSS and HC-OS particles, on a 3D model of NHBE cells that when grown at ALI exhibits a pseudostratified epithelium with a mucociliary function (Bérubé et al., 2010; Boublil et al., 2013; Juarez-Facio et al., 2022; Rayner et al., 2019). Cytotoxicity, ROS production, antioxidant and inflammation markers were analysed. Moreover, we investigated the morphological changes of the airway epithelium and the fate of smoke particles.

2. Material and methods

2.1. Particle sampling

Particles from RSS and HC-OS were collected on cascade impactors and prepared for particles suspensions as previously described in (Martin de Lagarde et al., 2022).

2.2. NHBE cell culture and particle treatments

Primary NHBE cells (ATCC, USA) were obtained from biopsy isolated from a healthy donor. Firstly, the cells were grown for 5 days in T-75cm² flasks with Airway Epithelial Cell Basal Medium (ATCC, USA), supplemented with the Bronchial Epithelial Cell Growth Kit (ATCC, USA) and 0.1% (v/v) penicillin/streptomycin (10 Units/mL; GIBCO, USA). Between 70 and 80% confluency, NHBE cells were trypsinized and seeded at 90 000 cells/insert on transwells polyester permeable membrane cell culture inserts (12 mm diameter, pore size 0.4 µm, Costar, Corning®) pre-coated with a 30 µg/mL collagen solution (Rat Tail Collagen Type 1, Corning®) in PBS for 1 hour at 37°C. At confluence, cells were placed under Air-Liquid Interface (ALI) conditions by removing the apical medium and replacing the basal medium by PneumaCult-ALI Basal Medium (STEMCELL Technologies, Canada) supplemented with PneumaCult-ALI 10X Supplement, PneumaCult-ALI Maintenance supplement 100X (ATCC, USA) and hydrocortisone (2 µmol/L) (STEMCELL Technologies, Canada). ALI culture was maintained for 14 days, allowing progressive

differentiation of cells into ciliated, goblet and basal cell types within a pseudo-stratified epithelium (Juarez-Facio et al., 2022). The cells were maintained at 37 °C in 95% humidified air with 5% CO₂ and the medium was changed every two days. Three days before exposure, mucus production was removed by gentle rinsing with medium.

After 14 days of culture at ALI conditions, the exposures were performed by directly depositing particle suspensions of RSS and HC-OS (0.2 mL) on the apical side of cells at 37 °C in a humidified 5% CO₂ atmosphere (**Fig. 1**). NHBE cells were exposed to smoke particles for 1h, 4h or 24h (6.25, 12.5, 25 and 50 µg/cm²). At the end of exposure, before collection of the cells, a rinse with PBS of the epithelium surface was performed. To study reversibility of responses, an additional condition corresponding to an incubation of 24 hours post-exposure was carried out. A repeated exposure protocol was also performed with four successive particle treatments of 16h per day (3.125 and 12.5 µg/cm²). As reference control, cells were exposed to 0.2 mL of PBS under the same conditions. Cells maintained in ALI conditions are also used as reference air control.

2.3. Cell viability assay

Cell viability was determined using the MTT assay 24h of exposure to particles and repeated exposures to RSS particles. Briefly, after exposure, 50 µl of MTT reagent (5 mg/mL) was added to basal medium and incubated for 3h at 37°C. After incubation, dimethyl sulfoxide (DMSO) was added on each transwell and mixed thoroughly. The optical density at 570 nm was measured with a microplate reader (SAFAS Xenius, Safas, Monaco). Each test was repeated independently at least three times. Results are expressed as % viability = (Absorbance in the sample / Absorbance in the control PBS) x 100. Data were expressed as mean value ± SD of at least three independent experiments.

2.4. Cell cycle analysis by flow cytometry

Cell cultures after 24h of exposure to particles and repeated exposures to RSS particles were dissociated with trypsin–EDTA, resuspended, fixed and permeabilized with ethanol (70%) for 30 min at 4°C. Resulting samples were spun down and resuspended in 0.5 mL of FxCycle™ PI/RNase Staining Solution (Thermofisher, France) stain to each flow cytometry sample for 20 min. Cells were then analysed by flow cytometry (Attune's Next, Thermofisher, France) with

ten thousand events analysed per sample. Results are expressed as % of cells in each phases of cell cycle.

2.5. ATP level

Extraction and measurement of ATP level, after 24h of exposure to particles and repeated exposures to RSS particles, by high performance liquid chromatography coupled with a diode array detector (HPLC-DAD, 1260 Infinity II, Agilent Technologies) were realized as previously described in (Juarez-Facio et al., 2021). Results are expressed as ratio relative to the control.

2.6. Detection of ROS production

Intracellular ROS generation was assessed using the fluorescent MitoSox Red Mitochondrial Superoxide Indicator (Invitrogen, France) probe dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) at 5 mM diluted to 10 μ M in PBS. After 1h, 4h or 24h of exposure to particles, cells were washed and were incubated with the probe (0.2 mL per insert) for 10 min at 37°C. Cells were then washed twice with PBS and fluorescence was measured at 580 nm on a microplate reader Spark® (TECAN Trading AG, Switzerland). Results are expressed as ratio relative to the control.

2.7. Total glutathione quantification

Total glutathione quantification was performed from supernatants obtained from ATP quantification, after 24h of exposure to particles and repeated exposures to RSS particles. Briefly, 20 μ l of the sample, 20 μ l of buffer (160 mM Na₂H₂PO₄; 8 mM EDTA, pH 7.4), 200 μ l of buffer reagent 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. The reagent buffer consisted of NADPH (0.4 mM), DTNB (1 mM) and methanol (10%) (VWR, France) in buffer. Glutathione concentrations were determined from a standard curve and normalized to protein content (Lowry assay). Results are expressed as ratio relative to the control.

2.8. mRNA expression measurements by quantitative real time RT-PCR

Total RNA was isolated from cells using TRI-REAGENT® (Sigma-Aldrich, France) according to the manufacturer's instructions. The "AffinityScript QPCR cDNA Synthesis Kit with OligodT" (Agilent Technologies) was used to reverse transcribe mRNA in each sample into cDNA, and quantitative real-time PCR (qPCR) was performed to determine the transcript levels of the target genes' transcript with the "Brilliant III Ultra-fast SYBR Green QPCR Master Mix" (Agilent Technologies) using a thermocycler (Stratagene Mx3005P, Agilent Technologies). β 2M was used as the internal reference gene and the relative expression of superoxyde dismutase -1 (SOD-1) and -2 (SOD-2), Catalase, heme oxygenase-1 (HO-1), NAD(P)H quinone dehydrogenase-1 (NQO-1) and interleukine-8 (IL-8) were calculated using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method (Livak and Schmittgen, 2001). mRNA markers were measured after 24h of exposure to particles, 24h post exposure to RSS particles and after repeated exposures to RSS particles.

2.9. Western blot

Proteins were extracted after 24h of exposure to RSS particles and 24h post exposure. Extraction was performed with RIPA Lysis Buffer (Merck) diluted 1:10 in ultra pure sterile water supplemented with Phosphatase and Protease Inhibitor Cocktail 100X (Thermofisher Scientific, France) at 4°C. Protein quantification was made with the Bradford protein assay. 12 μ g of proteins per sample were separated in 10% TGX Stain-Free polyacrylamide gel (Bio-Rad Laboratories, France) using Mini-PROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad Laboratories) and transferred to nitrocellulose membranes (Amersham Protran 0.45 NC) using Trans-Blot® Turbo™ Transfer System (Bio-Rad Laboratories). Primary antibodies against various proteins, Catalase (Novus Biologicals, California, USA), MnSOD (Aviva System Biology, Clinisciences, France), CuZnSOD (Cusabio, Clinisciences, France), NQO-1 (St John's Laboratory, London, UK), HO-1 (BioVision, Clinisciences, France), β -actin (Sigma-Aldrich, Missouri, USA), were used after having been diluted, and their binding was detected using Peroxidase AffiniPure Donkey Anti-Mouse IgG (H+L) or Peroxidase AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch Europe, UK) followed by enhanced chemiluminescence reagents (Bio-Rad Laboratories). Antibodies against GAPDH (Cell Signalling Technology, Massachusetts, USA), as internal control, was also used. The results

were analyzed with a ChemiDoc Imaging System (Bio-Rad Laboratories). Results are expressed as ratio relative to the control.

2.10. *Epithelium permeability*

After 24h of exposure to particles and repeated exposure to RSS particles, fluorescein-5-isothiocyanate (FITC)-dextran 70 kDa (Sigma-Aldrich) was applied to the apical side of cells and incubated for 2 hours at 37°C. After washing the cells, fluorescence was measured at 535 nm on a microplate reader Spark® (TECAN Trading AG, Switzerland). Results are expressed as ratio relative to the control.

2.11. *EM sample preparation*

Preparation to Electron Microscopy is based on an original EM combined approach involving SEM and TEM observations on a single prepared procedure and is described elsewhere in (Chevalier et al., 2022). Briefly, NHBE cells exposed to 24h to RSS particles (50 µg/cm²) and 24h post exposure as well as repeated exposures to RSS particles (12.5 µg/cm²) 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).

Ultrathin sections (70nm – 80nm) were cut using a UC7 ultramicrotome (Leica-microsystems- Vienna) and placed at once on silicon wafer previously hydrophilized by plasma AR/O2 (RF50W, Ar 35.0 sccm, O2 11.5 sccm) for 4 min (Plasma Cleaner-GATAN- Ametek-USA) for SEM-observations and 400-mesh carbon coated gold-grids for TEM-analysis.

2.11.1. SEM-observations

Serial ultrathin sections collected on wafer were stained for 1 min with a uranyl- less solution (Delta microscopy-France) containing high heavy lanthanum and gadolinium salts, and then were platinum-coated (1 nm) with a precision etching and coating system (PECS-Gatan-Ametek-USA). Electron micrographs were acquired on SEM JEOL 7900 F using the gentle super high-resolution stage bias mode. This function improves high resolution at any accelerating voltage and is particularly well adapted to an insulator biological sample. This mode decelerates the illuminated electron beam and accelerates the electron signal using a biased voltage for the sample (HT 7 kV, probe 2.4 nA, WD 3 mm). Images were obtained with the high ultrasensitive backscattered detector improving Z-contrast at low accelerating voltage.

2.11.2. (S)TEM-analysis

Analytical and high-resolution TEM imaging were performed at 80 kV on a JEOL JEM ARM200F (JEOL,Tokyo, Japan) setting with a field emission gun (FEG) and a probe Cs aberration corrector. This TEM is equipped with an energy electron loss spectrometer (GIF-Quantum ER—Gatan-Ametek, USA) upgraded with the Dual EELS option allowing the simultaneous acquisition of two-electron spectra at desired energy. STEM-EDS was also used to investigate the distribution of smoke particles into the NHBE cells. Elemental maps were acquired at 80 kV in STEM mode with an 8C probe size, a camera length of 8 cm, and a 50 μm condenser aperture with an SDD detector XMax TLE (Resolution: 127 eV MnK 0.7 sr; Oxford-Instruments, Abington, England), with a beam current around 518 pA/cm². When the limit of detection was achieved especially for nanometric particle, elemental mapping was performed by energy loss spectrometry as alternative solution. In this case spectra were collected with a 8C probe size, 3 cm length camera, 50 μm condenser lens aperture diameter and 5.0 mm GIF entrance diameter.

2.12. Statistical analysis

Results were obtained from at least three independent experiments. Data were analyzed by a non-parametric Mann-Whitney test using GraphPadPrism v9 software. Values of $p \leq 0.05$ are considered to be statistically significant.

3. Results

3.1. Cell viability after 24h exposure to particles

Cell viability of NHBE cells after 24h of exposure to RSS particles or HC-OS particles was evaluated by MTT, measurement of ATP levels (**Table 1**) and by exploration of cells distribution in cell cycle phases (**Supp data, Table S1**). No changes in viability for all the concentrations tested is observed for both types of particles and for any of the methods used.

Table 1: Cell viability after 24h exposure to RSS or HC-OS particles (6.25 12.5 ; 25 ; 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$). MTT assay : results are presented as percentage of cell viability compared to the control (cells cultured with PBS). ATP: results are expressed as ratio relative to the control (cells cultured with PBS). Data were expressed as mean value $\pm$ SD ($n \geq 3$). * $p \leq 0.05$

<i>Concentration</i> ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	<i>RSS particles</i>		<i>HC-OS particles</i>	
	% cell viability <i>MTT assay</i>	ATP (fold change)	% cell viability <i>MTT assay</i>	ATP (fold change)
0	100 $\pm$ 4	1 $\pm$ 0.2	100 $\pm$ 5	1 $\pm$ 0.2
6.25	93 $\pm$ 8	0.95 $\pm$ 0.1	92 $\pm$ 5	1.0 $\pm$ 0.04
12.5	101 $\pm$ 3	0.97 $\pm$ 0.1	91 $\pm$ 5	1.1 $\pm$ 0.16
25	96 $\pm$ 6	0.82 $\pm$ 0.2	89 $\pm$ 1	1.1 $\pm$ 0.18
50	105 $\pm$ 6	0.91 $\pm$ 0.1	98 $\pm$ 5	1.0 $\pm$ 0.19

3.2. Oxidative stress markers after 24h of exposure to particles

3.2.1. ROS production

ROS production was measured using Mitosox probe. First, 1h and 4h of exposure to RSS particles showed rapid production of ROS at all concentrations tested (1.2 fold to 1.6-fold) (**Figure 2A**) while HC-OS particles were not able to induce a ROS overproduction (**Figure 2B**). Additionally, ROS production was measured after 24h of exposure to RSS particles and it was observed an induction of ROS production with the three highest concentrations tested by 1.2 fold to 1.6-fold (**Figure 2C**).

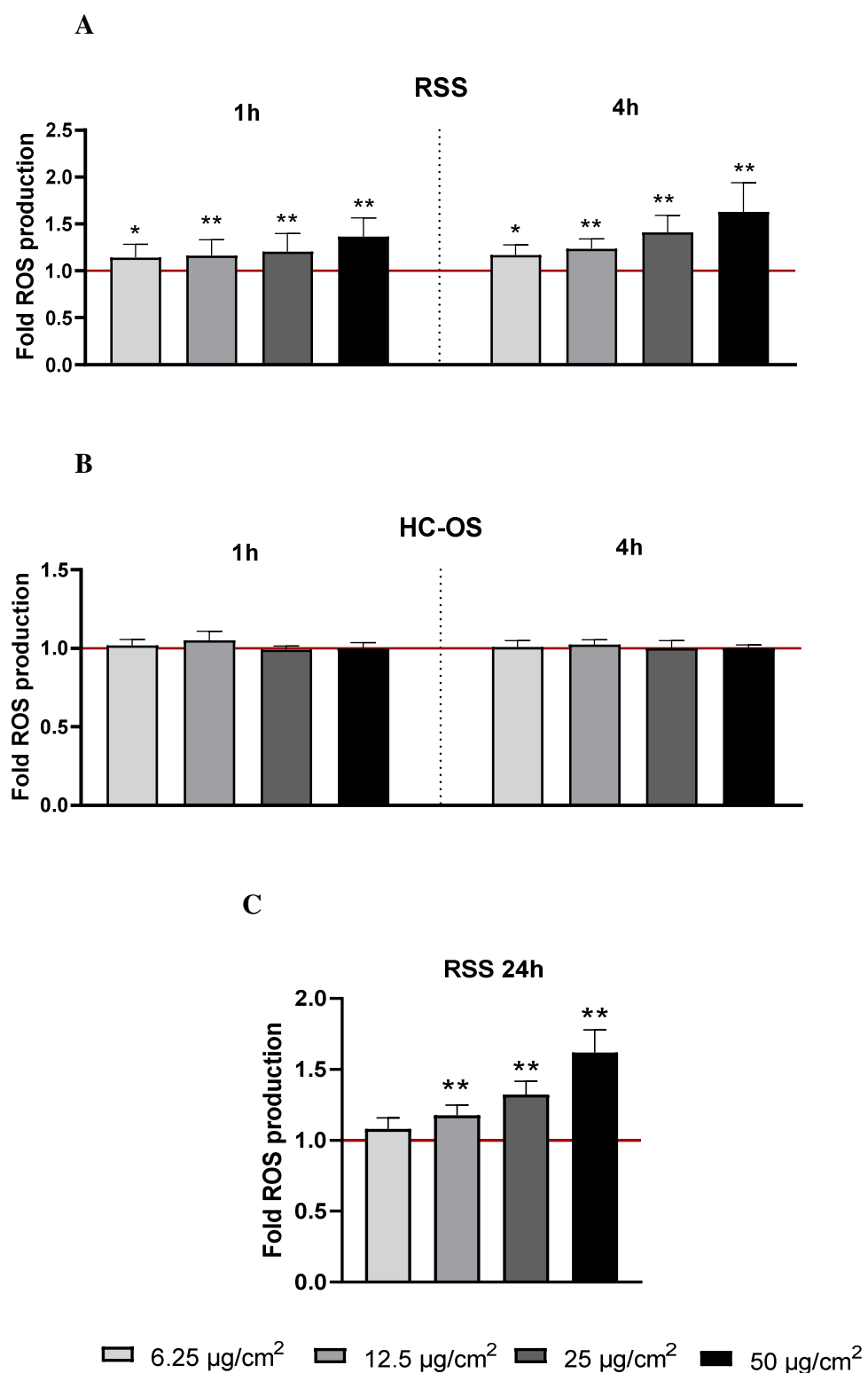


Figure 2. ROS production measured by MitoSox probe. NHBE were exposed 1h and 4h to RSS (A) and HC-OS particles (B) and 24h to RSS particles (C). Results are presented as ratio of fluorescence signal compared to control (cells cultured with PBS). Data were expressed as mean value $\pm$ SD ($n \geq 3$). * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$.

3.2.2. Glutathione levels

In order to explore the antioxidant response, the total glutathione concentration was measured (**Figure 2**). After 24h of exposure to RSS particles, results showed a trend for the glutathione ratio to increase in a dose-dependent manner but the increase is only significant at the concentration of 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (1.5-fold). HC-OS particles increased glutathione level after 24h of exposure at 25 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ and 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ by 1.4-fold (**Figure 2**).

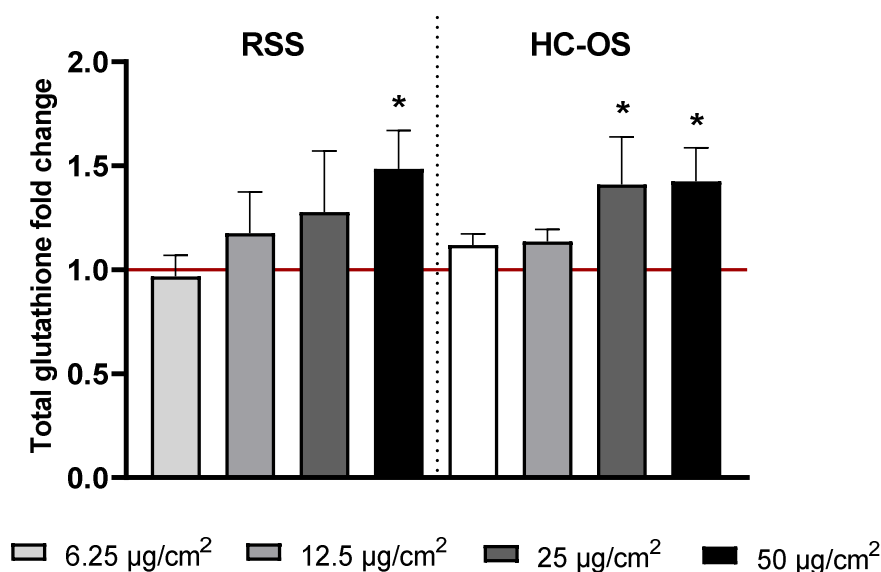


Figure 3. Total glutathione level after 24h of exposure to RSS or HC-OS particles (6.25, 12.5, 25, 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$). Results are presented as ratio of concentration of total glutathione compared to control (cells cultured with PBS). Data were expressed as mean value $\pm$ SD ($n \geq 3$). * $p \leq 0.05$

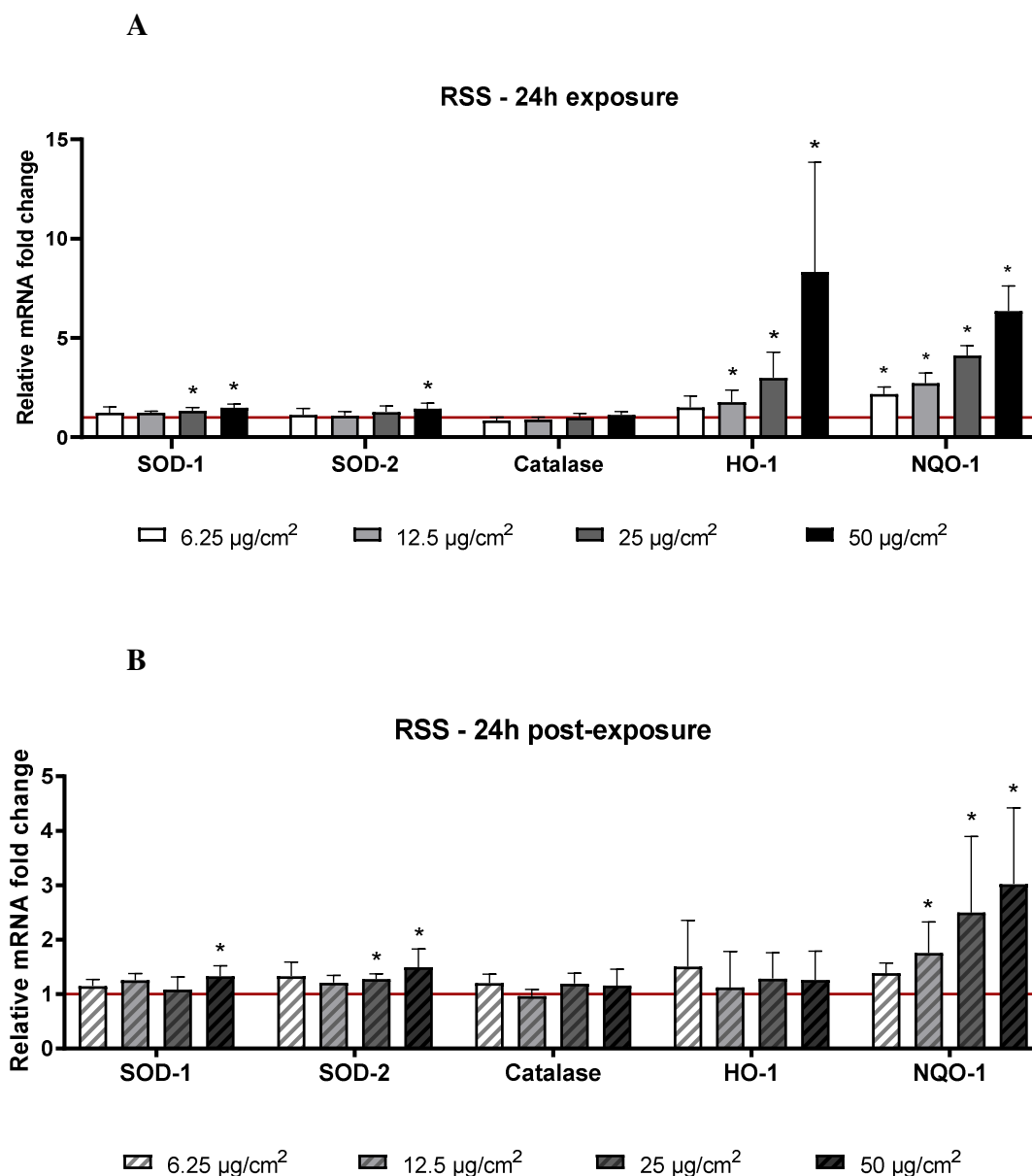
3.2.3. mRNA and protein expressions

As shown in **Figure 4**, significant upregulations of antioxidant markers after exposure to RSS and HC-OS particles were observed. RSS particles exposures caused a moderate induction of *SOD-1* (25 and 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) and *SOD-2* (50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) mRNA expression by 1.4 fold (**Figure 4A**). We showed a greater over expression dependant of particle concentrations for *HO-1* (12.5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 1.8-fold; 25 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 3.0-fold, 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 8.3-fold) and *NQO-1* mRNA expressions (6.25 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 2.2-fold; 12.5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 2.7-fold; 25 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 4.1-fold, 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 6.4-fold) (**Figure 4A**).

Since antioxidants responses were strongly induced, we investigated the response after 24h post-exposure to RSS particles. Results revealed that mRNA expressions stayed significantly increased (*NQO-1*: 1.8 to 3.7-fold), were back to normal (*SOD-1*, *SOD-2*, *HO-1*), or still unchanged (*Catalase*) (**Figure 4B**).

At protein level, NQO-1 was the only antioxidant protein overproduced after 24h of exposure to RSS particles at 25 and 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (about 2-fold). After 24h post-exposure NQO-1 protein expression is induced at all concentrations tested (1.8 to 3.7-fold). (**Figure 4C**).

24h of exposure to HC-OS particles caused only an increased of *NQO-1* mRNA expression by 1.5-fold and 1.7-fold at 25 and 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, respectively (**Figure 4D**). Given this result, we did not study the mRNA expression after 24h post-exposure or the expression of proteins.



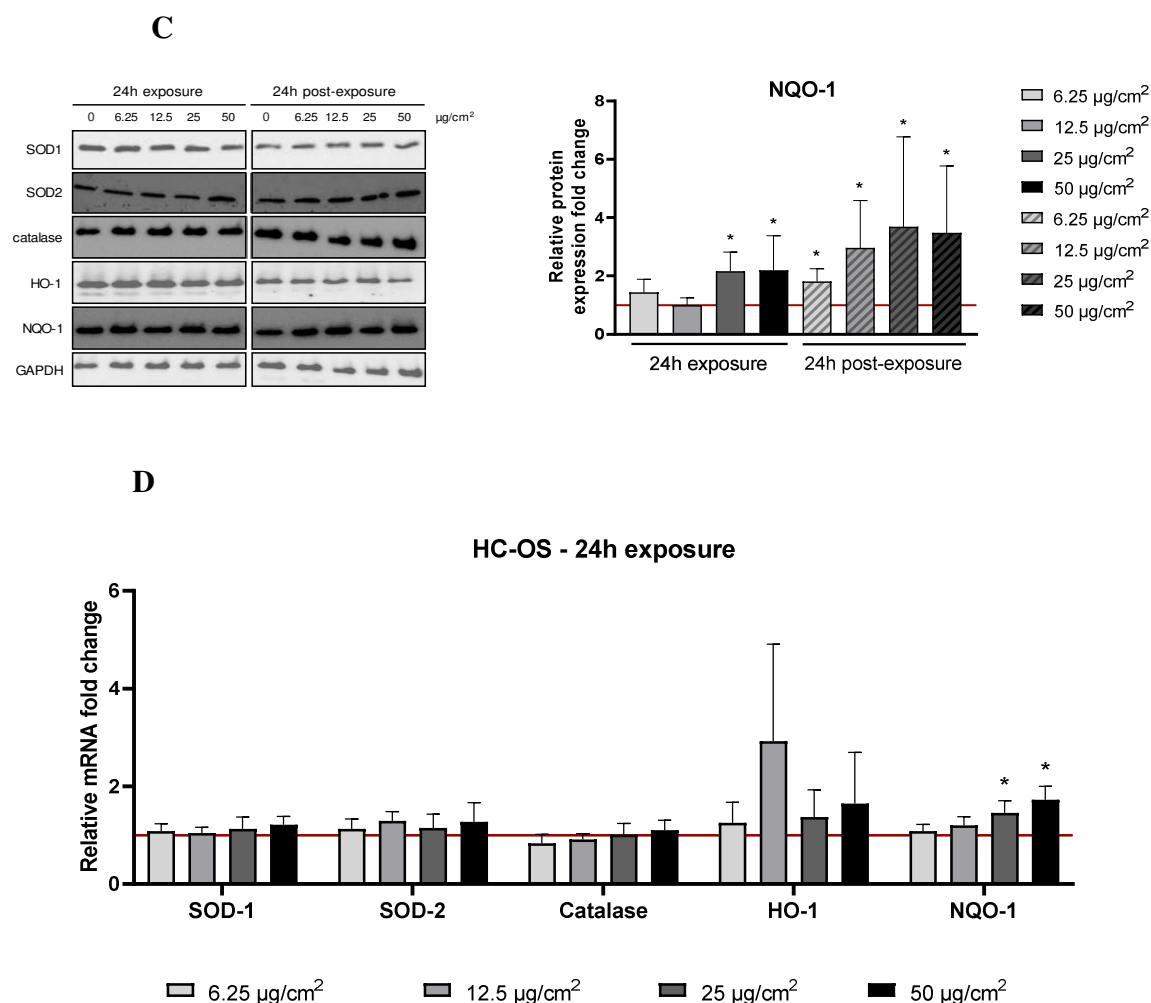
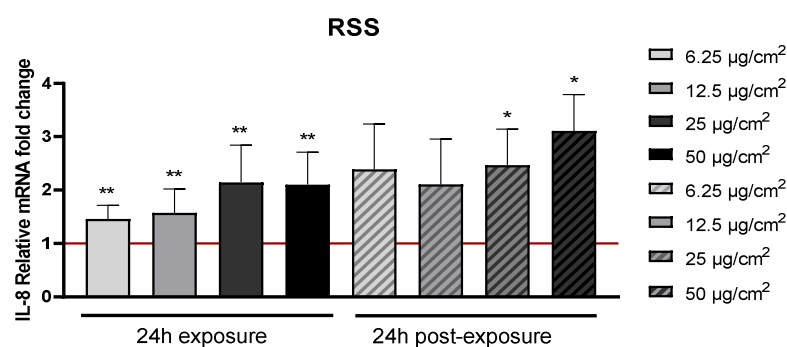


Figure 4. Antioxidant mRNA expression after 24h of exposure (A) to RSS particles and 24h post-exposure (B) (6.25, 12.5, 25, 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$). Antioxidant protein levels after 24h of exposure to RSS particles and 24h post-exposure (6.25, 12.5, 25, 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) (C), representative western blot (Right) and relative quantification of NQO-1 protein (Left). Antioxidant mRNA expression after 24h of exposure to HC-OS particles (6.25, 12.5, 25, 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) (D). SOD-1 and -2, superoxide dismutases-1 and -2 ; NQO-1, NADPH quinone oxydoreductase-1 ; HO-1, heme oxygenase-1. Results are presented as ratio of signal compared to control (cells cultured with PBS). Data were expressed as mean value $\pm$ SD of ($n \geq 3$). * $p \leq 0.05$.

3.3. *IL-8* expression

IL-8 mRNA expression was upregulated at all tested concentrations after 24h of exposure to RSS particles (**Figure 5A**). After 24h post-exposure to RSS particles, we still observed an increased in *IL-8* mRNA expression but only at 25 and 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (about 2 to 3-fold) (**Figure 5A**). 24h of exposure to HC-OS particles caused an increase of *IL-8* mRNA expression from 25 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ by 2-fold (**Figure 5B**).

A



B

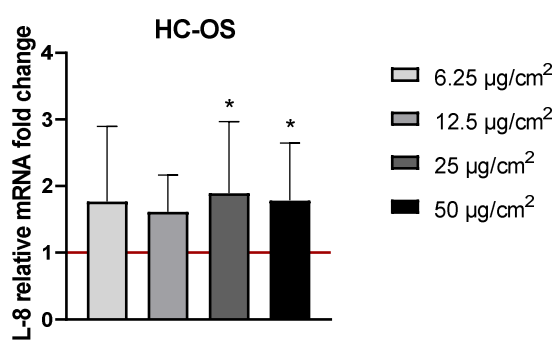


Figure 5. IL-8 mRNA expression after 24h of exposure to RSS particles and 24h post-exposure (6.25, 12.5, 25, 50 µg/cm²) (A); IL-8 mRNA expression after 24h of exposure to HC-OS particles (6.25, 12.5, 25, 50 µg/cm²) (B). Results are presented as ratio of signal compared to control (cells cultured with PBS). Data were expressed as mean value ± SD (n ≥ 3). *p ≤ 0.05, **p ≤ 0.01

3.4. Epithelium permeability after exposure to particles

24h of exposure to RSS and HC-OS particles did not altered permeability of NHBE cells grown in 3D cultures (**Figure S1**).

3.5. Airway epithelium integrity morphology after exposure to RSS particles

Since RSS exhibited responses linked to oxidative stress and stronger effects at 50 µg/cm² than other concentrations, we decided to further analyze the effects of particle exposure on the morphology of the NHBE model. Control cultures exposed to PBS (control) showed a typical mucociliary pseudostratified epithelium with caliciform and ciliated cells at the apical pole (**Figure. 6a**). Basal cells showed slight cell-to-cell detachment. After 24h of exposure to 50 µg/cm² of RSS particles no apparent sign of damages denoted by intracellular vacuoles, or

disruption of junction, was revealed compared to the control (**Figure. 6b**). Cell-to-cell contact seem preserved and no drastic cell detachment were noticed. However, 24h post exposure revealed damages with a loss of cilia density associated with some modifications in morphology of apical cells which appear cuboid with low and regular pale staining with toluidine blue (**Figure 6d**). Additionally, in control conditions, we observed differentiate goblet cells by a bright granular purple stain with toluidine blue and by protruding from the epithelium surface (**Figure 6c**) while this is not observed in the treated cells (**Figure 6D**).

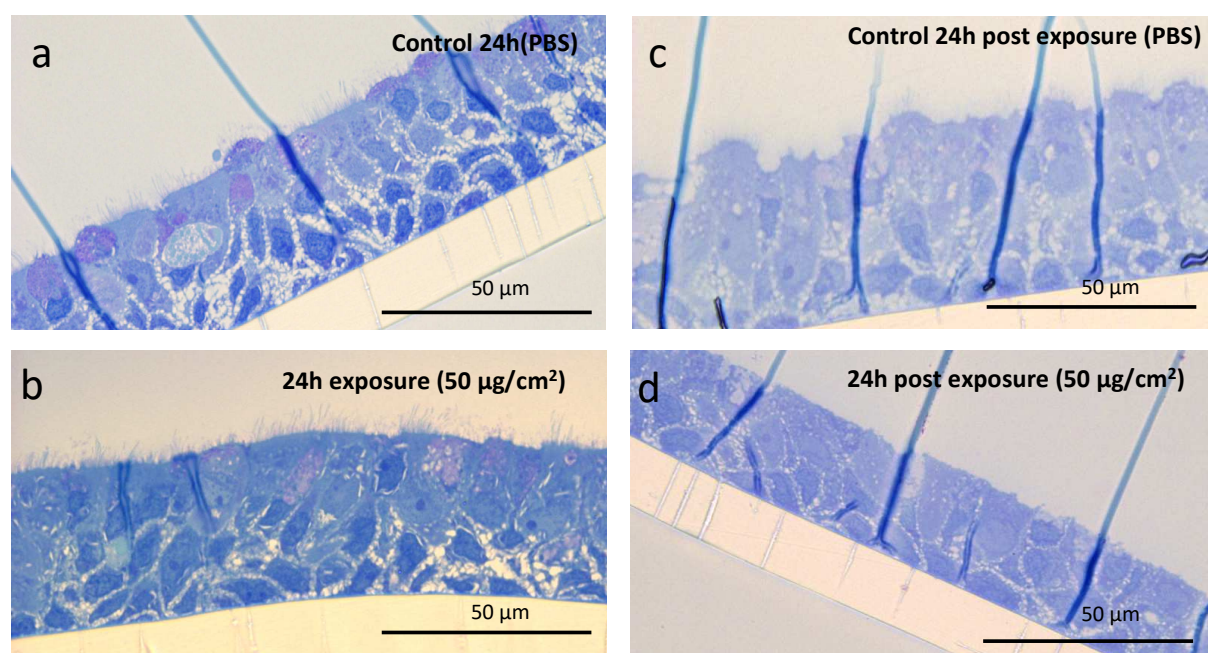


Figure 6. Phenotype of NHBE cells after RSS exposure. A: Control with PBS buffer; B: 24h of exposure to RSS particles ($50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), C: 24h post-exposure ($50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$). Scale bar: $50\mu\text{m}$

3.6. Fate of PM after exposure to RSS particles

(S)TEM imaging coupled to EDS or EELS was performed to evaluate the fate of RSS particles at $50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ after 24h of exposure on differentiated NHBE cells and to confirm their chemical nature as sourcing from RSS. **Figure 7** showed a polar distribution of particles sized dependant: i) submicron fraction was mainly trapped outside the cells at the apical pole and exhibited a complex chemical composition associating major and minor compounds of RSS particles (Fe, Al, Si, S, Mg, Ca) (**Figure 7A**). ii) Nanoranged particles' location was found into apical cells in the form of small cluster or isolated with an Fe rich composition (**Figure 7B**).

Their presence was also detected in the intercellular space at basal cells' level, meaning the capacity of particles to penetrate into the cells and to reach the basal pole (**Figure 7C**).

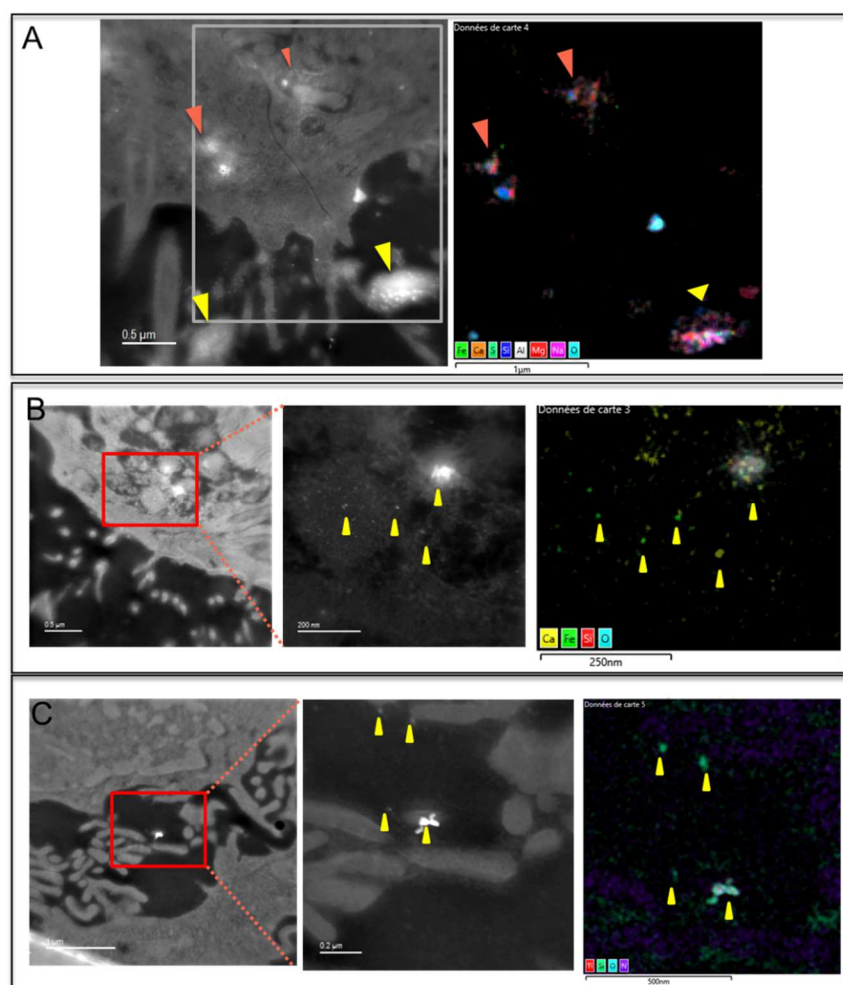


Figure 7. Fate of particles after 24h of exposure to RSS particles at 50 µg/cm². Black & white micrographs are acquired in STEM-HAADF mode allowing, in electron microscopy, the detection of particles with high atomic mass as brighter contrast than the biological matrix. Colored images represent the chemical maps of elemental compounds present in the cells obtained by STEM-EDS. **A:** Apex of epithelium showing ciliated cells with intercellular space and microvilli. Sub-micron particles are trapped outside the epithelium in the mucus (yellow arrows) while smaller aggregates are found inside (Red arrows). **B:** Apex of epithelium with microvilli in the luminal space. Nanorange particles are internalized in apical cells as small clusters or single particles enriched in Fe. **C:** Basal cells of the epithelium. We notice the presence of nanorange particles containing Fe, Si trapped in the intercellular space between two basal cells.

The most striking results were obtained for the 24h post exposure to RSS particles. Wide field scanning observations using backscattered electrons gave an overview of the particles' behavior and confirmed the events described previously. **Figure 8A** revealed the accumulation of heavy elements in a large number of intracytoplasmic compartments. Large aggregates (~350

nm) of iron rich particles (**Figure 8D blue arrows**) were detected inside vacuolar compartment of apical cells, as well as isolated nanometric particles (~10 nm) (**Figure 8G orange arrows**). In addition, inside compartments, particles seemed frequently associated with an homogeneous gentle-dense electron material, that the feature in EM are typical of mucin (**Figure 8C**). Chemical analysis identifies the presence of calcium, that we ignore the origin coming from mucins or particles (**Figure 8B and 10B**).

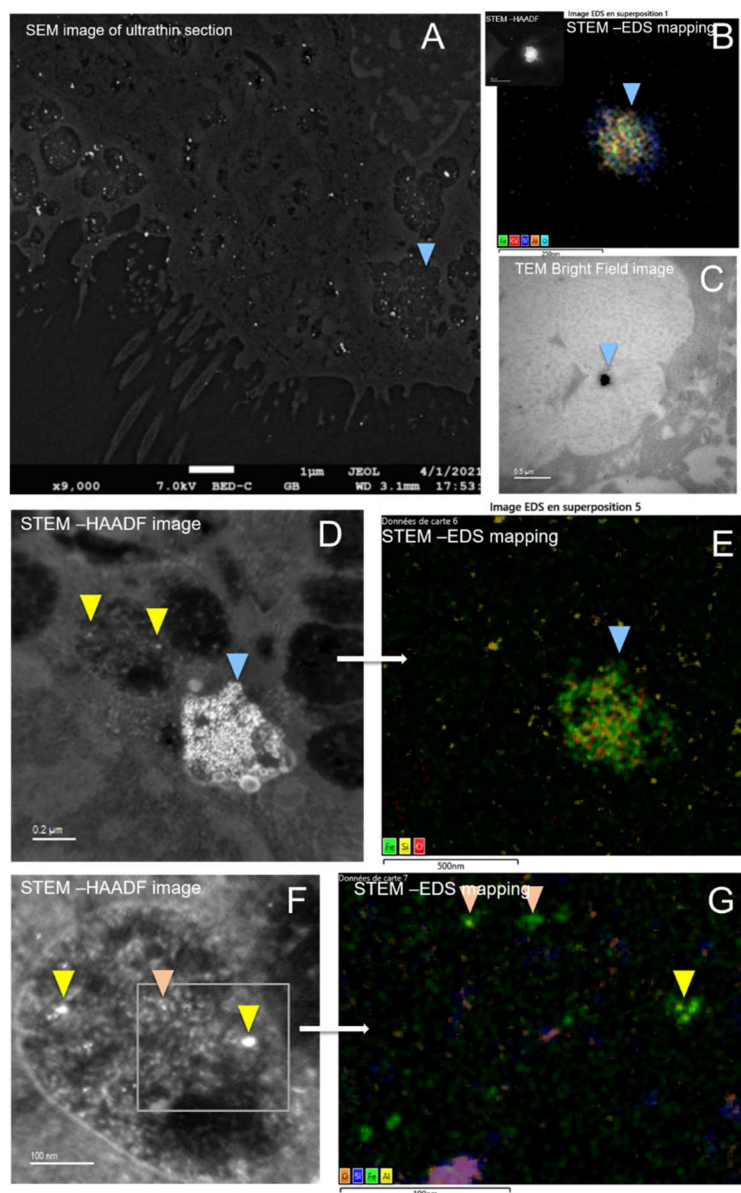


Figure 8. 24h post-exposure of NHBE cells to RSS particles: Combined electron microscopy approach using SEM and (S)TEM-analysis **A**: SEM images obtained with backscattered electrons detector giving an overview of the presence of heavy elements in NHBE cells (Bright dot). **C-F**: Transmission electron microscopy in mode bright field (**C**), STEM-HAADF (**D-F**). **B-E-G**: STEM-EDS elemental qualitative mapping showing the distribution of particles into cells. Particles which contain Fe, Al, Ca, Si, O (chemical compounds of RSS) are internalized in large intracytoplasmic compartments, and seems to be associated with mucin.

3.7. Cell viability after repeated exposures to RSS particles

Since 24h of exposure to RSS particles induced stronger cell responses than HC-OS particles, we performed repeated exposures to RSS particles to further explore their toxicity. NHBE cells were exposed to a dose that caused effects after acute exposure ($12.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) and a lower dose ($3.125 \mu\text{g}/\text{cm}^2$). Repeated RSS particles treatments (16h exposure / days during 4 days) showed a weak but significant increase at $12.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ in cell viability compared to PBS control (106 ± 1 vs 100 ± 4 , $P = 0.0079$). However, cell cycle analysis (**Table S2**), ATP and ADP contents (**Table S3**) were not modified.

Table 2: Cell viability after repeated exposures to RSS particles (3.125 ; $12.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$). MTT assay : results are presented as percentage of cell viability compared to control (cells cultured with PBS). Data were expressed as mean value $\pm$ SD ($n \geq 3$). $**p \leq 0.01$

<i>RSS particles</i>		
Concentration ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	% cell viability	ATP (fold change)
0	100 ± 4	1.0 ± 0.5
3.125	93 ± 8	0.95 ± 0.06
12.5	$106 \pm 1^{**}$	0.91 ± 0.3

3.8. Oxidative stress and inflammation responses after repeated exposure to RSS particles

Repeated exposures to RSS particles did not modify concentration of total glutathione (**Figure 9A**) and only induced NQO-1 mRNA expression by 2.0 fold at $3.125 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ and 3.0-fold at $12.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (**Figure 9B**). In addition, repeated exposures to RSS particles had no effect on IL-8 mRNA expression (**Figure 9C**).

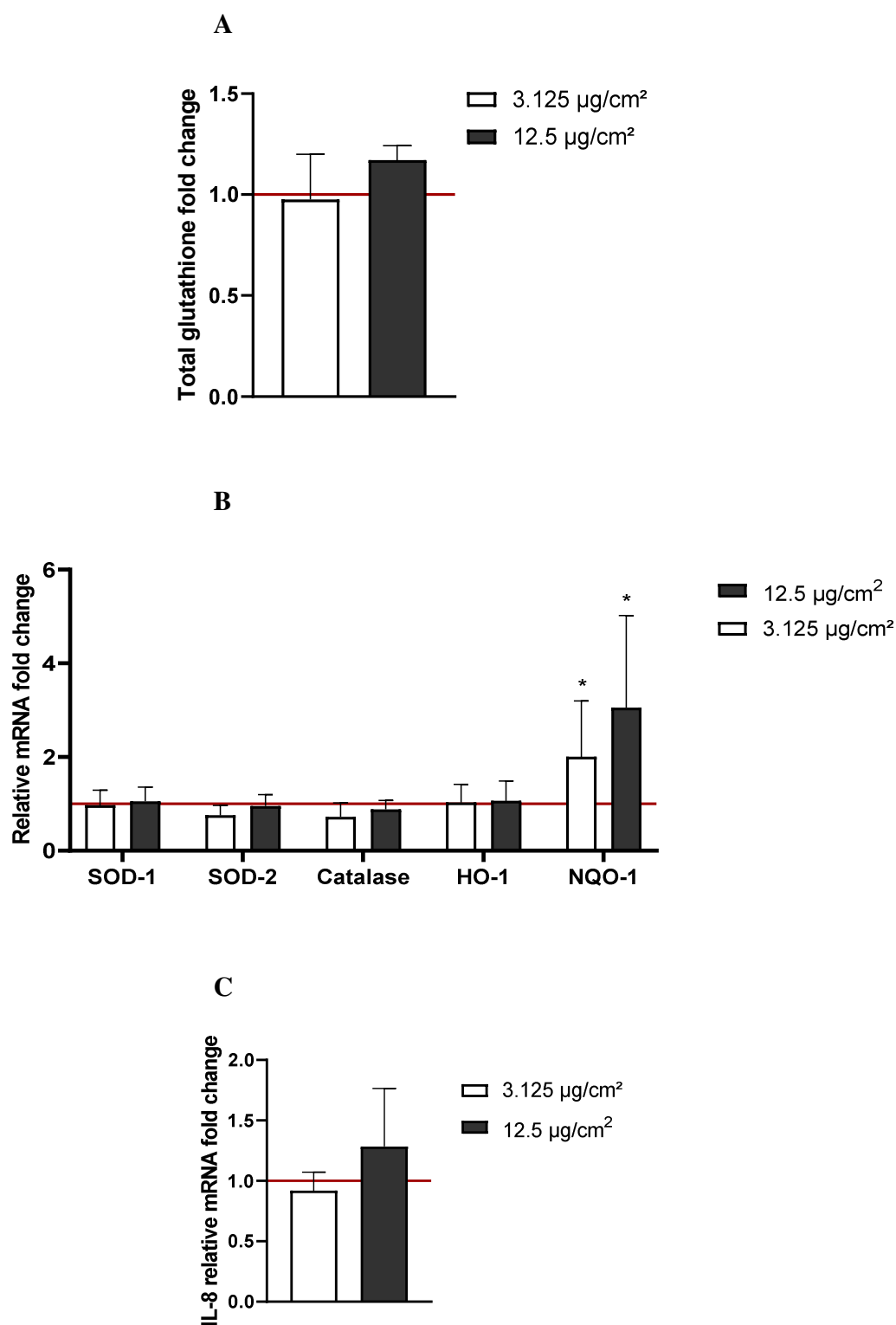


Figure 9. Total glutathione (A), antioxidant mRNA expression (B) and IL-8 mRNA expression (C) after four treatments of 16h to RSS (3.125 ; 12.5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$). Results are presented as ratio of signal compared to control (cells cultured with PBS). Data were expressed as mean value $\pm$ SD ($n \geq 3$). * $p \leq 0.05$.

3.9. Epithelium permeability after repeated exposure to RSS particles

After repeated exposure to RSS particles, surprisingly we observed a slight but significant decrease of dextran fluorescence. This decrease is observed with the both concentrations and is weakly and significantly observed at the higher concentration tested ($p = 0.0286$) (**Figure 10**), reflecting increased membrane impermeability.

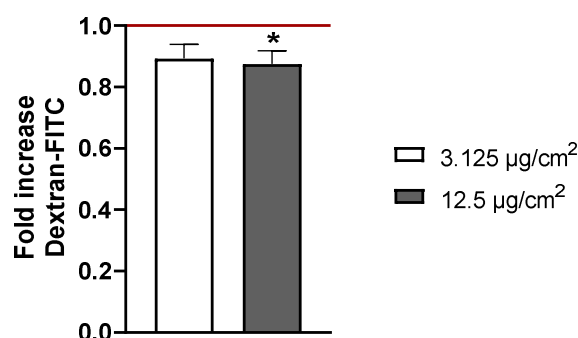


Figure 10. Epithelium barrier integrity analysis using Dextran-FITC assay. NHBE cells were submitted to four treatments of 16h to RSS particles (3.125 ; 12.5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$). Results are presented as ratio of fluorescence signal compared to control (cells cultured with PBS). Data were expressed as mean value $\pm$ SD ($n \geq 3$). * $p \leq 0.05$

3.10. Effect on epithelium morphology after repeated exposure to RSS particles

Since increase of impermeability of the epithelium is observed after repeated exposures to 12.5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ of RSS particles, we further analysed morphological changes of NHBE cells to this concentration. The impact of the repeated exposure on the morphology is mainly characterized by the changes in cuboid aspect of the epithelium (**Figure 11.b**) compare to control (**Figure 11.a**)

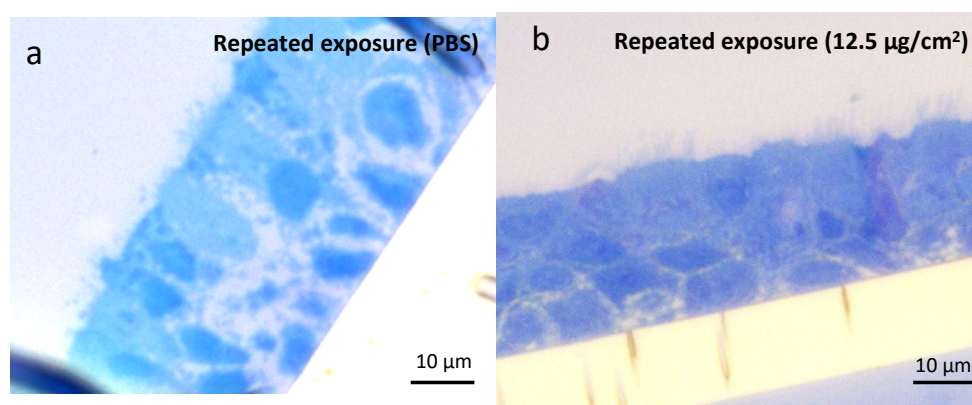


Figure 11. Phenotype of NHBE cells after RSS exposure. a: Control with PBS buffer; B: Repeated exposure (12.5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) scale bar: 50 μm

3.11. *Fate of PM after repeated exposure to RSS particles*

Electron microscopy analysis of repeated exposure sample, exhibits similar results as observed for post-exposure. Large aggregates constituted of nanosized spherules (around 10 nm) are observed inside apical cells (**Figure 12A**), located in vacuolar compartments and are frequently associated to single or individualized particles (**Figure 12B**). The chemical analysis of such nanoparticles stay difficult mainly because of the very low signal emitted by particles. To override those limitations, the acquisition time is highly increased with the adverse effect to damage the sample. However, we revealed by electron loss spectrometry, the Fe-rich composition of particles internalized as observed previously for the post exposure. In addition we detect Ca-associated to particles. The presence of calcium may have two origin: i) RSS-particles or mucins. Calcium is involved in the maturation /stabilization of mucins, and one of the hypotheses that we formulate is based on the interaction of the RSS particles with the mucus as internalisation mechanism.

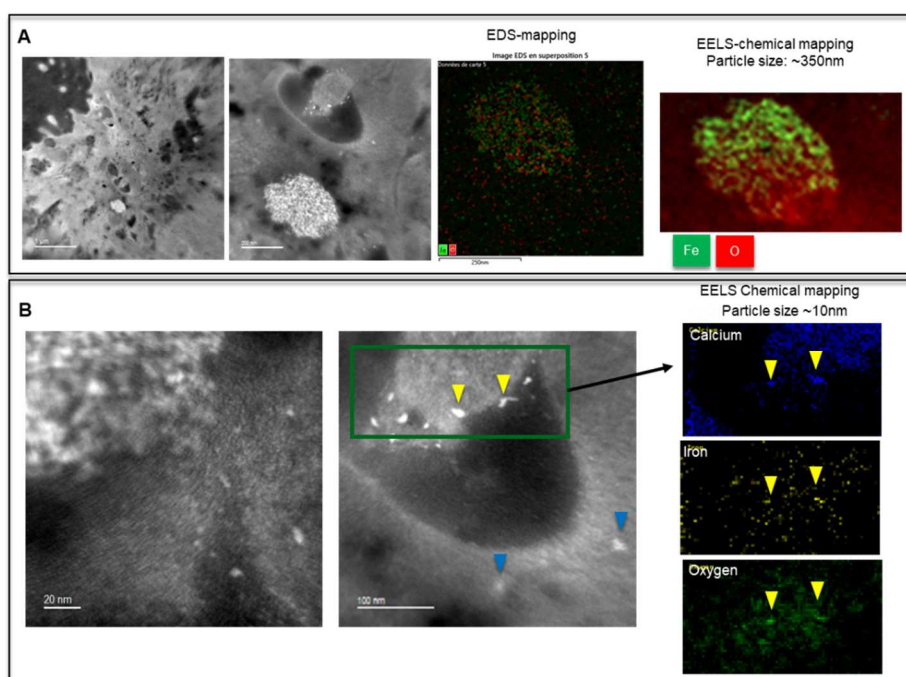


Figure 12. Distribution analysis of RSS particles in the NHBE model after repeated exposure showing the persistence of particle into the cells. A: Accumulation of nanometric particles in intracytoplasmic compartments, forming large aggregates (~350nm), whose chemical nature Fe-O is confirmed by EDS and energy loss (EELS) mappings. B: presence of isolated nanoparticles (10 nm) having diffused into the cytoplasm (blue arrows) or interacting with the membrane of vacuolar compartments (yellow arrows). The chemical nature of the particles is difficult to identify and tends to reveal the presence of Fe, O, Ca.

4. Discussion

In our previous study, we showed that RSS and HC-OS particles have an intrinsic oxidative potential and an ability to induce antioxidant and inflammatory responses SAEC model (Martin de Lagarde et al., 2022). With the aim of getting closer to the human *in vivo* conditions, here we used NHBE cells grown at ALI during 14 days that formed a pseudo stratified mucociliary epithelium (Juarez-Facio et al., 2022) to further explore the underlying mechanisms of toxicity, in particular oxidative stress response of pyrotechnic smoke particles. Acute and repeated exposures to smoke particles were performed.

24h of exposure to RSS and HC-OS particles did not affect cell viability, which is in line with our previous study in SAEC (Martin de Lagarde et al., 2022). Other studies on total aerosol generated by red smokes and HC based smokes reported to cause decrease in cell viability of BEAS-2B and A549 cell lines, 24h and 48h after exposure (Hemmilä et al., 2010, 2013; Hemmilä, Hihkiö, Kasanen, et al., 2007a; Hemmilä, Hihkiö, & Linnainmaa, 2007; van Hulst et al., 2017). Our tested concentrations appeared to be non-cytotoxics. It is very difficult to compare our concentrations regarding cytotoxicity with the studies mentioned above since the concentrations were either defined in quantity of burnt smoke (g), in density (g/m^3), or only in number of burnt grenades. However, our concentrations are consistent with other studies on particle toxicity using pulmonary cell models cultured at ALI where concentrations were used between 7 and 45 $\mu\text{g/cm}^2$ (Abbas et al., 2019; Lan et al., 2021).

Our results showed that RSS particles induced ROS formation after 1h, 4h and 24h of exposure in a dose dependent manner. PM-induced ROS formation have been reported in other pyrotechnic activities like fireworks (Hickey et al., 2020) or firearms (Bergström et al., 2015). Unexpectedly, HC-OS particles were not able to produce ROS while they are extremely rich in metals like Fe (12.1 mg/g) (Martin de Lagarde et al., 2022) which is known to induce ROS formation (L. Jin et al., 2019; F. Xu et al., 2020). RSS particles displayed the highest organic fraction (quinones and HAP) while HC-OS particles contained chlorinated aromatic or polyaromatic compounds (Martin de Lagarde et al., 2022). The implication of organic compounds like PAHs in a greater ROS production is showed in several studies (Ekstrand-Hammarström et al., 2013; L. Jin et al., 2019; J. Li et al., 2021; Longhin et al., 2013). GSH status imbalance, antioxidant gene and protein expression were analyzed after 24h of exposure to smoke particles in NHBE cells. In line with the production of ROS, RSS particles showed an induction of antioxidant defenses by increasing level of total glutathione, expressions of mRNA *SOD-1*, *SOD-2*, *HO-1*, *NQO-1* and expression of NQO-1 protein. HC-OS particles

showed a weak antioxidant response by increasing level of GSH and the expression of mRNA *NQO-1*. In other studies, a 24h of exposure to PM like PM_{2.5} (Niu et al., 2020; C. Zhao et al., 2020) or PM₁₀ (Chirino et al., 2010) induced a decrease in total glutathione concentration in pulmonary cells. In our study, we could presume that total glutathione firstly reacts with ROS produced at 1 and 4 h of exposure to RSS particles and then overproduced to be restored and acts against prolonged exposure to RSS particles. For example, 3h post-exposure to ultrafine particles reduced total glutathione level but is followed by an increase after 24h post exposure in BEAS-2B cells (Juarez Facio et al., 2022). However, the increases of total glutathione concentration after 24h of exposure to HC-OS particles at 25 and 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ remain very unclear while no ROS production was observed at 1h and 4h of exposure. Because of the pleiotropic roles of glutathione in the cell (Hattem et al., 2017; Merk et al., 2020), it remains difficult to attribute this result to oxidative stress alone, which should be assessed by measurements of the GSH/GSSG ratio. SOD and CAT are the first line of intracellular antioxidant enzymes, SODs convert $\text{O}_2^{\bullet-}$ to H_2O_2 , and CAT reduces H_2O_2 to H_2O (Ighodaro & Akinloye, 2018). The increases of mRNA *SOD-1* and *SOD-2* by 24h of exposure to RSS particles are in line with the $\text{O}_2^{\bullet-}$ production. HO-1 is an important cytoprotective enzyme that is highly upregulated by a number of stimuli like heme, nitric oxide, heavy metals, growth factor, cytokines, modified lipids and others (Loboda et al., 2016). Its expression is often overproduced after exposure to PM (Crobeddu et al., 2017; Deng, Rui, et al., 2013; Fernando et al., 2019; Frias et al., 2020; Juarez-Facio et al., 2022; Niu et al., 2020; Skuland et al., 2017) which is similarly observed with a 24h of exposure to RSS particles. NQO-1 antioxidant marker was highly induced at mRNA and protein levels by RSS particles even after 24h post exposure. Since NQO-1 is very well known to be induced by quinones and catalyze their reduction (Burchiel et al., 2007; Dinkova-Kostova & Talalay, 2010), the strong upregulation of NQO-1 is very probably related to the anthraquinones that composed the red dye of RSS particles (Martin de Lagarde et al., 2022). Indeed, anthraquinones can count approximately for 40% of the total composition of red coloring smokes (National Research Council (U.S.), 1999). Additionally, this upregulation of NQO-1 could drive an excessive production of $\text{O}_2^{\bullet-}$ by the redox cycling of quinones (Valavanidis et al., 2013; Zheng et al., 2020). A very recent study developed a model of quantitative structure activity relationship to predict the health risks of an acute exposure to anthraquinones dyes used in the military field (Dilger et al., 2022). High to very high toxicities were predicted for acute inhalation, genotoxicity, mutagenicity, endocrine disruption and development.

According to the hierarchical stress response model, increase of oxidative stress can lead to inflammation and finally to cytotoxicity and initiation of programmed cell death (Araujo & Nel, 2009; Peixoto et al., 2017; Xiao et al., 2003). Upregulation of the pro-inflammatory marker *IL-8* by RSS particles after 24h of exposure and 24h post exposure was observed. To confirm the induction of inflammation by RSS particles, other pro-inflammatory markers need to be analyzed. Overall, results of acute toxicity showed that RSS particles were able to induce an oxidative stress which were similarly observed in our previous work, while HC-OS particles had less effects in differentiated NHBE cells compared to SAEC (Martin de Lagarde et al., 2022).

Since differentiated NHBE cells at ALI highly developed a mucociliary clearance (Juarez-Facio et al., 2022; Rayner et al., 2019; Sotty et al., 2019), we analyzed the morphological changes of the airway epithelium and the fate of RSS particles. At the resolution of light microscopy, no apparent displayed sign of damage denoted by intracellular vacuoles, or disruption of junction, was revealed on cultures exposed to 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ of RSS particles. The extension of 24h post-exposed culture cells favors the morphology changes into a cuboid epithelium and a loss of ciliature. Severe ciliotoxicity with a decrease of number and length of cilia is observed after repeated exposure to cigarette smoke on differentiated NHBE cells (Aufderheide et al., 2015; Brekman et al., 2014). Changes in airway epithelium structure may be related to oxidative stress mediated by RSS particles (Falcon-Rodriguez et al., 2016). Electron Microscopy investigations highlighted the capacity of particles to be internalized into cells and to be stored in compartment. After 24h of exposure to RSS particles at 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, cluster of particles were mainly trapped outside the cells, in the mucus, while some nanoparticles were found into the apical cells. Mucus is the first protective layer of bronchial epithelium to external aggression and NHBE differentiated model is well known to secrete mucus (Rayner et al., 2019) acting as a filtering barrier according to the size or the surface-charge of particles. After 24h post exposure, we showed more internalization of numerous nanoparticles into vacuoles in the apical cells. These observations are coherent with the study of Boubilil et al 2013 who have demonstrated the capability of the NHBE model to internalize and accumulate $\text{PM}_{2.5}$ after repeated exposures in the basal and apical cytoplasm of the cells (Boubilil et al., 2013). Internalization of $\text{PM}_{2.5}$ into vacuoles was also observed in BEAS-2B cells (Dornhof et al., 2017). It is well agreed that the diffusion rate through mucus layer decreases with increasing particle size (García-Díaz et al., 2018), allowing internalization of only nanometer particles which are consistent with our results. In addition, we observed the presence of calcium associated to the particles that might be attributed to mucin content. Paz et

al., (2003) reported that calcium is necessary to keep mucins condensed and packed in intracellular granules under physiological conditions. The microscopy results obtained in this study highlight a putative interaction of RSS particles with secreted mucins, conditioning their fate in bronchial epithelium. To complete EM observations, investigations based on mucins detection via MUC5AC immunolabelling need to be performed. However, considering the limited number of experiments (n=1), the results need to be confirmed.

In order to be closer of a military occupational exposure, we analyzed RSS particles toxicity after repeated exposures (4x16h/day) to lower doses than acute exposure. Exposure of 16h could be considered as a long time of exposure but it could represent a residual particles deposition in the lower respiratory tract (Geiser & Kreyling, 2010; Lan et al., 2021). Since antioxidant and inflammatory markers were still induced 24h post exposure to RSS particles, internalization of particles were more pronounced and important changes in the airway epithelium were observed after this recovery time, we expected to have more harmful effects after repeated exposures. However, we showed only induction of *NQO-1* mRNA at the two tested concentrations. The main result is the change in the organization of the epithelium to a pseudostratified into a cuboid epithelium, which seems more pronounced than 24h after acute exposure. These morphological changes could be related to the increases of impermeability of the cell barrier that was confirmed by measuring the dextran fluorescence and by the increase of MTT reduction suggesting a cell proliferation. However, most studies showed that particles caused other types of morphological alterations like a change in spindle shape and the formation of paracellular holes (Dornhof et al., 2017), or structural and functional damage to mitochondria (X. Jin et al., 2018; N. Li, Sioutas, et al., 2003), or disturbances in membrane integrity (Caraballo et al., 2011; Dong et al., 2020; C.-H. Lin et al., 2021). Thus, the mechanisms underlying these cubic changes are very unclear since no oxidative stress is observed and further investigations need to be performed.

5. Conclusion

In conclusion, the aim of this study was to better evaluate the underlying mechanisms of particle toxicity from pyrotechnic smokes particles by using a 3D model of mucociliary epithelium. Our results demonstrated an induction of oxidative stress by RSS particles after acute exposure, characterized by a ROS production and increases of antioxidant and pro-inflammatory markers, while HC-OS particles were less harmful. Additionally, RSS particles were internalized into cells and generated cell morphological changes, highlighted that NHBE

cells cultured at ALI is a very relevant model to study the fate of particles and the changes of the airway epithelium that might be occurs after particle exposure. The toxics effects of acute exposure to RSS particles underlined the possible risks of other colored smokes containing anthraquinones dyes. Finally, repeated exposures to RSS particles did not induce oxidative stress while cubic changing aspects of NHBE cells were showed. Thus, further investigation need to be performed to understand these results. Overall, this study provides a better overview of the toxic effects from pyrotechnic smokes particles whose toxic risks were very little studied.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Funding sources

This work was supported by the Agence Nationale de la Recherche Française (ANR Astrid, Grant number: ANR-15-ASTR-0023), and co-supported by the Regional Council of Normandy and the European Union in the framework of the ERDF-ESF (CellSTEM project). Violaine Martin de Lagarde received a PhD fellowship co-funded by the Agence de l'Innovation de Defense (AID) and the Regional Council of Normandy. We thank the Direction Générale de l'Armement (DGA) for technical assistance during use of pyrotechnic smokes and for support in carrying out the study.

Bibliography

- Abbas, I., Badran, G., Verdin, A., Ledoux, F., Roumie, M., Lo Guidice, J.-M., Courcot, D., & Garçon, G. (2019). In vitro evaluation of organic extractable matter from ambient PM_{2.5} using human bronchial epithelial BEAS-2B cells : Cytotoxicity, oxidative stress, pro-inflammatory response, genotoxicity, and cell cycle deregulation. *Environmental Research*, 171, 510–522. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.01.052>
- Araujo, J. A., & Nel, A. E. (2009). Particulate matter and atherosclerosis : Role of particle size, composition and oxidative stress. *Particle and Fibre Toxicology*, 6(1), 24. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-6-24>
- Aufderheide, M., Scheffler, S., Ito, S., Ishikawa, S., & Emura, M. (2015). Ciliotoxicity in human primary bronchiolar epithelial cells after repeated exposure at the air-liquid interface with native mainstream smoke of K3R4F cigarettes with and without charcoal filter. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 67(7–8), 407–411. <https://doi.org/10.1016/j.etp.2015.04.006>
- Bergström, U., Ekstrand-Hammarström, B., Hägglund, L., & Wingfors, H. (2015). Comparing Acute Toxicity of Gunshot Particles, from Firing Conventional and Lead-Free Ammunition, in Pulmonary Epithelial Cell Cultures. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 78(10), 645–661. <https://doi.org/10.1080/15287394.2015.1017682>
- Bérubé, K., Prytherch, Z., Job, C., & Hughes, T. (2010). Human primary bronchial lung cell constructs : The new respiratory models. *Toxicology*, 278(3), 311–318. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2010.04.004>
- 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. *Toxicology in Vitro*, 27(2), 533–542. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2012.11.008>
- Brekman, A., Walters, M. S., Tilley, A. E., & Crystal, R. G. (2014). FOXJ1 Prevents Cilia Growth Inhibition by Cigarette Smoke in Human Airway Epithelium *In Vitro*. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 51(5), 688–700. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2013-0363OC>
- Burchiel, S. W., Thompson, T. A., Lauer, F. T., & Oprea, T. I. (2007). Activation of dioxin response element (DRE)-associated genes by benzo(a)pyrene 3,6-quinone and benzo(a)pyrene 1,6-quinone in MCF-10A human mammary epithelial cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 221(2), 203–214. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2007.02.020>
- Caraballo, J. C., Yshii, C., Westphal, W., Moninger, T., & Comellas, A. P. (2011). Ambient particulate matter affects occludin distribution and increases alveolar transepithelial electrical conductance : Particulate matter affects alveolar barrier. *Respirology*, 16(2), 340–349. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1843.2010.01910.x>
- Chevalier, L., Selim, J., Castro, C., Cuvilly, F., Baste, J.-M., Richard, V., Pareige, P., & Bellien, J. (2022). Combined Electron Microscopy Approaches for Arterial Glycocalyx Visualization. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 9, 840689. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2022.840689>
- Chirino, Y. I., Sánchez-Pérez, Y., Osornio-Vargas, Á. R., Morales-Bárcenas, R., Gutiérrez-Ruiz, M. C., Segura-García, Y., Rosas, I., Pedraza-Chaverri, J., & García-Cuellar, C. M. (2010). PM₁₀ impairs the antioxidant defense system and exacerbates oxidative stress driven cell death. *Toxicology Letters*, 193(3), 209–216. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2010.01.009>
- Conkling, J. A., & Morcella, C. (2018). *Chemistry of Pyrotechnics Basic Principles and Theory, Third Edition*. 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. *Environmental Pollution*, 230, 125–133. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.06.051>
- Crouse, L. C. B., Bazar, M. A., Crouse, C. L., & Januskiewicz, A. J. (2017). *Acute and Subacute Inhalation Toxicity Study in Rats Exposed to Pyrotechnically-Disseminated M18 Red Smoke* (Toxicology study S.0036333-15; p. 403). US Army Research Development and Engineering Command Environmental Acquisition and Logistics Sustainment Program.
- Deng, X., Rui, W., Zhang, F., & Ding, W. (2013). PM_{2.5} induces Nrf2-mediated defense mechanisms against oxidative stress by activating PIK3/AKT signaling pathway in human lung alveolar epithelial A549 cells. *Cell Biology and Toxicology*, 29(3), 143–157. <https://doi.org/10.1007/s10565-013-9242-5>
- Dilger, J. M., Martin, T. M., Wilkins, B. P., Bohrer, B. C., Thoreson, K. M., & Fedick, P. W. (2022). Detection and toxicity modeling of anthraquinone dyes and chlorinated side products from a colored smoke pyrotechnic reaction. *Chemosphere*, 287, 131845. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131845>
- Dinkova-Kostova, A. T., & Talalay, P. (2010). NAD(P)H:quinone acceptor oxidoreductase 1 (NQO1), a multifunctional antioxidant enzyme and exceptionally versatile cytoprotector. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 501(1), 116–123. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2010.03.019>
- Dong, C.-D., Chen, C.-W., Chen, Y.-C., Chen, H.-H., Lee, J.-S., & Lin, C.-H. (2020). Polystyrene microplastic

particles : In vitro pulmonary toxicity assessment. *Journal of Hazardous Materials*, 385, 121575. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.121575>

Dornhof, R., Maschowski, C., Osipova, A., Gieré, R., Seidl, M., Merfort, I., & Humar, M. (2017). Stress fibers, autophagy and necrosis by persistent exposure to PM_{2.5} from biomass combustion. *PLOS ONE*, 12(7), e0180291. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180291>

Ekstrand-Hammarström, B., Magnusson, R., Österlund, C., Andersson, B. M., Bucht, A., & Wingfors, H. (2013). Oxidative stress and cytokine expression in respiratory epithelial cells exposed to well-characterized aerosols from Kabul, Afghanistan. *Toxicology in Vitro*, 27(2), 825–833. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2012.12.022>

El Idrissi, A., van Berkel, L., Bonekamp, N. E., Dalemans, D. J. Z., & van der Heyden, M. A. G. (2017). The toxicology of zinc chloride smoke producing bombs and screens. *Clinical Toxicology*, 55(3), 167–174. <https://doi.org/10.1080/15563650.2016.1271125>

Falcon-Rodriguez, C. I., Osornio-Vargas, A. R., Sada-Ovalle, I., & Segura-Medina, P. (2016). Aeroparticles, Composition, and Lung Diseases. *Frontiers in Immunology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00003>

Fernando, I. P. S., Jayawardena, T. U., Kim, H.-S., Lee, W. W., Vaas, A. P. J. P., De Silva, H. I. C., Abayaweera, G. S., Nanayakkara, C. M., Abeytunga, D. T. U., Lee, D.-S., & Jeon, Y.-J. (2019). Beijing urban particulate matter-induced injury and inflammation in human lung epithelial cells and the protective effects of fucosterol from *Sargassum binderi* (Sonder ex J. Agardh). *Environmental Research*, 172, 150–158. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.02.016>

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. *Scientific Reports*, 10(1), 3704. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59930-3>

García-Díaz, M., Birch, D., Wan, F., & Nielsen, H. M. (2018). The role of mucus as an invisible cloak to transepithelial drug delivery by nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 124, 107–124. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2017.11.002>

Geiser, M., & Kreyling, W. G. (2010). Deposition and biokinetics of inhaled nanoparticles. *Particle and Fibre Toxicology*, 7(1), 2. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-7-2>

Ghio, A. J., Dailey, L. A., Soukup, J. M., Stonehuerner, J., Richards, J. H., & Devlin, R. B. (2013). Growth of human bronchial epithelial cells at an air-liquid interface alters the response to particle exposure. *Particle and Fibre Toxicology*, 10(1), 25. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-10-25>

Hatem, E., El Banna, N., & Huang, M.-E. (2017). Multifaceted Roles of Glutathione and Glutathione-Based Systems in Carcinogenesis and Anticancer Drug Resistance. *Antioxidants & Redox Signaling*, 27(15), 1217–1234. <https://doi.org/10.1089/ars.2017.7134>

Hemmilä, M., Hihkiö, M., Kasanen, J.-P., Turunen, M., Hautamäki, M., Pasanen, A.-L., & Linnainmaa, K. (2007). In Vivo and In Vitro Evaluation of the Acute Toxicity, the Genotoxicity, and the Irritation Potency of Two Hexachloroethane-based Pyrotechnic Smokes. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 70(14), 1167–1181. <https://doi.org/10.1080/15287390701252691>

Hemmilä, M., Hihkiö, M., Kasanen, J.-P., Turunen, M., Järvelä, M., Suhonen, S., Pasanen, A.-L., & Norppa, H. (2010). Cytotoxicity and genotoxicity in vitro and irritation potency in vivo of two red phosphorus-based pyrotechnic smokes. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 701(2), 137–144. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2010.06.007>

Hemmilä, M., Hihkiö, M., & Linnainmaa, K. (2007). Evaluation of the Acute Toxicity and Genotoxicity of Orange, Red, Violet and Yellow Pyrotechnic Smokes In Vitro. *Propellants, Explosives, Pyrotechnics*, 32(5), 415–422. <https://doi.org/10.1002/prep.200700046>

Hemmilä, M., Hihkiö, M., Norppa, H., Suhonen, S., & Callaway, J. (2013). *Toxicity assessment of signalling smokes*. 39th International Pyrotechnics Seminar, Valencia.

Hickey, C., Gordon, C., Galdanes, K., Blaustein, M., Horton, L., Chillrud, S., Ross, J., Yinon, L., Chen, L. C., & Gordon, T. (2020). Toxicity of particles emitted by fireworks. *Particle and Fibre Toxicology*, 17(1), 28. <https://doi.org/10.1186/s12989-020-00360-4>

Holmes, P. S. (1999). Pneumomediastinum associated with inhalation of white smoke. *Military Medicine*, 164(10), 751–752.

Ighodaro, O. M., & Akinloye, O. A. (2018). First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX) : Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria Journal of Medicine*, 54(4), 287–293. <https://doi.org/10.1016/j.ajme.2017.09.001>

Jin, L., Xie, J., Wong, C. K. C., Chan, S. K. Y., Abbaszade, G., Schnelle-Kreis, J., Zimmermann, R., Li, J., Zhang, G., Fu, P., & Li, X. (2019). Contributions of City-Specific Fine Particulate Matter (PM_{2.5}) to Differential In Vitro Oxidative Stress and Toxicity Implications between Beijing and Guangzhou of China. *Environmental*

Science & Technology, 53(5), 2881–2891. <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b00449>

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. *The Journal of Toxicological Sciences*, 43(2), 101–111. <https://doi.org/10.2131/jts.43.101>

Juarez Facio, A. T., Yon, J., Corbière, C., Rogez-Florent, T., Castilla, C., Lavanant, H., Mignot, M., Devouge-Boyer, C., Logie, C., Chevalier, L., Vaugeois, J.-M., & Monteil, C. (2022). Toxicological impact of organic ultrafine particles (UFPs) in human bronchial epithelial BEAS-2B cells at air-liquid interface. *Toxicology in Vitro*, 78, 105258. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2021.105258>

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. (2022). 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., Martin de Lagarde, V., Monteil, C., Vaugeois, J.-M., Corbière, C., & Rogez-Florent, T. (2021). Validation of a Fast and Simple HPLC-UV Method for the Quantification of Adenosine Phosphates in Human Bronchial Epithelial Cells. *Molecules*, 26(20), 6324. <https://doi.org/10.3390/molecules26206324>

Karlsson, N., Fångmark, I., Häggqvist, I., Karlsson, B., Rittfeldt, L., & Marchner, H. (1991). Mutagenicity testing of condensates of smoke from titanium dioxide/hexachloroethane and zinc/hexachloroethane pyrotechnic mixtures. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 260(1), 39–46. [https://doi.org/10.1016/0165-1218\(91\)90078-Z](https://doi.org/10.1016/0165-1218(91)90078-Z)

Kelly, F. J., & Fussell, J. C. (2015). Linking ambient particulate matter pollution effects with oxidative biology and immune responses : Oxidative stress, inflammation, and particulate matter toxicity. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1340(1), 84–94. <https://doi.org/10.1111/nyas.12720>

Kosanke, K. L., Kosanke, B. J., Sturman, B., Shimizu, T., Wilson, M., von Maltiz, I., Hancox, R., Kubota, N., Jennings-White, C., Chapman, D., Dillehay, D. R., Smith, T., & Podlesak, M. (2013). *Pyrotechnic Chemistry* (Journal of Pyrotechnics Inc). <http://www.jpYRO.com>

Kwon, H.-S., Ryu, M. H., & Carlsten, C. (2020). Ultrafine particles : Unique physicochemical properties relevant to health and disease. *Experimental & Molecular Medicine*, 52(3), 318–328. <https://doi.org/10.1038/s12276-020-0405-1>

Lan, Y., Ng, C. T., Ong, C. N., Yu, L. E., & Bay, B. H. (2021). Transcriptomic analysis identifies dysregulated genes and functional networks in human small airway epithelial cells exposed to ambient PM_{2.5}. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 208, 111702. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111702>

Li, J., Li, J., Wang, G., Ho, K. F., Dai, W., Zhang, T., Wang, Q., Wu, C., Li, L., Li, L., & Zhang, Q. (2021). Effects of atmospheric aging processes on in vitro induced oxidative stress and chemical composition of biomass burning aerosols. *Journal of Hazardous Materials*, 401, 123750. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123750>

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. *Environmental Health Perspectives*, 111(4), 455–460. <https://doi.org/10.1289/ehp.6000>

Lin, C.-H., Lung, S.-C. C., Chen, Y.-C., & Wang, L.-C. (2021). Pulmonary toxicity of actual alveolar deposition concentrations of ultrafine particulate matters in human normal bronchial epithelial cell. *Environmental Science and Pollution Research*, 28(36), 50179–50187. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-14265-y>

Loboda, A., Damulewicz, M., Pyza, E., Jozkowicz, A., & Dulak, J. (2016). Role of Nrf2/HO-1 system in development, oxidative stress response and diseases : An evolutionarily conserved mechanism. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73(17), 3221–3247. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2223-0>

Longhin, E., Pezzolato, E., Mantecca, P., Holme, J. A., Franzetti, A., Camatini, M., & Gualtieri, M. (2013). Season linked responses to fine and quasi-ultrafine Milan PM in cultured cells. *Toxicology in Vitro*, 27(2), 551–559. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2012.10.018>

Macaulay, M. B., & Mant, A. K. (1964). SMOKE-BOMB POISONING. A FATAL CASE FOLLOWING THE INHALATION OF ZINC CHLORIDE SMOKE. *Journal of the Royal Army Medical Corps*, 110, 27–32.

Martin de Lagarde, V., Rogez-Florent, T., Cazier, F., Dewaele, D., Cazier-Dennin, F., Ollivier, A., Janona, M., Achard, S., André, V., Monteil, C., & Corbière, C. (2022). Oxidative potential and in vitro toxicity of particles generated by pyrotechnic smokes in human small airway epithelial cells. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 239, 113637. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.113637>

Merk, R., Heßelbach, K., Osipova, A., Popadić, D., Schmidt-Heck, W., Kim, G.-J., Günther, S., Piñeres, A. G., Merfort, I., & Humar, M. (2020). Particulate Matter (PM_{2.5}) from Biomass Combustion Induces an Anti-Oxidative Response and Cancer Drug Resistance in Human Bronchial Epithelial BEAS-2B Cells. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(21), 8193. <https://doi.org/10.3390/ijerph17218193>

National Research Council (U.S.). (1997). *Toxicity of Military Smokes and Obscurants : Volume 1* (p. 5582). National Academy Press. <https://doi.org/10.17226/5582>

National Research Council (U.S.) (Éd.). (1999). *Toxicity of Military Smokes and Obscurants : Volume 3* (p. 9645). National Academies Press. <https://doi.org/10.17226/9645>

Niu, B.-Y., Li, W.-K., Li, J.-S., Hong, Q.-H., Khodahemmati, S., Gao, J.-F., & Zhou, Z.-X. (2020). Effects of DNA Damage and Oxidative Stress in Human Bronchial Epithelial Cells Exposed to PM_{2.5} from Beijing, China, in Winter. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(13), 4874. <https://doi.org/10.3390/ijerph17134874>

Paz, H. B., Tisdale, A. S., Danjo, Y., Spurr-Michaud, S. J., Argüeso, P., & Gipson, I. K. (2003). The role of calcium in mucin packaging within goblet cells. *Experimental Eye Research*, 77(1), 69–75. [https://doi.org/10.1016/S0014-4835\(03\)00084-8](https://doi.org/10.1016/S0014-4835(03)00084-8)

Peixoto, M. S., de Oliveira Galvão, M. F., & Batistuzzo de Medeiros, S. R. (2017). Cell death pathways of particulate matter toxicity. *Chemosphere*, 188, 32–48. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.08.076>

Pettilä, V., Takkunen, O., & Tukiainen, P. (2000). Zinc chloride smoke inhalation : A rare cause of severe acute respiratory distress syndrome. *Intensive Care Medicine*, 26(2), 215–217. <https://doi.org/10.1007/s001340050049>

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., & Nesslany, 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. *Science of The Total Environment*, 711, 134666. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134666>

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. *Scientific Reports*, 9(1), 500. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36735-z>

Sethi, G. S., Dharwal, V., & Naura, A. S. (2019). Immunological Basis of Oxidative Stress-Induced Lung Inflammation in Asthma and COPD. In S. Chakraborti, T. Chakraborti, S. K. Das, & D. Chattopadhyay (Éds.), *Oxidative Stress in Lung Diseases* (p. 195–223). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-13-8413-4_11

Skuland, T. S., Refsnes, M., Magnusson, P., Oczkowski, M., Gromadzka-Ostrowska, J., Kruszewski, M., Mruk, R., Myhre, O., Lankoff, A., & Øvrevik, J. (2017). Proinflammatory effects of diesel exhaust particles from moderate blend concentrations of 1st and 2nd generation biodiesel in BEAS-2B bronchial epithelial cells—The FuelHealth project. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 52, 138–142. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2017.04.004>

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. *Environmental Research*, 176, 108538. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.108538>

Steenhof, M., Gosens, I., Strak, M., Godri, K. J., Hoek, G., Cassee, F. R., Mudway, I. S., Kelly, F. J., Harrison, R. M., Lebre, E., Brunekreef, B., Janssen, N. A., & Pieters, R. H. (2011). In vitro toxicity of particulate matter (PM) collected at different sites in the Netherlands is associated with PM composition, size fraction and oxidative potential—The RAPTES project. *Particle and Fibre Toxicology*, 8(1), 26. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-8-26>

Terzano, C., Di Stefano, F., Conti, V., Graziani, E., & Petroianni, A. (2010). Air pollution ultrafine particles : Toxicity beyond the lung. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 14(10), 809–821.

Valavanidis, A., Vlachogianni, T., Fiotakis, K., & Loridas, S. (2013). Pulmonary Oxidative Stress, Inflammation and Cancer : Respirable Particulate Matter, Fibrous Dusts and Ozone as Major Causes of Lung Carcinogenesis through Reactive Oxygen Species Mechanisms. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 10(9), 3886–3907. <https://doi.org/10.3390/ijerph10093886>

van Hulst, M., de Klerk, W. P. C., Langenberg, J. P., Tuinman, I. L., & Alblas, M. J. (2013, mai 27). *The effects of smoke hand grenades on human lung cells and bacteria for toxicity screening purposes*. 39th International Pyrotechnic Seminar, Valencia, Spain.

van Hulst, M., Langenberg, J. P., de Klerk, W. P. C., & Alblas, M. J. (2017). Acute Toxicity Resulting from Human Exposures to Military Smokes. *Propellants, Explosives, Pyrotechnics*, 42(1), 17–23. <https://doi.org/10.1002/prep.201600223>

Xiao, G. G., Wang, M., Li, N., Loo, J. A., & Nel, A. E. (2003). Use of Proteomics to Demonstrate a Hierarchical Oxidative Stress Response to Diesel Exhaust Particle Chemicals in a Macrophage Cell Line. *Journal of Biological Chemistry*, 278(50), 50781–50790. <https://doi.org/10.1074/jbc.M306423200>

Xu, F., Shi, X., Qiu, X., Jiang, X., Fang, Y., Wang, J., Hu, D., & Zhu, T. (2020). Investigation of the chemical

components of ambient fine particulate matter (PM_{2.5}) associated with in vitro cellular responses to oxidative stress and inflammation. *Environment International*, 136, 105475.

<https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.105475>

Zhao, C., Wang, Y., Su, Z., Pu, W., Niu, M., Song, S., Wei, L., Ding, Y., Xu, L., Tian, M., & Wang, H. (2020). Respiratory exposure to PM_{2.5} soluble extract disrupts mucosal barrier function and promotes the development of experimental asthma. *Science of The Total Environment*, 730, 139145.

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139145>

Zheng, F., Gonçalves, F. M., Abiko, Y., Li, H., Kumagai, Y., & Aschner, M. (2020). Redox toxicology of environmental chemicals causing oxidative stress. *Redox Biology*, 34, 101475.

<https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101475>

Supp Data

1. Cell viability after 24h exposure to particles

Table S1 : Cell cycle analysis. NHBE cells were exposed during 24 h to RSS or HC-OS particles (6.25 ; 12.5 ; 25 ; 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$). Results are presented as percentage of cells in each cell cycle phases and compared to control (cells cultured with PBS). Data were expressed as mean value $\pm$ SD of at least three independent experiments.

	Concentration ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	RSS particles			HC-OS particles		
		G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
24h of exposure	0	88.0 $\pm$ 1.6	1.3 $\pm$ 0.4	10.5 $\pm$ 2	90 $\pm$ 1.8	0.8 $\pm$ 0.2	9.3 $\pm$ 1.9
	6.25 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	88.1 $\pm$ 0.6	0.9 $\pm$ 0.2	11.0 $\pm$ 0.6	89.6 $\pm$ 1.3	0.7 $\pm$ 0.2	9.8 $\pm$ 1.4
	12.5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	90.1 $\pm$ 1.8	1.3 $\pm$ 0.4	8.3 $\pm$ 2.2	90.2 $\pm$ 2.5	0.7 $\pm$ 0.2	9.2 $\pm$ 2.3
	25 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	88.2 $\pm$ 2.8	1.1 $\pm$ 0.2	10.7 $\pm$ 3.0	90.5 $\pm$ 2.5	0.7 $\pm$ 0.2	8.8 $\pm$ 2.6
	50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	88.0 $\pm$ 1.8	1.5 $\pm$ 0.8	10.3 $\pm$ 2.6	91.0 $\pm$ 1.8	1.0 $\pm$ 0.5	8.2 $\pm$ 1.7

2. Epithelium barrier integrity after 24h exposure to particles

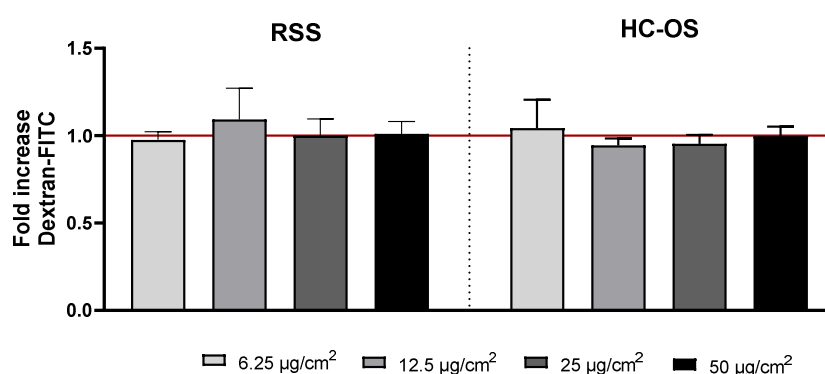


Figure S1. Epithelium barrier integrity analysis using Dextran-FITC assay. NHBE cells were exposed during 24 h to RSS or HC-OS particles (6.25 ; 12.5 ; 25 ; 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$). Results are presented as ratio of fluorescence signal compared to control (cells cultured with PBS). Data were expressed as mean value $\pm$ SD ($n \geq 3$).

3. Cell viability after repeated exposure to RSS particles

Table S2 : Cell cycle analysis. NHBE cells were submitted to four treatments of 16h to RSS particles (3.125 ; 12.5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$). Results are presented as percentage of cells in each cell cycle phases and compared to control (cells cultured with PBS). Data were expressed as mean value $\pm$ SD ($n \geq 3$).

<i>Concentration ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)</i>	<i>G₀/G₁</i>	<i>S</i>	<i>G₂/M</i>
0	92.9 $\pm$ 2.6	1.2 $\pm$ 0.3	6.5 $\pm$ 2.6
3.125 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	92.1 $\pm$ 3.0	1.3 $\pm$ 0.5	7.1 $\pm$ 3.2
12.5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	91.9 $\pm$ 2.7	1.6 $\pm$ 0.4	7.1 $\pm$ 2.7

Table S3 : ATP content. NHBE cells were submitted to four treatments of 16h to RSS particles (3.125; 12.5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$). Results are expressed as nmol / mg proteins. Data were expressed as mean value $\pm$ SD ($n \geq 3$).

<i>Concentration ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)</i>	<i>ATP (nmol/mg proteins)</i>
0	1.2 $\pm$ 0.4
3.125	0.95 $\pm$ 0.06
12.5	0.91 $\pm$ 0.3

Discussion

L'objectif de ce travail de thèse a été d'évaluer la toxicité de particules issues de la combustion de fumigènes afin de compléter les données de la littérature souvent obtenues à partir d'aérosols complets. Les particules étudiées proviennent de la combustion d'un fumigène de signalisation de couleur rouge (RSS), d'un fumigène anti-intrusion (AIS) et d'un fumigène de camouflage à base d'hexachloroéthane (HC-OS). Pour réaliser cet objectif, nous avons associé des approches acellulaires et cellulaires, grâce à l'utilisation de mesures de potentiel oxydant des particules après récupération sur site à l'aide d'impacteurs en cascade et de deux modèles primaires de cellules épithéliales pulmonaires humaines, représentatifs de l'épithélium respiratoire. La caractérisation physico-chimique des particules a fait l'objet d'une étude dans le cadre d'un projet de recherche plus large dans lequel s'est inscrit cette thèse (Projet FUMITOX, ANR, Astrid).

1. Caractéristiques physico-chimiques des particules

Les conditions de prélèvements pour la collecte des particules ont été réalisées en collaboration avec le centre commun de mesures de Dunkerque au sein d'un centre d'expérimentation de la DGA, de telle sorte à avoir une quantité importante de particules pour la réalisation du projet. Diverses configurations de tirs de grenade de fumigènes ont été testées : tirs en enceintes ouverte et semi-ouverte, tirs en fûts pour canaliser les émissions, tirs en enceinte fermée à l'aide d'un tunnel de tir. La collecte a été réalisée à l'aide d'impacteurs en cascades, de façon active à l'aide de pompes et ont permis d'obtenir des quantités de l'ordre du mg/m^3 en quelques dizaines de minutes. Cette approche a permis d'obtenir des quantités de particules importantes (plusieurs dizaines de milligrammes en fonction du type de fumigène utilisé et de la configuration expérimentale de prélèvement). Bien que ces conditions expérimentales ne soient pas représentatives des concentrations inhalées par les militaires, les fumigènes, comme d'autres activités pyrotechniques, génèrent de façon importante des particules. Par exemple, les feux d'artifices sont à l'origine de concentrations de plusieurs centaines de $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (C.-C. Lin, 2016) alors que les quantités de particules générées par des armes de tirs légères sont de l'ordre du mg/m^3 (Bergström et al., 2015; Mariussen et al., 2021; Wingfors et al., 2014). Concernant leur taille, les particules des trois types de fumigènes sont majoritairement répartis dans la fraction de taille inférieure à 400 nm, ce qui permet de les classer dans la catégorie des particules fines à très fines, suggérant que ces particules ont la capacité de

se déposer profondément dans l'appareil respiratoire (Kwon et al., 2020; Terzano et al., 2010). Les tailles des particules étudiées dans ce travail sont inférieures à celles retrouvées dans la littérature portant sur les fumigènes $< 5 \mu\text{m}$ (Karlsson et al., 1991), $< 2 \mu\text{m}$ (Hemmilä et al., 2013; van Hulst et al., 2017) ou $< 1 \mu\text{m}$ (Hemmilä, Hihkiö, & Linnainmaa, 2007). Cette différence peut être expliquée par la méthode de collecte réalisée directement *in situ* dans ce projet ainsi que de la méthode de mesure granulométrique en temps réel. Ces résultats sont comparables à ceux retrouvés avec d'autres activités pyrotechniques tels que les feux d'artifices pour lesquels des tailles comprises entre 100 et 500 nm ont été relevées (Do et al., 2012; M. Kumar et al., 2016; C.-C. Lin et al., 2014; Nirmalkar et al., 2013; Pathak et al., 2015; Retama et al., 2019; Tian et al., 2014).

Une caractérisation chimique des particules a été réalisée par l'analyse de la composition élémentaire, des ions hydrosolubles, des métaux et des composés organiques. L'analyse élémentaire indique que les particules de RSS et AIS sont majoritairement organiques (environ 70% de carbone) contrairement aux particules HC-OS qui n'en contiennent que 2%, suggérant que ces particules seraient composées majoritairement d'élément inorganiques. Parmi les ions d'intérêt, le K^+ et le Cl^- sont les ions communs majoritaires aux trois types de particules. L'ion K^+ étant considéré comme un élément traceur des particules de feux d'artifices (Chatterjee et al., 2013; Cheng et al., 2014; C.-C. Lin et al., 2014; Yao et al., 2019a), il pourrait servir également de traceur des fumigènes. Concernant les métaux, les particules de RSS sont caractérisées par des quantités importantes d'antimoine (total et soluble), métal aussi retrouvé mais en moins grande quantité dans les particules AIS et HC-OS. Ce métal est également présent dans des particules émises par des armes de tirs (Aurell et al., 2019) et ferait partie de la composition de la charge propulsive (Dalby et al., 2010). De plus, les autres éléments communs les plus prépondérants aux trois types de particules sont le K et l'Al qui sont des éléments métalliques majoritairement retrouvés dans l'air après des épisodes de feux d'artifices (Crespo et al., 2012; Godri et al., 2010; C.-C. Lin, 2016). Les particules HC-OS sont caractérisées par des quantités extrêmement élevées (totale et soluble) en Al, Fe et Ca, et contiennent de nombreux autres métaux tels que Zn, Sn, Mg, S, Na, laissant présumer une forte toxicité de la part de ces particules. L'analyse des composés organiques indique que la composition des particules des trois fumigènes est très différente. En effet, les particules de RSS contiennent de nombreux composés tels que des

dérivés de HAP notamment du naphthalène et de l'anthracène, des alcanes ou encore des quinones comme la 1,3 triméthyl-anthraquinone. Les fumigènes colorés sont composés de colorants appartenant à la famille des anthraquinones qui peuvent représenter au moins 40% de la composition du fumigène (National Research Council (U.S.), 1999). Des dérivés du naphthalène sont également retrouvés dans des particules d'armes de tirs ainsi que d'autres HAP tels que le fluoranthène, fluorène, pyrène, benzo[b+j]fluoranthène, benzo[ghi]pérylène, benzo[a]pyrène, acénaphthylène, phenantrène, ou encore le benzo[a]fluoranthène (Aurell et al., 2019; Moxnes et al., 2013; Wingfors et al., 2014). Les particules AIS contiennent des molécules polycycliques avec fonctions oxygénées périphériques appartenant à la famille des triterpénoïdes. Les particules de HC-OS sont constituées de composés organiques chlorés dérivant de l'hexachlorobenzène, notons également la présence de phénantrène. L'approche pour analyser les composés organiques avait pour objectif d'identifier l'ensemble des composés présents dans les particules de fumigènes. Il s'agit donc d'une approche qualitative ne permettant pas de connaître les concentrations en composés organiques.

La caractérisation physico-chimique des particules a donc mis en évidence des compositions différentes entre les fumigènes pouvant alors induire des réponses acellulaires et cellulaires différentes.

2. Potentiel oxydant

Le potentiel oxydant (PO) des particules a été évalué par la mesure de la déplétion en antioxydants, l'acide ascorbique (AA) et le glutathion réduit (GSH) ainsi que par la méthode du dithiothréitol (DTT). Les résultats de la déplétion en AA ont montré des valeurs de PO plus fortes pour les particules HC-OS par rapport aux autres particules et des valeurs similaires entre les particules RSS et AIS. Les particules HC-OS étant très riches en métaux, nos résultats sont en accord avec d'autres études qui montrent que les métaux sont fortement responsables de la déplétion de l'AA (Bates et al., 2019; Visentin et al., 2016). Les très fortes quantités en Al et Fe des particules HC-OS pourraient expliquer ces résultats puisque ces métaux sont capables d'induire l'oxydation de l'AA (Godri et al., 2010, 2011; Janssen et al., 2014; Koehler et al., 2014). Les faibles déplétions de l'AA (<10%) observées par les particules RSS et AIS résultent très probablement de leurs quantités en métaux qui sont 10 à 100 fois inférieures à celles retrouvées dans des

PM_{2.5} qui ont été capables d'induire une forte déplétion de l'AA (Crobeddu et al., 2017; Visentin et al., 2016). Aucune des particules de fumigènes n'a induit de déplétion du GSH. Dans la littérature, le Cu (Fang et al., 2016; Janssen et al., 2014; Visentin et al., 2016) est principalement responsable de la déplétion du GSH, mais nous n'avons pas détecté de Cu ou alors sa quantité était minoritaire dans les particules de fumigènes, ce qui peut expliquer nos résultats.

Bien que le PO soit de plus en plus utilisé pour évaluer la toxicité des particules de différentes sources, il semble qu'une seule étude se soit intéressée au PO de particules issues d'activités pyrotechniques, en comparaison à celui obtenu avec des particules du trafic routier (Godri et al., 2010). Le PO a été mesuré par le test de déplétion en antioxydants (AA et GSH) dans les mêmes conditions que celles de notre étude. Les résultats montrent que les particules de feux d'artifices induisent uniquement une déplétion du GSH qui est plus forte que celle médiée par celles du trafic routier. Les métaux des particules du trafic routier (Ba, Mo, Fe, Cu) et des feux d'artifices (Pb, Sr) ont été corrélés à la déplétion du GSH. De plus, les métaux des particules du trafic routier, excepté le Cu sont également corrélés à la déplétion de l'AA. Cette étude met en évidence que les particules issues de feux d'artifices ont un PO supérieur aux particules issues du trafic routier, soulignant les potentiels effets toxiques de ce type de particules.

La mesure du PO par la déplétion DTT a montré que les particules RSS ont une réactivité plus importante que les particules AIS et HC-OS avec cette méthode. Le test du DTT est décrit comme très sensible aux métaux et aux quinones (Calas et al., 2018; A. K. Cho et al., 2005; Crobeddu et al., 2017; Fang et al., 2016; Guo et al., 2020; Verma et al., 2015). En raison de fortes quantités de métaux retrouvées dans les particules de l'air ambiant, il est considéré que les métaux sont les éléments contribuant le plus à la déplétion du DTT, entre 40% et 80% (Charrier & Anastasio, 2012; Lyu et al., 2018; Nishita-Hara et al., 2019; Verma et al., 2015) et donc domineraient la réponse du DTT. Cependant, les particules HC-OS qui sont très riches en métaux sont moins réactives que les particules RSS. Comme mentionné précédemment, les quinones participent également à la déplétion du DTT et il apparaît qu'elles ont un pouvoir oxydant du DTT bien plus élevé que les métaux (Charrier & Anastasio, 2012; Lyu et al., 2018). Les particules de RSS sont composées de triméthyl-anthraquinone, probablement en forte quantité, ce qui pourrait expliquer la forte déplétion du DTT. De plus, les particules de RSS contiennent des HAP notamment des dérivés du naphthalène qui pourraient également induire la déplétion du

DTT. Certaines études rapportent des corrélations entre la concentration totale en HAP de particules et le PO mesuré par le DTT (Calas et al., 2018; Crobeddu et al., 2017; Gao et al., 2020).

En conclusion, les deux méthodes de mesures du PO ont des sensibilités différentes aux particules de fumigènes mais les analyses démontrent que les particules possèdent un PO. Ainsi, ces résultats mettent en évidence la nécessité d'utiliser plusieurs méthodes pour évaluer le PO de particules, chacune des méthodes apportant des informations complémentaires, ce qui est conforme à plusieurs études sur le PO (Caumo et al., 2022; Conte et al., 2017; Fang et al., 2016; Janssen et al., 2014; Moufarrej et al., 2020).

3. Comparaison de la toxicité aiguë des particules de fumigène sur les modèles SAEC et NHBE

En raison de la taille des particules de fumigènes et de leur capacité à se déposer profondément dans l'appareil respiratoire, nous avons étudié la toxicité *in vitro* des particules de fumigènes sur deux modèles de cellules humaines épithéliales pulmonaires représentatifs de différents niveaux de l'appareil respiratoire. En effet, le modèle NHBE est représentatif de l'épithélium trachéo-bronchique alors que le modèle SAEC représente la partie distale des bronches, l'épithélium bronchiolaire. Ces deux modèles sont issus de donneurs sains et ont été cultivés à l'IAL dans le but de permettre la différenciation des cellules et de reconstituer des épithélia synthétiques proches des conditions physiologiques. Le modèle SAEC a été cultivé pendant 7 jours à l'IAL avant exposition, ce qui a permis l'augmentation de l'expression de marqueurs de différenciation tels que la MUC5AC et la tubuline 4A, comparés au jour de mise en IAL. Cependant, bien que ce temps de culture à l'IAL soit retrouvé dans quelques études (C. R. Svensson et al., 2016; Thaikoottathil et al., 2009), une autre étude a utilisé les SAEC à l'IAL pendant 28 jours et a mis en évidence une différenciation en épithélium pseudo-stratifié mucociliaire (Lan et al., 2021). Le modèle NHBE a été cultivé pendant 14 jours à l'IAL, ce qui est un temps suffisant pour obtenir une différenciation en un épithélium pseudo-stratifié mucociliaire caractérisé en microscopie et par l'expression de marqueurs de différenciation et de jonctions cellulaires (MUC5AC, FOXJ1, ZO-1, OCLN) (Juarez-Facio et al., 2022). Ce modèle cellulaire peut être encore maintenu pendant plusieurs semaines à l'IAL permettant des

expositions chroniques (Leclercq et al., 2016; Rayner et al., 2019; Ross et al., 2007; Sotty et al., 2019).

Les informations disponibles sur les concentrations de particules émises par les fumigènes étant très limitées, le choix de nos concentrations a reposé sur la littérature des particules atmosphériques en exposition sur des modèles cellulaires cultivés à l'IAL. Pour l'exposition aiguë, nous avons choisi des concentrations entre 12,5 et 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Bien que ces concentrations soient élevées, (Lan et al., 2021) justifient que des doses de 11 à 45 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ sont équivalentes à une exposition cumulative sur 24h de concentrations de $\text{PM}_{2.5}$ comprises entre 7 et 30 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, correspondant à un indice de qualité de l'air aux États-Unis (2019) entre « bon » et « modéré ». De même, sur un modèle de co-culture utilisant des NHBE, les doses d'exposition aux particules ont été définies entre 7 et 45 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (Abbas et al., 2016). Ainsi, les doses d'expositions utilisées dans ce travail restent cohérentes avec la littérature et permettent de garder des cellules viables comme l'indiquent les marqueurs de viabilité investigués dans ce travail (test au MTT, mesures d'ATP et de cycle cellulaire), et discutés ci-après.

Etant donné que les particules de fumigènes possèdent un PO, il nous a semblé intéressant de savoir si elles étaient capables d'induire un stress oxydant *in vitro* associé ou non à une réponse inflammatoire. Les résultats comparatifs des marqueurs biologiques étudiés après 24h d'exposition aux particules RSS et HC-OS communs aux modèles SAEC et NHBE sont présentés dans le **Tableau 7**. La cytotoxicité évaluée par le test MTT, l'expression d'enzymes antioxydantes et de marqueurs inflammatoires *IL-8*, *IL-6* et *TNF- α* ont été analysés.

Tableau 7. Synthèse et comparaison des marqueurs biologiques induits après 24h d'exposition aux particules RSS et HC-OS (12,5 ; 25 et 50 µg/cm²). Les résultats sont exprimés en ratio d'expression par rapport au contrôle PBS. NS : non significatif, nd : non déterminé

Marqueurs biologiques	SAEC		NHBE	
	RSS	HC-OS	RSS	HC-OS
Cytotoxicité (test MTT)	NS	NS	NS	NS
ARNm SOD-1	NS	NS	12,5 µg/cm ² NS 25 ; 50 µg/cm ² (1,3 à 1,5 ; *p<0,05)	NS
ARNm SOD-2	12,5 µg/cm ² (2,4 **p<0,01) 25 µg/cm ² (2,0 *p<0,05) 50 µg/cm ² (3,0 **p<0,01)	12,5 ; 25 ; 50 µg/cm ² (2,5 à 4,4 ; **p<0,01)	12,5 ; 25 µg/cm ² NS 50 µg/cm ² (1,3 ; *p<0,05)	NS
ARNm Catalase	NS	12,5 ; 25 ; 50 µg/cm ² (0,66 à 0,54 ; *p<0,05)	NS	NS
ARNm HO-1	12,5 µg/cm ² (3,3 ; **p<0,01) 25 µg/cm ² (4,8 ; *p<0,05) 50 µg/cm ² (14,4 ; **p<0,01)	NS	12,5 ; 25 ; 50 µg/cm ² (1,8 à 8,3 *p<0,05)	NS
ARNm NQO-1	12,5 ; 25 ; 50 µg/cm ² (5,5 à 10,1 ; **p<0,01)	12,5 µg/cm ² : NS 25 ; 50 µg/cm ² (2,3 à 3,1 ; **p<0,01)	12,5 ; 25 ; 50 µg/cm ² (2,7 à 6,4 *p<0,05)	12,5 ; NS 25 ; 50 µg/cm ² (1,5 et 1,7 ; *p<0,05)
ARNm IL-8	12,5 µg/cm ² (7,1 ; **p<0,01) 25 µg/cm ² (7,3 ; *p<0,05) 50 µg/cm ² (7,2 ; **p<0,01)	12,5 µg/cm ² (13,5 ; **p<0,01) 25 ; 50 µg/cm ² (9,4 à 13,5 ; ***p<0,001)	12,5 ; 25 ; 50 µg/cm ² (1,6 à 2,0 ; **p<0,01)	12,5 µg/cm ² NS 25 ; 50 µg/cm ² (2,0 *p<0,05)
ARNm IL-6	12,5 µg/cm ² NS 25 ; 50 µg/cm ² (0,6 **p<0,01)	12,5 ; 25 ; 50 µg/cm ² (2,0 **p<0,01)	nd	nd
ARNm TNF-α	NS	12,5 ; 25 ; 50 µg/cm ² (3,4 à 4,0 **p<0,01)	nd	nd

Aucune des doses testées pour les deux types de particules n'a montré de modification de la viabilité cellulaire après 24h d'exposition sur les deux modèles cellulaires (**Tableau 7**). Pourtant, toutes les études sur la toxicité *in vitro* de fumigènes de différentes familles telles que des formulations différentes à base d'hexachloroéthane, de rouge de phosphore ou des fumigènes de différentes couleurs (rouge, bleu, vert, jaune, orange, violet) rapportent une cytotoxicité de 10 à 100 % (Hemmilä et al., 2010, 2013; Hemmilä, Hihkiö, Kasanen, et al., 2007a; Hemmilä, Hihkiö, & Linnainmaa, 2007; van Hulst et al., 2017). Plusieurs différences sont à souligner entre ces études et notre travail. Dans ces études, l'exposition des cellules est réalisée par exposition à l'aérosol total des fumigènes, incluant une toxicité de la part des gaz émis. Par exemple, les effets toxiques des fumigènes à base d'HC sont principalement attribués à l'inhalation de $ZnCl_2$ (El Idrissi et al., 2017; Hsu et al., 2005). De même, le monoxyde de carbone émis lors de la combustion de fumigènes colorés contribuerait aux effets cytotoxiques mesurés (Hemmilä, Hihkiö, Kasanen, et al., 2007a). De plus, les concentrations d'exposition ne sont pas standardisées entre les études et il est difficile de les comparer avec celles utilisées dans ce travail. Enfin, ces études utilisent des lignées cellulaires (BEAS-2B et A549) non différenciées qui sont plus sensibles aux particules que des modèles primaires cultivés à l'IAL (Ghio et al., 2013).

Malgré cette absence de cytotoxicité, une exposition de 24h aux particules de RSS a augmenté significativement l'expression des gènes antioxydants dont *SOD-2*, *HO-1*, et *NQO-1* pour les deux modèles cellulaires ainsi que de *SOD-1* pour les cellules NHBE. Aucun effet sur la *CAT* n'est observé (**Tableau 7**). Généralement, une exposition aux particules a tendance à diminuer l'expression des *SOD* dans les cellules pulmonaires (Cui et al., 2020; Hur et al., 2022; Seriani et al., 2016; H. Wang et al., 2019) mais quelques études montrent également des inductions d'expression (Abbas et al., 2019; Fernando et al., 2019; Juarez Facio et al., 2022). L'étude de la réponse antioxydante est complexe et nécessite de réaliser des cinétiques d'exposition pour mieux comprendre les mécanismes sous-jacents. Les marqueurs antioxydants *HO-1* et *NQO-1* sont des enzymes qui sont très largement induites lors d'un stress oxydant médié par des particules (Crobeddu et al., 2017; Deng, Rui, et al., 2013; Fernando et al., 2019; Frias et al., 2020; Juarez-Facio et al., 2022; Niu et al., 2020; Skuland et al., 2017), ce qui est cohérent avec les inductions d'expression observées pour les deux modèles cellulaires. Ainsi, les particules RSS ont la capacité d'induire une forte réponse antioxydante dans les deux modèles cellulaires qui

pourrait être en lien avec la forte réponse des particules au test du DTT pour la mesure de leur PO. En effet, des corrélations entre le PO^{DTT} et les expressions de gènes *HO-1* et *SOD-2* induits par des particules ont été rapportés (Crobeddu et al., 2017, 2020; Karavalakis et al., 2017; N. Li, Sioutas, et al., 2003). Des différences entre les deux modèles sont observées après 24h d'exposition aux particules HC-OS. Les cellules SAEC semblent plus sensibles à ces particules, avec une augmentation des expressions de *SOD-2* et *NQO-1* ainsi qu'une diminution de la *CAT* alors que seule l'expression de *NQO-1* est augmentée dans les cellules NHBE (**Tableau 7**).

Concernant la réponse inflammatoire, une exposition de 24h aux particules de RSS a induit une augmentation significative de l'expression du gène *IL-8* dans les deux modèles cellulaires, plus importante pour le modèle SAEC que NHBE, et une diminution de l'expression de l'*IL-6* (**Tableau 7**). L'exposition aux particules HC-OS a induit une forte réponse inflammatoire dans le modèle SAEC, marquée par des augmentations d'expressions de l'*IL-8*, l'*IL-6* et du *TNF-α* à toutes les concentrations. Dans le modèle NHBE, les particules HC-OS augmentent faiblement l'expression de l'*IL-8* comparé aux SAEC. Ces résultats sont cohérents avec ceux retrouvés dans la littérature pour d'autres types de particules, tels que des DEP, des PM_{2.5} ou encore des particules ultrafines montrant des inductions ou des diminutions d'une ou plusieurs cytokines selon le type de particules étudiées (Bengalli et al., 2019; Juarez Facio et al., 2022; Lan et al., 2021; Luo et al., 2021; Totlandsdal et al., 2010; Vattanasit et al., 2014). Ainsi, les résultats obtenus semblent suggérer une forte réponse inflammatoire dans le modèle SAEC pour les deux types de particules.

Les différences de réponses observées entre les deux modèles pour les particules HC-OS et en particulier en ce qui concerne la réponse inflammatoire résultent probablement de la différence majeure entre les modèles à former un épithélium pseudostratifié mucociliaire. En effet, le modèle NHBE cultivé à l'IAL est capable de développer un épithélium pseudo stratifié mucociliaire (Juarez-Facio et al., 2022) contrairement aux SAEC dont la culture à l'IAL à 7 jours est plus limitée pour obtenir ce type d'épithélium. Ainsi, le mucus produit par les cellules NHBE forme très probablement une barrière protectrice par piégeage des particules (Webster & Tarran, 2018) et également par les nombreuses protéines antimicrobiennes et anti-inflammatoires qui le constituent (Sanchez-Guzman et al., 2021).

En conclusion, ces résultats montrent que les cellules épithéliales trachéobronchiques (NHBE) et bronchiolaires (SAEC) mettent en place des défenses antioxydantes et déclenchent une réponse inflammatoire qui est spécifique à chaque fumigène, sans pour autant induire de mortalité, ce qui pourrait correspondre à une réponse adaptative. De plus, le modèle SAEC paraît plus sensible comparé au modèle NHBE, probablement en raison de la capacité de ce dernier à former un épithélium pseudostratifié pourvu d'une fonction mucociliaire. Afin d'approfondir l'induction d'un stress oxydant par les particules de fumigènes, d'autres marqueurs ont été étudiés avec le modèle NHBE.

4. Étude de la toxicité aiguë des particules HC-OS et RSS sur le modèle NHBE

Des expositions d'1h, 4h et de 24h aux particules RSS ont provoqué une production d'ERO dépendante de la concentration. D'autres particules d'origine pyrotechnique émises par des feux d'artifices de différentes couleurs (Hickey et al., 2020) ou par différentes armes de tirs (Bergström et al., 2015) ont induit une production d'ERO dans les cellules BEAS-2B ainsi que dans des cellules NHBE et A549, après 3,5h et 24h d'exposition, respectivement. Ces deux études ont montré que les composés à l'origine de production d'ERO dans les cellules sont des particules riches en Pb, Cu et Zn. Cette observation n'est cependant pas transposable aux particules RSS qui ne présentent pas la même composition en métaux. Cependant, de nombreux types de particules (PM₁₀, PM_{2.5}), d'origines variés (urbaine, combustion, industrielle), avec des compositions chimiques différentes sont capables d'induire une production d'ERO dans des cellules pulmonaires (Baulig et al., 2009; Chirino et al., 2010; Cui et al., 2020; Hong et al., 2016; Pardo et al., 2015; Seriani et al., 2016). Généralement, une surproduction d'ERO est associée à une diminution des SOD (Chirino et al., 2010; Chu et al., 2016; Deng, Zhang, et al., 2013; Hong et al., 2016; Niu et al., 2020; Seriani et al., 2016; C. Zhao et al., 2020) mais dans notre étude nous observons une augmentation de l'expression de ces marqueurs antioxydants après 24h d'exposition ainsi que 24h post exposition. L'expression de ces enzymes antioxydantes est souvent variable au cours du temps d'exposition aussi, une cinétique est nécessaire pour mieux caractériser ces altérations. De même, nous avons observé une

augmentation de la concentration de glutathion total alors que des études rapportent que des expositions de 24h à des PM_{2,5} (Niu et al., 2020 ; Zhao et al., 2020) ou PM₁₀ (Chirino et al., 2010) ont causé une diminution de sa concentration dans des cellules pulmonaires. Nous pouvons supposer que la concentration de glutathion est d'abord diminué afin de neutraliser les ERO produits précocément à 1h et 4h, puis augmentée en réaction à la production prolongée d'ERO à 24h. En effet, par exemple, 3h d'exposition à des particules ultrafines a réduit le niveau de glutathion mais a été suivi d'une augmentation après 24h d'exposition dans les cellules BEAS-2B (Juarez Facio et al., 2022). La forte induction de l'expression de *NQO-1* est retrouvée au niveau protéique après 24h d'exposition et 24h post exposition. *NQO-1* est bien connu pour être induit par les quinones et catalyser leur réduction (Burchiel et al., 2007; Dinkova-Kostova & Talalay, 2010). Ainsi, la forte induction de *NQO-1* est sûrement liée aux anthraquinones présentes dans les particules RSS. En effet, les colorants des fumigènes colorés sont composés d'anthraquinones qui peuvent compter pour au moins 40 % de la composition totale des fumigènes rouges (National Research Council (U.S.), 1999). De plus, par le cycle rédox des quinones, cette forte expression de *NQO-1* peut entraîner une production excessive d'O₂^{•-} (Valavanidis et al., 2013; Zheng et al., 2020) pouvant expliquer la production prolongée d'ERO à 24h. L'ensemble de ces enzymes antioxydantes sont régulées par les voies AhR et Nrf-2 activables par les particules (Deng, Zhang, et al., 2013; Frias et al., 2020; Loboda et al., 2016; Merk et al., 2020; Pardo et al., 2020; H. Zhang et al., 2012). Ainsi, mesurer l'implication de ces facteurs de transcription permettrait de détecter plus précocément la réponse antioxydante et d'en mieux comprendre les mécanismes.

Enfin, l'expression du marqueur pro-inflammatoire *IL-8* est restée significativement élevée 24h après la fin de l'exposition aux particules RSS. Cette réponse inflammatoire pourrait être approfondie par la mesure de l'expression et de la sécrétion de plusieurs cytokines ou chémokines, tels que IL-1 β , GM-CSF ou MCP-1, à différents temps d'exposition.

Concernant les particules HC-OS, une faible réponse antioxydante associée à une faible réponse inflammatoire a été précédemment décrite, ce qui semble cohérent avec l'absence de surproduction d'ERO après 1h et 4h d'exposition. Toutefois, ce résultat est surprenant au vu de leur riche composition en métaux, notamment en Fe connu pour contribuer à la production d'ERO (Deng, Zhang, et al., 2013). De façon contradictoire, malgré l'absence d'ERO, les particules HC-OS ont induit une augmentation de la

concentration de glutathion total. Etant donné les rôles pléiotropes du glutathion dans la cellule, il reste cependant difficile d'attribuer ce résultat au seul stress oxydant qui devrait être évalué par des mesures du ratio du glutathion réduit sur le glutathion oxydé, non réalisées dans ce travail (Rahman et al., 1999).

L'ensemble de ces résultats démontre que les particules RSS induisent une réponse biologique plus forte que les particules HC-OS en provoquant un stress oxydant mis en évidence par la production d'ERO, une augmentation des défenses antioxydantes et par l'activation d'une réponse pro-inflammatoire. Des niveaux excessifs d'ERO, principalement sous forme radicalaire, peuvent causer de graves dommages à l'ADN, à l'ARN et aux protéines pouvant conduire au développement de cancers (Falcon-Rodriguez et al., 2016). D'ailleurs, les études de toxicité sur les fumigènes citées ont mis en évidence des effets génotoxiques ou mutagènes pour les fumigènes HC/Zn ; Hc/Zn/TNT et colorés (rouge, orange, violet, bleu, jaune, vert) (Hemmilä et al., 2010, 2013; Hemmilä, Hihkiö, Kasanen, et al., 2007a; Hemmilä, Hihkiö, & Linnainmaa, 2007; Mekki, 2017; van Hulst et al., 2017) montrant l'intérêt d'étudier ces potentiels effets avec les fumigènes utilisés dans ce travail. Enfin, le stress oxydant associé à une réponse inflammatoire peut être à l'origine ou contribuer au développement ou à l'aggravation de pathologies pulmonaires telles que l'asthme, la fibrose ou la BPCO (Falcon-Rodriguez et al., 2016). De plus, les résultats de microscopie ont montré des changements morphologiques de l'épithélium ainsi qu'une diminution de la densité des cils, particulièrement marqués 24h après la fin de l'exposition aux particules RSS. Une diminution du battement ciliaire *in vivo* peut favoriser la rétention des particules au niveau du poumon profond et induire une toxicité plus sévère pouvant conduire à un remaniement de l'épithélium (Churg et al., 2003; Coyne et al., 2002; Nordberg et al., 2020).

5. Toxicité répétée des particules RSS sur le modèle NHBE

Les particules de RSS s'étant révélées les plus toxiques, nous avons décidé d'exposer le modèle NHBE de façon répétée, 4 traitements de 16h par jour, à des concentrations de particules de RSS plus faibles (3,125 et 12,5 µg/cm²) qu'en exposition aiguë. Ces concentrations sont cohérentes avec d'autres études qui ont utilisé des doses comprises entre 1 et 10 µg/cm² de particules urbaines pour des expositions répétées sur le modèle NHBE différencié à l'IAL

Alors que nous avons observé des réponses antioxydantes et inflammatoires prolongées après l'arrêt de l'exposition ainsi qu'une internalisation des particules et des changements morphologiques de l'épithélium plus prononcés 24h après l'exposition aiguë aux particules de RSS, notre hypothèse était que des expositions répétées causeraient des dommages oxydatifs plus importants qu'après exposition aiguë. Or, les seules réponses induites sont une augmentation de l'expression de NQO-1 aux deux concentrations testées et une augmentation faible mais significative de la viabilité cellulaire à la plus forte concentration (12,5 µg/cm²). Ce dernier résultat pourrait être en lien avec l'augmentation de l'imperméabilité de la barrière épithéliale ainsi qu'avec les changements morphologiques de l'épithélium observés à cette concentration. Pour confirmer ces résultats, il serait pertinent de mesurer la résistance électrique transépithéliale (TEER) de l'épithélium au cours de l'exposition répétée ainsi que l'expression et la localisation des protéines impliquées dans les jonctions serrées. En effet, l'augmentation de l'imperméabilité obtenue avec le test au Dextran-FITC pourrait simplement être le résultat d'une hypersécrétion du mucus piégeant le Dextran. L'absence de stress oxydant pourrait également s'expliquer par une augmentation de la clairance muco-ciliaire du modèle lors des expositions répétées. En effet, lors d'observations des cellules au microscope optique, il semblerait qu'il y ait une hypersécrétion de mucus et un battement ciliaire plus rapide après la dernière exposition. Il est bien connu que les polluants atmosphériques, comme les DEP, les PM_{2.5} de diverses origines ou la fumée de cigarette favorisent l'expression des gènes de la mucine, telles que MUC5AC et une hypersécrétion de mucus dans des modèles pulmonaires cellulaires humains et chez l'animal (Deering-Rice et al., 2019; S. Feng et al., 2019; Kanai et al., 2015; Memon et al., 2020). Pour vérifier cette hypothèse, nous pourrions mesurer l'expression de la MUC5AC et d'autres mucines ainsi que la fréquence du battement ciliaire. De même, les expositions répétées semblent altérer les cils, il serait nécessaire de mesurer leur densité et leur longueur. Enfin, les changements morphologiques de l'épithélium sont à confirmer par de nouvelles analyses de microscopie avant d'en explorer les mécanismes.

Conclusions et perspectives

Ce travail de thèse avait pour objectif d'évaluer la toxicité pulmonaire *in vitro* de la fraction particulaire de fumigènes. En effet, la combustion de fumigènes génère des particules dont les effets sur la santé humaine sont très peu connus contrairement aux particules de l'air ambiant. Ainsi, nous avons étudié la fraction particulaire d'un fumigène de signalisation de couleur rouge (RSS), d'un fumigène anti-intrusion (AIS) et d'un fumigène de camouflage à base d'hexachloroéthane (HC-OS), principalement utilisés dans un cadre militaire. Bien qu'il existe de nombreux modèles cellulaires pulmonaires, peu sont représentatifs de l'épithélium pulmonaire humain, c'est pourquoi nous avons choisi de travailler avec des modèles de cellules primaires épithéliales trachéo-bronchiques (NHBE) et bronchiolaires (SAEC) cultivés à l'interface air liquide (IAL).

La toxicité des particules dépend fortement de leur taille qui va conditionner leur dépôt dans l'appareil respiratoire mais aussi de leur composition chimique complexe. Ainsi, les résultats de la caractérisation physicochimique ont mis en évidence que les particules produites par les trois types de fumigènes font parties de la classe des particules fines voire ultrafines, capables donc de se déposer profondément dans l'appareil respiratoire. Les trois types de particules présentent des compositions chimiques variables, notamment des différences au niveau des métaux et des composés organiques.

De nombreuses études portant sur la toxicité des particules ambiantes telles que les particules liées au trafic routier, aux activités industrielles ou encore aux processus de combustion ont mis en évidence un mécanisme de toxicité ubiquiste, le stress oxydant. C'est pourquoi, dans un premier temps, l'évaluation de la toxicité des particules a été réalisée par la mesure de leur potentiel oxydant (PO), à l'aide de deux méthodes acellulaires différentes : la déplétion en antioxydants et le test du DTT. Les résultats ont montré que les particules répondaient aux deux tests utilisés, avec des spécificités de réponses dépendantes du type de particules, probablement en raison de leurs compositions chimiques différentes. Ces résultats indiquent donc qu'elles possèdent un PO et soulignent l'importance d'utiliser plusieurs méthodes pour évaluer le PO de particules.

Dans un deuxième temps, nous avons évalué la toxicité aiguë (24h) des particules par une approche *in vitro* impliquant l'utilisation de deux modèles cellulaires primaires (NHBE et SAEC) cultivés à l'IAL. La culture à l'IAL du modèle NHBE a permis de travailler

sur des cellules différenciées formant un épithélium pseudo-stratifié doué d'une fonction mucociliaire.

L'étude de la toxicité aiguë sur le modèle SAEC a d'abord mis en évidence la capacité des trois types de particules de fumigènes à induire des réponses antioxydantes et inflammatoires, mécanismes impliqués dans l'induction d'un stress oxydant, sans effets cytotoxiques. Ces réponses cellulaires semblent être en lien avec le PO des particules et suggèrent la mise en place d'une réponse adaptative.

Afin d'explorer davantage les mécanismes du stress oxydant, d'autres marqueurs ont été étudiés sur le modèle NHBE pour les particules RSS et HC-OS. Tout d'abord, en accord avec les résultats sur le modèle SAEC, nos doses utilisées étaient non cytotoxiques. Les résultats de cette étude ont mis en évidence la capacité des particules RSS à induire un stress oxydant, caractérisé par une production d'ERO, une augmentation des défenses antioxydantes marquée par l'augmentation de glutathion total et de marqueurs antioxydants et inflammatoires dont certains marqueurs étaient toujours induits 24h post exposition aux particules RSS. Pour les mêmes marqueurs étudiés, les résultats de cette étude sont très similaires à ceux obtenus sur le modèle SAEC. L'ensemble de ces réponses cellulaires indique donc un stress oxydant causé par les particules RSS qui pourrait potentiellement induire des dommages aux constituants cellulaires et conduire à un remodelage de l'épithélium. En effet, parallèlement au stress oxydant et à une internalisation des particules visible de façon marquée 24h post exposition, des modifications morphologiques de l'épithélium ont pu être mises en évidence. Alors qu'une exposition aiguë aux particules HC-OS a induit des réponses antioxydantes et inflammatoires sur le modèle SAEC, très peu d'effets ont été observés sur le modèle NHBE. Ce manque d'effets est probablement causé par la capacité de ce modèle à former un épithélium mucociliaire sécrétant du mucus, capable de mieux se défendre face à ces particules.

Dans un troisième temps, nous avons évalué la toxicité après des expositions répétées (4 x 16h) aux particules de RSS sur le modèle NHBE. Les expositions répétées n'ont pas induit de stress oxydant alors qu'un remodelage de l'épithélium a été mis en place, similaire à celui observé 24h post exposition aiguë.

Ce travail de thèse a permis d'améliorer les connaissances sur les effets toxiques de la fraction particulaire des fumigènes dont les effets ont été très peu étudiés. L'ensemble de ces résultats a mis en évidence la nécessité de poursuivre les recherches sur la toxicité des particules de fumigènes afin d'améliorer la réglementation et de permettre d'établir des limites d'expositions notamment dans le cadre professionnel militaire. Enfin, l'approche scientifique développée ici pourrait être utilisée pour étudier la toxicité de particules suite à l'exposition à d'autres activités pyrotechniques.

Enfin, suite à ces résultats, il serait intéressant d'approfondir l'étude des mécanismes du stress oxydant induit par une exposition aiguë aux RSS, en mesurant les dommages oxydatifs aux différents constituants cellulaires et en particulier l'oxydation des acides nucléiques qui pourrait expliquer des effets génotoxiques relevés dans la littérature et dont le lien avec le stress oxydant généré par les particules colorées n'a encore jamais été réalisé. De plus, au vu des altérations morphologiques observées sur le modèle NHBE, une étude plus complète sur l'altération possible de la fonction mucociliaire serait intéressante à mener, en évaluant par exemple la densité des cils, leur longueur, la fréquence du battement ciliaire ou encore en réalisant des immunomarquages de marqueurs des cellules ciliées. Cette étude de la fonction mucociliaire serait également intéressante à réaliser après exposition aux particules HC-OS pour lesquelles le modèle NHBE s'est révélé plus résistant que le modèle SAEC après exposition aiguë, probablement grâce à un effet protecteur, au moins à court terme, de la fonction mucociliaire. Une étude des interactions entre les particules, de compositions différentes, et les composants du mucus permettrait également de mieux comprendre les différences de réponses observées entre les deux types de particules.

De même, une cinétique d'effets au cours du temps permettrait de mieux comprendre l'évolution de la fonction mucociliaire ainsi que le rôle du stress oxydant dans le remodelage de l'épithélium observé après les expositions répétées aux particules RSS.

Références bibliographiques

- Abbas, I., Badran, G., Verdin, A., Ledoux, F., Roumie, M., Lo Guidice, J.-M., Courcot, D., & Garçon, G. (2019). In vitro evaluation of organic extractable matter from ambient PM_{2.5} using human bronchial epithelial BEAS-2B cells : Cytotoxicity, oxidative stress, pro-inflammatory response, genotoxicity, and cell cycle deregulation. *Environmental Research*, 171, 510–522. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.01.052>
- Abbas, I., Verdin, A., Escande, F., Saint-Georges, F., Cazier, F., Mulliez, P., Courcot, D., Shirali, P., Gosset, P., & Garçon, G. (2016). In vitro short-term exposure to air pollution PM_{2.5-0.3} induced cell cycle alterations and genetic instability in a human lung cell coculture model. *Environmental Research*, 147, 146–158. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2016.01.041>
- Abdel-Shafy, H. I., & Mansour, M. S. M. (2016). A review on polycyclic aromatic hydrocarbons : Source, environmental impact, effect on human health and remediation. *Egyptian Journal of Petroleum*, 25(1), 107–123. <https://doi.org/10.1016/j.ejpe.2015.03.011>
- Aghapour, M., Raee, P., Moghaddam, S. J., Hiemstra, P. S., & Heijink, I. H. (2018). Airway Epithelial Barrier Dysfunction in Chronic Obstructive Pulmonary Disease : Role of Cigarette Smoke Exposure. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 58(2), 157–169. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2017-0200TR>
- Agrawal, A., Upadhyay, V. K., & Sachdeva, K. (2011). Study of aerosol behavior on the basis of morphological characteristics during festival events in India. *Atmospheric Environment*, 45(21), 3640–3644. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2011.04.006>
- Aguilera, R., Corringham, T., Gershunov, A., & Benmarhnia, T. (2021). Wildfire smoke impacts respiratory health more than fine particles from other sources : Observational evidence from Southern California. *Nature Communications*, 12(1), 1493. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21708-0>
- AIRPARIF. (2021). *La réglementation en France*. <https://www.airparif.asso.fr/la-reglementation-en-france>
- Alahmad, B., Al-Hemoud, A., Kang, C.-M., Almarri, F., Kommula, V., Wolfson, J. M., Bernstein, A. S., Garshick, E., Schwartz, J., & Koutrakis, P. (2021). A two-year assessment of particulate air pollution and sources in Kuwait. *Environmental Pollution*, 282, 117016. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117016>
- Alves, C. A., Vicente, A., Monteiro, C., Gonçalves, C., Evtyugina, M., & Pio, C. (2011). Emission of trace gases and organic components in smoke particles from a wildfire in a mixed-evergreen forest in Portugal. *Science of The Total Environment*, 409(8), 1466–1475. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.12.025>
- Amatngalim, G. D., van Wijck, Y., de Mooij-Eijk, Y., Verhoosel, R. M., Harder, J., Lekkerkerker, A. N., Janssen, R. A. J., & Hiemstra, P. S. (2015). Basal Cells Contribute to Innate Immunity of the Airway Epithelium through Production of the Antimicrobial Protein RNase 7. *The Journal of Immunology*, 194(7), 3340–3350. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1402169>
- An, J., Liu, H., Wang, X., Talifu, D., Abulizi, A., Maihemuti, M., Li, K., Bai, H., Luo, P., & Xie, X. (2022). Oxidative potential of size-segregated particulate matter in the dust-storm impacted Hotan, northwest China. *Atmospheric Environment*, 280, 119142. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2022.119142>
- André, V., Billet, S., Pottier, D., Le Goff, J., Pottier, I., Garçon, G., Shirali, P., & Sichel, F. (2010). Mutagenicity and genotoxicity of PM_{2.5} issued from an urbano-industrialized area of Dunkerque (France). *Journal of Applied Toxicology*, n/a-n/a. <https://doi.org/10.1002/jat.1572>
- ANSES. (2017). *Les normes de qualité de l'air ambiant* [Rapport d'expertise]. <https://www.anses.fr/en/system/files/AIR2016SA0092Ra.pdf>
- ANSES. (2020). *Valeurs limites d'exposition en milieu professionnel. Poussières dites sans effet spécifique Évaluation des méthodes de mesure* (Rapport d'expertise collective N° 2017-SA-0148-VLEP PSES; p. 216). <https://www.anses.fr/fr/system/files/VSR2017SA0148Ra.pdf>
- Araujo, J. A., & Nel, A. E. (2009). Particulate matter and atherosclerosis : Role of particle size, composition and oxidative stress. *Particle and Fibre Toxicology*, 6(1), 24. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-6-24>
- Atkinson, R. W., Samoli, E., Analitis, A., Fuller, G. W., Green, D. C., Anderson, H. R., Purdie, E., Dunster, C., Aitlhadj, L., Kelly, F. J., & Mudway, I. S. (2016). Short-term associations between particle oxidative potential and daily mortality and hospital admissions in London. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 219(6), 566–572. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2016.06.004>
- Aufderheide, M., Scheffler, S., Ito, S., Ishikawa, S., & Emura, M. (2015). Ciliotoxicity in human primary bronchiolar epithelial cells after repeated exposure at the air-liquid interface with native mainstream smoke of K3R4F cigarettes with and without charcoal filter. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 67(7–8), 407–411. <https://doi.org/10.1016/j.etp.2015.04.006>
- Aurell, J., Holder, A. L., Gullett, B. K., McNesby, K., & Weinstein, J. P. (2019). Characterization of M4 carbine rifle emissions with three ammunition types. *Environmental Pollution*, 254, 112982.

- <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.112982>
- Ayres, J. G., Borm, P., Cassee, F. R., Castranova, V., Donaldson, K., Ghio, A., Harrison, R. M., Hider, R., Kelly, F., Kooter, I. M., Marano, F., Maynard, R. L., Mudway, I., Nel, A., Sioutas, C., Smith, S., Baeza-Squiban, A., Cho, A., Duggan, S., & Froines, J. (2008). Evaluating the Toxicity of Airborne Particulate Matter and Nanoparticles by Measuring Oxidative Stress Potential—A Workshop Report and Consensus Statement. *Inhalation Toxicology*, 20(1), 75–99. <https://doi.org/10.1080/08958370701665517>
- Baber, O., Jang, M., Barber, D., & Powers, K. (2011). Amorphous silica coatings on magnetic nanoparticles enhance stability and reduce toxicity to *in vitro* BEAS-2B cells. *Inhalation Toxicology*, 23(9), 532–543. <https://doi.org/10.3109/08958378.2011.592869>
- 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>
- Barman, S. C., Singh, R., Negi, M. P. S., & Bhargava, S. K. (2008). Ambient air quality of Lucknow City (India) during use of fireworks on Diwali Festival. *Environmental Monitoring and Assessment*, 137(1–3), 495–504. <https://doi.org/10.1007/s10661-007-9784-1>
- 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. *Environmental Science & Technology*, 53(8), 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. *Environmental Science & Technology*, 49(22), 13605–13612. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b02967>
- Baulig, A., Singh, S., Marchand, A., Schins, R., Barouki, R., Garlatti, M., Marano, F., & Baeza-Squiban, A. (2009). Role of Paris PM_{2.5} components in the pro-inflammatory response induced in airway epithelial cells. *Toxicology*, 261(3), 126–135. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2009.05.007>
- Beig, G., Chate, D. M., Ghude, S. D., Ali, K., Satpute, T., Sahu, S. K., Parkhi, N., & Trimbake, H. K. (2013). Evaluating population exposure to environmental pollutants during Deepavali fireworks displays using air quality measurements of the SAFAR network. *Chemosphere*, 92(1), 116–124. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.02.043>
- Bellinger, D. C., Burger, J., Cade, T. J., Cory-Slechta, D. A., Finkelstein, M., Hu, H., Kosnett, M., Landrigan, P. J., Lanphear, B., Pokras, M. A., Redig, P. T., Rideout, B. A., Silbergeld, E., Wright, R., & Smith, D. R. (2013). Health Risks from Lead-Based Ammunition in the Environment. *Environmental Health Perspectives*, 121(6). <https://doi.org/10.1289/ehp.1306945>
- 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. *Toxicology Letters*, 306, 13–24. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2019.01.017>
- Bergström, U., Ekstrand-Hammarström, B., Hägglund, L., & Wingfors, H. (2015). Comparing Acute Toxicity of Gunshot Particles, from Firing Conventional and Lead-Free Ammunition, in Pulmonary Epithelial Cell Cultures. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 78(10), 645–661. <https://doi.org/10.1080/15287394.2015.1017682>
- Bérubé, K., Prytherch, Z., Job, C., & Hughes, T. (2010). Human primary bronchial lung cell constructs : The new respiratory models. *Toxicology*, 278(3), 311–318. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2010.04.004>
- Bhowmick, R., & Gappa-Fahlenkamp, H. (2016). Cells and Culture Systems Used to Model the Small Airway Epithelium. *Lung*, 194(3), 419–428. <https://doi.org/10.1007/s00408-016-9875-2>
- Birmili, W., Allen, A. G., Bary, F., & Harrison, R. M. (2006). Trace Metal Concentrations and Water Solubility in Size-Fractionated Atmospheric Particles and Influence of Road Traffic. *Environmental Science & Technology*, 40(4), 1144–1153. <https://doi.org/10.1021/es0486925>
- Blank, F., Rothen-Rutishauser, B. M., Schurch, S., & Gehr, P. (2006). An Optimized *In Vitro* Model of the Respiratory Tract Wall to Study Particle Cell Interactions. *Journal of Aerosol Medicine*, 19(3), 392–405. <https://doi.org/10.1089/jam.2006.19.392>
- Boei, J. J. W. A., Vermeulen, S., Klein, B., Hiemstra, P. S., Verhoosel, R. M., Jennen, D. G. J., Lahoz, A., Gmuender, H., & Vrieling, H. (2017). Xenobiotic metabolism in differentiated human bronchial epithelial cells. *Archives of Toxicology*, 91(5), 2093–2105. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1868-7>
- Bondy, G. S., Armstrong, C. L., Dawson, B. A., Héroux-Metcalf, C., Neville, G. A., & Rogers, C. G. (1994).

- Toxicity of structurally related anthraquinones and anthrones to mammalian cells in vitro. *Toxicology in Vitro*, 8(3), 329–335. [https://doi.org/10.1016/0887-2333\(94\)90153-8](https://doi.org/10.1016/0887-2333(94)90153-8)
- 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. *Toxicology in Vitro*, 27(2), 533–542. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2012.11.008>
- Brauer, M., Avila-Casado, C., Fortoul, T. I., Vedal, S., Stevens, B., & Churg, A. (2001). Air pollution and retained particles in the lung. *Environmental Health Perspectives*, 109(10), 1039–1043. <https://doi.org/10.1289/ehp.011091039>
- Bräuner, E. V., Forchhammer, L., Møller, P., Simonsen, J., Glasius, M., Wählin, P., Raaschou-Nielsen, O., & Loft, S. (2007). Exposure to Ultrafine Particles from Ambient Air and Oxidative Stress-Induced DNA Damage. *Environmental Health Perspectives*, 115(8), 1177–1182. <https://doi.org/10.1289/ehp.9984>
- Breeze, R. G., & Wheeldon, E. B. (1977). The Cells of the Pulmonary Airways ^{1, 2}. *American Review of Respiratory Disease*, 116(4), 705–777. <https://doi.org/10.1164/arrd.1977.116.4.705>
- Brekman, A., Walters, M. S., Tilley, A. E., & Crystal, R. G. (2014). FOXJ1 Prevents Cilia Growth Inhibition by Cigarette Smoke in Human Airway Epithelium *In Vitro*. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 51(5), 688–700. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2013-0363OC>
- Bressi, M., Sciare, J., Gherzi, V., Bonnaire, N., Nicolas, J. B., Petit, J.-E., Moukhtar, S., Rosso, A., Mihalopoulos, N., & Féron, A. (2013). A one-year comprehensive chemical characterisation of fine aerosol (PM_{2.5}) at urban, suburban and rural background sites in the region of Paris (France). *Atmospheric Chemistry and Physics*, 13(15), 7825–7844. <https://doi.org/10.5194/acp-13-7825-2013>
- Brochu, S., Poulin, I., Faucher, D., Diaz, E., & Walsh, M. R. (2011). Environmental assessment of small arms live firing : Study of gaseous and particulate residues. In *Environmental Chemistry of Explosives and Propellant Compounds in Soils and Marine Systems : Distributed Source Characterization and Remedial Technologies* (Vol. 1069, p. 29–47). American Chemical Society.
- Brookes, P. S., Levonen, A.-L., Shiva, S., Sarti, P., & Darley-Usmar, V. M. (2002). Mitochondria : Regulators of signal transduction by reactive oxygen and nitrogen species ^{1,2} ¹Guest Editor: Harry Ischiropoulos ²This article is part of a series of reviews on “Reactive Nitrogen Species, Tyrosine Nitration and Cell Signaling.” The full list of papers may be found on the homepage of the journal. *Free Radical Biology and Medicine*, 33(6), 755–764. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(02\)00901-2](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(02)00901-2)
- Burchiel, S. W., Thompson, T. A., Lauer, F. T., & Oprea, T. I. (2007). Activation of dioxin response element (DRE)-associated genes by benzo(a)pyrene 3,6-quinone and benzo(a)pyrene 1,6-quinone in MCF-10A human mammary epithelial cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 221(2), 203–214. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2007.02.020>
- Bustamante-Marin, X. M., & Ostrowski, L. E. (2017). Cilia and Mucociliary Clearance. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 9(4), a028241. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028241>
- Calas, A., Uzu, G., Kelly, F. J., Houdier, S., Martins, J. M. F., Thomas, F., Molton, F., Charron, A., Dunster, C., Oliete, A., Jacob, V., Besombes, J.-L., Chevrier, F., & Jaffrezo, J.-L. (2018). Comparison between five acellular oxidative potential measurement assays performed with detailed chemistry on PM₁₀ samples from the city of Chamonix (France). *Atmospheric Chemistry and Physics*, 18(11), 7863–7875. <https://doi.org/10.5194/acp-18-7863-2018>
- Canner, J. K., Haider, A. H., Selvarajah, S., Hui, X., Wang, H., Efron, D. T., Haut, E. R., Velopulos, C. G., Schwartz, D. A., Chi, A., & Schneider, E. B. (2014). US emergency department visits for fireworks injuries, 2006–2010. *Journal of Surgical Research*, 190(1), 305–311. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2014.03.066>
- Canova, C., Minelli, C., Dunster, C., Kelly, F., Shah, P. L., Caneja, C., Tumilty, M. K., & Burney, P. (2014). PM₁₀ Oxidative Properties and Asthma and COPD: *Epidemiology*, 25(3), 467–468. <https://doi.org/10.1097/EDE.0000000000000084>
- Cao, C., Jiang, W., Wang, B., Fang, J., Lang, J., Tian, G., Jiang, J., & Zhu, T. F. (2014). Inhalable Microorganisms in Beijing's PM_{2.5} and PM₁₀ Pollutants during a Severe Smog Event. *Environmental Science & Technology*, 48(3), 1499–1507. <https://doi.org/10.1021/es4048472>
- Caraballo, J. C., Yshii, C., Westphal, W., Moninger, T., & Comellas, A. P. (2011). Ambient particulate matter affects occludin distribution and increases alveolar transepithelial electrical conductance : Particulate matter affects alveolar barrier. *Respirology*, 16(2), 340–349. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1843.2010.01910.x>

- Caumo, S., Traub, A., Evans, G., & de Castro Vasconcellos, P. (2022). Health risk assessment in atmosphere near a petrochemical industrial complex : Measuring oxidative potential and oxidative burden. *Atmospheric Pollution Research*, 13(7), 101457. <https://doi.org/10.1016/j.apr.2022.101457>
- Charrier, J. G., & Anastasio, C. (2012). On dithiothreitol (DTT) as a measure of oxidative potential for ambient particles : Evidence for the importance of soluble transition metals. *Atmospheric Chemistry and Physics Discussions*, 12(5), 11317–11350. <https://doi.org/10.5194/acpd-12-11317-2012>
- Chatterjee, A., Sarkar, C., Adak, A., Mukherjee, U., Ghosh, S. K., & Raha, S. (2013). Ambient Air Quality during Diwali Festival over Kolkata – A Mega-City in India. *Aerosol and Air Quality Research*, 13(3), 1133–1144. <https://doi.org/10.4209/aaqr.2012.03.0062>
- Chau, T.-T., Chen, W.-Y., Hsiao, T.-M., & Liu, H.-W. (1995). Chronic Lead Intoxication at an Indoor Firing Range in Taiwan. *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology*, 33(4), 371–372. <https://doi.org/10.3109/15563659509028926>
- Chen, H., Oliver, B. G., Pant, A., Olivera, A., Poronnik, P., Pollock, C. A., & Saad, S. (2022). Effects of air pollution on human health – Mechanistic evidence suggested by in vitro and in vivo modelling. *Environmental Research*, 212, 113378. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.113378>
- Chen, H., Samet, J. M., Bromberg, P. A., & Tong, H. (2021). Cardiovascular health impacts of wildfire smoke exposure. *Particle and Fibre Toxicology*, 18(1), 2. <https://doi.org/10.1186/s12989-020-00394-8>
- Chen, S., Theodorou, I. G., Goode, A. E., Gow, A., Schwander, S., Zhang, J. (Jim), Chung, K. F., Tetley, T. D., Shaffer, M. S., Ryan, M. P., & Porter, A. E. (2013). High-Resolution Analytical Electron Microscopy Reveals Cell Culture Media-Induced Changes to the Chemistry of Silver Nanowires. *Environmental Science & Technology*, 47(23), 13813–13821. <https://doi.org/10.1021/es403264d>
- Cheng, Y., Engling, G., He, K., Duan, F., Du, Z., Ma, Y., Liang, L., Lu, Z., Liu, J., Zheng, M., & Weber, R. J. (2014). The characteristics of Beijing aerosol during two distinct episodes : Impacts of biomass burning and fireworks. *Environmental Pollution*, 185, 149–157. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.10.037>
- Chevalier, L., Selim, J., Castro, C., Cuvilly, F., Baste, J.-M., Richard, V., Pareige, P., & Bellien, J. (2022). Combined Electron Microscopy Approaches for Arterial Glycocalyx Visualization. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 9, 840689. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2022.840689>
- Chirino, Y. I., Sánchez-Pérez, Y., Osornio-Vargas, Á. R., Morales-Bárcenas, R., Gutiérrez-Ruiz, M. C., Segura-García, Y., Rosas, I., Pedraza-Chaverri, J., & García-Cuellar, C. M. (2010). PM10 impairs the antioxidant defense system and exacerbates oxidative stress driven cell death. *Toxicology Letters*, 193(3), 209–216. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2010.01.009>
- Cho, A. K., Sioutas, C., Miguel, A. H., Kumagai, Y., Schmitz, D. A., Singh, M., Eiguren-Fernandez, A., & Froines, J. R. (2005). Redox activity of airborne particulate matter at different sites in the Los Angeles Basin. *Environmental Research*, 99(1), 40–47. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2005.01.003>
- Cho, C.-C., Hsieh, W.-Y., Tsai, C.-H., Chen, C.-Y., Chang, H.-F., & Lin, C.-S. (2018). In Vitro and In Vivo Experimental Studies of PM2.5 on Disease Progression. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 15(7), 1380. <https://doi.org/10.3390/ijerph15071380>
- Chortarea, S., Clift, M. J. D., Vanhecke, D., Endes, C., Wick, P., Petri-Fink, A., & Rothen-Rutishauser, B. (2015). Repeated exposure to carbon nanotube-based aerosols does not affect the functional properties of a 3D human epithelial airway model. *Nanotoxicology*, 9(8), 983–993. <https://doi.org/10.3109/17435390.2014.993344>
- Chu, K. K., Unglert, C., Ford, T. N., Cui, D., Carruth, R. W., Singh, K., Liu, L., Birket, S. E., Solomon, G. M., Rowe, S. M., & Tearney, G. J. (2016). In vivo imaging of airway cilia and mucus clearance with micro-optical coherence tomography. *Biomedical Optics Express*, 7(7), 2494. <https://doi.org/10.1364/BOE.7.002494>
- 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. *Environmental Health Perspectives*, 111(5), 714–718. <https://doi.org/10.1289/ehp.6042>
- CITEPA. (2021). *Inventaire des émissions de polluants atmosphériques et de gaz à effet de serre en France – Format Secten*. (Rapport national d’inventaire format secten 1789sec / 2021; p. 496). Centre Interprofessionnel Technique d’Études de la Pollution Atmosphérique.
- CITEPA. (2022). *Inventaire des émissions de polluants atmosphériques et de gaz à effet de serre en France – Format Secten*. (Rapport national d’inventaire format secten 2071sec / 2022; p. 512). Centre Interprofessionnel Technique d’Études de la Pollution Atmosphérique.
- Cohen, J., DeLoid, G., Pyrgiotakis, G., & Demokritou, P. (2013). Interactions of engineered nanomaterials in physiological media and implications for *in vitro* dosimetry. *Nanotoxicology*, 7(4), 417–431. <https://doi.org/10.3109/17435390.2012.666576>

- Comet, M., Schnell, F., Pichot, V., Siegert, B., & Spitzer, D. (2013). *Maîtrise du risque chimique. La sécurité pyrotechnique : Fait scientifique ou réglementaire ?* ('actualité chimique N° 373).
- Conkling, J. A., & Morcella, C. (2018). *Chemistry of Pyrotechnics Basic Principles and Theory, Third Edition*.
- Conte, E., Canepari, S., Frasca, D., & Simonetti, G. (2017). Oxidative Potential of Selected PM Components. *Proceedings*, 1(5), 108. <https://doi.org/10.3390/ecas2017-04131>
- Cooney, D. J., & Hickey, A. J. (2011). Cellular response to the deposition of diesel exhaust particle aerosols onto human lung cells grown at the air-liquid interface by inertial impaction. *Toxicology in Vitro*, 25(8), 1953–1965. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2011.06.019>
- Copat, C., Cristaldi, A., Fiore, M., Grasso, A., Zuccarello, P., Signorelli, S. S., Conti, G. O., & Ferrante, M. (2020). The role of air pollution (PM and NO₂) in COVID-19 spread and lethality : A systematic review. *Environmental Research*, 191, 110129. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.110129>
- Coumoul, X. (2017). *Toxicologie*. Dunod.
- Coyne, C. B., Vanhook, M. K., Gambling, T. M., Carson, J. L., Boucher, R. C., & Johnson, L. G. (2002). Regulation of Airway Tight Junctions by Proinflammatory Cytokines. *Molecular Biology of the Cell*, 13(9), 3218–3234. <https://doi.org/10.1091/mbc.e02-03-0134>
- Cozens, A. L., Yezzi, M. J., Kunzelmann, K., Ohnui, T., Chin, L., Eng, K., Finkbeiner, W. E., Widdicombe, J. H., & Gruenert, D. C. (1994). CFTR expression and chloride secretion in polarized immortal human bronchial epithelial cells. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 10(1), 38–47. <https://doi.org/10.1165/ajrcmb.10.1.7507342>
- Crespo, J., Yubero, E., Nicolás, J. F., Lucarelli, F., Nava, S., Chiari, M., & Calzolari, G. (2012). High-time resolution and size-segregated elemental composition in high-intensity pyrotechnic exposures. *Journal of Hazardous Materials*, 241–242, 82–91. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.09.017>
- 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. *Environmental Pollution*, 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. *Environmental Science & Technology*, 54(4), 2360–2369. <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b05990>
- Crouse, L. C. B., Bazar, M. A., Crouse, C. L., & Januskiewicz, A. J. (2017). *Acute and Subacute Inhalation Toxicity Study in Rats Exposed to Pyrotechnically-Disseminated M18 Red Smoke* (Toxicology study S.0036333-15; p. 403). US Army Research Development and Engineering Command Environmental Acquisition and Logistics Sustainment Program.
- Cui, Y., Chen, G., & Yang, Z. (2020). Mitochondrial superoxide mediates PM_{2.5}-induced cytotoxicity in human pulmonary lymphatic endothelial cells. *Environmental Pollution*, 263, 114423. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114423>
- Cutz, E., Yeger, H., & Pan, J. (2007). Pulmonary Neuroendocrine Cell System in Pediatric Lung Disease—Recent Advances. *Pediatric and Developmental Pathology*, 10(6), 419–435. <https://doi.org/10.2350/07-04-0267.1>
- Daellenbach, K. R., Uzu, G., Jiang, J., Cassagnes, L.-E., Leni, Z., Vlachou, A., Stefenelli, G., Canonaco, F., Weber, S., Segers, A., Kuenen, J. J. P., Schaap, M., Favez, O., Albinet, A., Aksoyoglu, S., Dommen, J., Baltensperger, U., Geiser, M., El Haddad, I., ... Prévôt, A. S. H. (2020). Sources of particulate-matter air pollution and its oxidative potential in Europe. *Nature*, 587(7834), 414–419. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2902-8>
- Dalby, O., Butler, D., & Birkett, J. W. (2010). Analysis of Gunshot Residue and Associated Materials-A Review : ANALYSIS OF GUNSHOT RESIDUE AND ASSOCIATED MATERIALS. *Journal of Forensic Sciences*, 55(4), 924–943. <https://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2010.01370.x>
- Danesh Yazdi, M., Wang, Y., Di, Q., Wei, Y., Requia, W. J., Shi, L., Sabath, M. B., Dominici, F., Coull, B. A., Evans, J. S., Koutrakis, P., & Schwartz, J. D. (2021). Long-Term Association of Air Pollution and Hospital Admissions Among Medicare Participants Using a Doubly Robust Additive Model. *Circulation*, 143(16), 1584–1596. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.120.050252>
- Danielsen, P. H., Møller, P., Jensen, K. A., Sharma, A. K., Wallin, H., Bossi, R., Autrup, H., Mølhave, L., Ravanat, J.-L., Briedé, J. J., de Kok, T. M., & Loft, S. (2011). Oxidative Stress, DNA Damage, and Inflammation Induced by Ambient Air and Wood Smoke Particulate Matter in Human A549 and THP-1 Cell Lines. *Chemical Research in Toxicology*, 24(2), 168–184. <https://doi.org/10.1021/tx100407m>
- Darquenne, C. (2006). PARTICLE DEPOSITION IN THE LUNG. In *Encyclopedia of Respiratory Medicine* (p. 300–304). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B0-12-370879-6/00289-1>
- Davis, A. S., Chertow, D. S., Moyer, J. E., Suzich, J., Sandouk, A., Dorward, D. W., Logun, C., Shelhamer, J. H., &

- Taubenberger, J. K. (2015). Validation of Normal Human Bronchial Epithelial Cells as a Model for Influenza A Infections in Human Distal Trachea. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 63(5), 312–328. <https://doi.org/10.1369/0022155415570968>
- Deering-Rice, C. E., Memon, T., Lu, Z., Romero, E. G., Cox, J., Taylor-Clark, T., Veranth, J. M., & Reilly, C. A. (2019). Differential Activation of TRPA1 by Diesel Exhaust Particles : Relationships between Chemical Composition, Potency, and Lung Toxicity. *Chemical Research in Toxicology*, 32(6), 1040–1050. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.8b00375>
- Deka, P., & Hoque, R. R. (2014). Diwali Fireworks : Early Signs of Impact on PM10 Properties of Rural Brahmaputra Valley. *Aerosol and Air Quality Research*, 14(6), 1752–1762. <https://doi.org/10.4209/aaqr.2013.09.0287>
- Dekali, S., Gamez, C., Kortulewski, T., Blazy, K., Rat, P., & Lacroix, G. (2014). Assessment of an in vitro model of pulmonary barrier to study the translocation of nanoparticles. *Toxicology Reports*, 1, 157–171. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2014.03.003>
- Delfino, R. J., Staimer, N., Tjoa, T., Gillen, D. L., Schauer, J. J., & Shafer, M. M. (2013). Airway inflammation and oxidative potential of air pollutant particles in a pediatric asthma panel. *Journal of Exposure Science & Environmental Epidemiology*, 23(5), 466–473. <https://doi.org/10.1038/jes.2013.25>
- Deng, X., Rui, W., Zhang, F., & Ding, W. (2013). PM2.5 induces Nrf2-mediated defense mechanisms against oxidative stress by activating PIK3/AKT signaling pathway in human lung alveolar epithelial A549 cells. *Cell Biology and Toxicology*, 29(3), 143–157. <https://doi.org/10.1007/s10565-013-9242-5>
- Deng, X., Zhang, F., Rui, W., Long, F., Wang, L., Feng, Z., Chen, D., & Ding, W. (2013). PM2.5-induced oxidative stress triggers autophagy in human lung epithelial A549 cells. *Toxicology in Vitro*, 27(6), 1762–1770. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2013.05.004>
- Dergham, M., Lepers, C., Verdin, A., Cazier, F., Billet, S., Courcot, D., Shirali, P., & Garçon, G. (2015). Temporal–spatial variations of the physicochemical characteristics of air pollution Particulate Matter (PM2.5–0.3) and toxicological effects in human bronchial epithelial cells (BEAS-2B). *Environmental Research*, 137, 256–267. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2014.12.015>
- Dieme, D., Cabral-Ndior, M., Garçon, G., Verdin, A., Billet, S., Cazier, F., Courcot, D., Diouf, A., & Shirali, P. (2012). Relationship between physicochemical characterization and toxicity of fine particulate matter (PM2.5) collected in Dakar city (Senegal). *Environmental Research*, 113, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2011.11.009>
- Dilger, J. M., Martin, T. M., Wilkins, B. P., Bohrer, B. C., Thoreson, K. M., & Fedick, P. W. (2022). Detection and toxicity modeling of anthraquinone dyes and chlorinated side products from a colored smoke pyrotechnic reaction. *Chemosphere*, 287, 131845. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131845>
- Ding, J., Guo, J., Wang, L., Chen, Y., Hu, B., Li, Y., Huang, R., Cao, J., Zhao, Y., Geiser, M., Miao, Q., Liu, Y., & Chen, C. (2019). Cellular Responses to Exposure to Outdoor Air from the Chinese Spring Festival at the Air–Liquid Interface. *Environmental Science & Technology*, 53(15), 9128–9138. <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b00399>
- Dinkova-Kostova, A. T., & Talalay, P. (2010). NAD(P)H:quinone acceptor oxidoreductase 1 (NQO1), a multifunctional antioxidant enzyme and exceptionally versatile cytoprotector. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 501(1), 116–123. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2010.03.019>
- Do, T.-M., Wang, C.-F., Hsieh, Y.-K., & Hsieh, H.-F. (2012). Metals Present in Ambient Air before and after a Firework Festival in Yanshui, Tainan, Taiwan. *Aerosol and Air Quality Research*, 12(5), 981–993. <https://doi.org/10.4209/aaqr.2012.03.0069>
- Dong, C.-D., Chen, C.-W., Chen, Y.-C., Chen, H.-H., Lee, J.-S., & Lin, C.-H. (2020). Polystyrene microplastic particles : In vitro pulmonary toxicity assessment. *Journal of Hazardous Materials*, 385, 121575. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.121575>
- Dornhof, R., Maschowski, C., Osipova, A., Gieré, R., Seidl, M., Merfort, I., & Humar, M. (2017). Stress fibers, autophagy and necrosis by persistent exposure to PM2.5 from biomass combustion. *PLOS ONE*, 12(7), e0180291. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180291>
- Durga, M., Nathiya, S., Rajasekar, A., & Devasena, T. (2014). Effects of ultrafine petrol exhaust particles on cytotoxicity, oxidative stress generation, DNA damage and inflammation in human A549 lung cells and murine RAW 264.7 macrophages. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 38(2), 518–530. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2014.08.003>
- Dye, B. R., Hill, D. R., Ferguson, M. A., Tsai, Y.-H., Nagy, M. S., Dyal, R., Wells, J. M., Mayhew, C. N., Nattiv, R., Klein, O. D., White, E. S., Deutsch, G. H., & Spence, J. R. (2015). In vitro generation of human pluripotent stem cell derived lung organoids. *ELife*, 4, e05098.

- <https://doi.org/10.7554/eLife.05098>
- EEA. (2020). *Air quality in Europe—2020 report* (EEA Report N° 1977□8449; p. 164). Agence Européenne pour l'Environnement.
- Ekstrand-Hammarström, B., Magnusson, R., Österlund, C., Andersson, B. M., Bucht, A., & Wingfors, H. (2013). Oxidative stress and cytokine expression in respiratory epithelial cells exposed to well-characterized aerosols from Kabul, Afghanistan. *Toxicology in Vitro*, 27(2), 825□833. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2012.12.022>
- El Idrissi, A., van Berkel, L., Bonekamp, N. E., Dalemans, D. J. Z., & van der Heyden, M. A. G. (2017). The toxicology of zinc chloride smoke producing bombs and screens. *Clinical Toxicology*, 55(3), 167□174. <https://doi.org/10.1080/15563650.2016.1271125>
- EPA. (2022). *United States Environmental Protection Agency—NAQQS Table*. <https://www.epa.gov/criteria-air-pollutants/naaqs-table>
- Evans, Ernest H. (1945). CASUALTIES FOLLOWING EXPOSURE TO ZINC CHLORIDE SMOKE. *The Lancet*, 246(6369), 368□370. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(45\)91239-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(45)91239-6)
- Falcon-Rodriguez, C. I., Osornio-Vargas, A. R., Sada-Ovalle, I., & Segura-Medina, P. (2016). Aeroparticles, Composition, and Lung Diseases. *Frontiers in Immunology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00003>
- Fang, T., Verma, V., Bates, J. T., Abrams, J., Klein, M., Strickland, M. J., Sarnat, S. E., Chang, H. H., Mulholland, J. A., Tolbert, P. E., Russell, A. G., & Weber, R. J. (2015). *Oxidative potential of ambient water-soluble PM_{2.5} in the southeastern United States : Contrasts in sources and health associations between ascorbic acid (AA) and dithiothreitol (DTT) assays* [Preprint]. Aerosols/Field Measurements/Troposphere/Chemistry (chemical composition and reactions). <https://doi.org/10.5194/acpd-15-30609-2015>
- Fang, T., Verma, V., Bates, J. T., Abrams, J., Klein, M., Strickland, M. J., Sarnat, S. E., Chang, H. H., Mulholland, J. A., Tolbert, P. E., Russell, A. G., & Weber, R. J. (2016). Oxidative potential of ambient water-soluble PM_{2.5} in the southeastern United States : Contrasts in sources and health associations between ascorbic acid (AA) and dithiothreitol (DTT) assays. *Atmospheric Chemistry and Physics*, 16(6), 3865□3879. <https://doi.org/10.5194/acp-16-3865-2016>
- Feng, J., Zhong, M., Xu, B., Du, Y., Wu, M., Wang, H., & Chen, C. (2014). Concentrations, seasonal and diurnal variations of black carbon in PM_{2.5} in Shanghai, China. *Atmospheric Research*, 147□148, 1□9. <https://doi.org/10.1016/j.atmosres.2014.04.018>
- Feng, S., Duan, E., Shi, X., Zhang, H., Li, H., Zhao, Y., Chao, L., Zhong, X., Zhang, W., Li, R., & Yan, X. (2019). Hydrogen ameliorates lung injury in a rat model of subacute exposure to concentrated ambient PM_{2.5} via Aryl hydrocarbon receptor. *International Immunopharmacology*, 77, 105939. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2019.105939>
- Fernando, I. P. S., Jayawardena, T. U., Kim, H.-S., Lee, W. W., Vaas, A. P. J. P., De Silva, H. I. C., Abayaweera, G. S., Nanayakkara, C. M., Abeyunga, D. T. U., Lee, D.-S., & Jeon, Y.-J. (2019). Beijing urban particulate matter-induced injury and inflammation in human lung epithelial cells and the protective effects of fucosterol from *Sargassum binderi* (Sonder ex J. Agardh). *Environmental Research*, 172, 150□158. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.02.016>
- 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. *Scientific Reports*, 10(1), 3704. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59930-3>
- Fujino, N., Kubo, H., Ota, C., Suzuki, T., Suzuki, S., Yamada, M., Takahashi, T., He, M., Suzuki, T., Kondo, T., & Yamaya, M. (2012). A Novel Method for Isolating Individual Cellular Components from the Adult Human Distal Lung. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 46(4), 422□430. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2011-01720C>
- Gali, N. K., Jiang, S. Y., Yang, F., Sun, L., & Ning, Z. (2017). Redox characteristics of size-segregated PM from different public transport microenvironments in Hong Kong. *Air Quality, Atmosphere & Health*, 10(7), 833□844. <https://doi.org/10.1007/s11869-017-0473-0>
- Gangwar, R. S., Bevan, G. H., Palanivel, R., Das, L., & Rajagopalan, S. (2020). Oxidative stress pathways of air pollution mediated toxicity : Recent insights. *Redox Biology*, 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 Radical Biology & Medicine*, 151, 7□25. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.04.028>

- García-Díaz, M., Birch, D., Wan, F., & Nielsen, H. M. (2018). The role of mucus as an invisible cloak to transepithelial drug delivery by nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 124, 107–124. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2017.11.002>
- Gasser, M., Wick, P., Clift, M. J., Blank, F., Diener, L., Yan, B., Gehr, P., Krug, H. F., & Rothen-Rutishauser, B. (2012). Pulmonary surfactant coating of multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) influences their oxidative and pro-inflammatory potential in vitro. *Particle and Fibre Toxicology*, 9(1), 17. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-9-17>
- Gautam, S., Yadav, A., Tsai, C.-J., & Kumar, P. (2016). A review on recent progress in observations, sources, classification and regulations of PM_{2.5} in Asian environments. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(21), 21165–21175. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7515-2>
- Geiser, M., & Kreyling, W. G. (2010). Deposition and biokinetics of inhaled nanoparticles. *Particle and Fibre Toxicology*, 7(1), 2. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-7-2>
- Gerovac, B. J., Valencia, M., Baumlin, N., Salathe, M., Conner, G. E., & Fregien, N. L. (2014). Submersion and Hypoxia Inhibit Ciliated Cell Differentiation in a Notch-Dependent Manner. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 51(4), 516–525. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2013-0237OC>
- Ghio, A. J., Dailey, L. A., Soukup, J. M., Stonehuerner, J., Richards, J. H., & Devlin, R. B. (2013). Growth of human bronchial epithelial cells at an air-liquid interface alters the response to particle exposure. *Particle and Fibre Toxicology*, 10(1), 25. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-10-25>
- Gietl, J. K., Lawrence, R., Thorpe, A. J., & Harrison, R. M. (2010). Identification of brake wear particles and derivation of a quantitative tracer for brake dust at a major road. *Atmospheric Environment*, 44(2), 141–146. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2009.10.016>
- Gil, F., Pla, A., Hernández, A. F., Mercado, J. M., & Méndez, F. (2008). A fatal case following exposure to zinc chloride and hexachloroethane from a smoke bomb in a fire simulation at a school. *Clinical Toxicology*, 46(6), 563–565. <https://doi.org/10.1080/15563650701610890>
- Glück, J., Klapötke, T. M., Rusan, M., & Shaw, A. P. (2017). Improved Efficiency by Adding 5-Aminotetrazole to Anthraquinone-Free New Blue and Green Colored Pyrotechnical Smoke Formulations. *Propellants, Explosives, Pyrotechnics*, 42(2), 131–141. <https://doi.org/10.1002/prep.201600136>
- Godri, K. J., Green, D. C., Fuller, G. W., Dall'Osto, M., Beddows, D. C., Kelly, F. J., Harrison, R. M., & Mudway, I. S. (2010). Particulate Oxidative Burden Associated with Firework Activity. *Environmental Science & Technology*, 44(21), 8295–8301. <https://doi.org/10.1021/es1016284>
- Godri, K. J., Harrison, R. M., Evans, T., Baker, T., Dunster, C., Mudway, I. S., & Kelly, F. J. (2011). Increased Oxidative Burden Associated with Traffic Component of Ambient Particulate Matter at Roadside and Urban Background Schools Sites in London. *PLoS ONE*, 6(7), e21961. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021961>
- Gouder, C., & Montefort, S. (2014). Potential impact of fireworks on respiratory health. *Lung India*, 31(4), 375. <https://doi.org/10.4103/0970-2113.142124>
- Grabinski, C. M., Methner, M. M., Jackson, J. M., Moore, A. L., Flory, L. E., Tilly, T., Hussain, S. M., & Ott, D. K. (2017). Characterization of exposure to byproducts from firing lead-free frangible ammunition in an enclosed, ventilated firing range. *Journal of Occupational and Environmental Hygiene*, 14(6), 461–472. <https://doi.org/10.1080/15459624.2017.1296232>
- Grigoratos, T., & Martini, G. (2015). Brake wear particle emissions : A review. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(4), 2491–2504. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3696-8>
- Gulson, B. L., Palmer, J. M., & Bryce, A. (2002). Changes in blood lead of a recreational shooter. *Science of The Total Environment*, 293(1–3), 143–150. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(02\)00003-7](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(02)00003-7)
- Guo, H., Jin, L., & Huang, S. (2020). Effect of PM characterization on PM oxidative potential by acellular assays : A review. *Reviews on Environmental Health*, 35(4), 461–470. <https://doi.org/10.1515/reveh-2020-0003>
- Hagino, H., Oyama, M., & Sasaki, S. (2016). Laboratory testing of airborne brake wear particle emissions using a dynamometer system under urban city driving cycles. *Atmospheric Environment*, 131, 269–278. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2016.02.014>
- Haleng, J., Pincemail, J., Defraigne, J. O., Charlier, C., & Chapelle, J. P. (2007). Le stress oxydant. *Revue médicale de Liège*, 62(10), 628–638.
- Hatem, E., El Banna, N., & Huang, M.-E. (2017). Multifaceted Roles of Glutathione and Glutathione-Based Systems in Carcinogenesis and Anticancer Drug Resistance. *Antioxidants & Redox Signaling*, 27(15), 1217–1234. <https://doi.org/10.1089/ars.2017.7134>
- Hatrup, C. L., & Gendler, S. J. (2008). Structure and Function of the Cell Surface (Tethered) Mucins. *Annual Review of Physiology*, 70(1), 431–457.

- <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.70.113006.100659>
- He, R.-W., Shirmohammadi, F., Gerlofs-Nijland, M. E., Sioutas, C., & Cassee, F. R. (2018). Pro-inflammatory responses to PM_{0.25} from airport and urban traffic emissions. *Science of The Total Environment*, 640–641, 997–1003. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.05.382>
- Heier, L. S., Lien, I. B., Strømseng, A. E., Ljønes, M., Rosseland, B. O., Tollefsen, K.-E., & Salbu, B. (2009). Speciation of lead, copper, zinc and antimony in water draining a shooting range—Time dependant metal accumulation and biomarker responses in brown trout (*Salmo trutta* L.). *Science of The Total Environment*, 407(13), 4047–4055. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2009.03.002>
- Hemmilä, M., Hihkiö, M., Kasanen, J.-P., Turunen, M., Hautamäki, M., Pasanen, A.-L., & Linnainmaa, K. (2007a). In Vivo and In Vitro Evaluation of the Acute Toxicity, the Genotoxicity, and the Irritation Potency of Two Hexachloroethane-based Pyrotechnic Smokes. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 70(14), 1167–1181. <https://doi.org/10.1080/15287390701252691>
- Hemmilä, M., Hihkiö, M., Kasanen, J.-P., Turunen, M., Hautamäki, M., Pasanen, A.-L., & Linnainmaa, K. (2007b). In Vivo and In Vitro Evaluation of the Acute Toxicity, the Genotoxicity, and the Irritation Potency of Two Hexachloroethane-based Pyrotechnic Smokes. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 70(14), 1167–1181. <https://doi.org/10.1080/15287390701252691>
- Hemmilä, M., Hihkiö, M., Kasanen, J.-P., Turunen, M., Järvelä, M., Suhonen, S., Pasanen, A.-L., & Norppa, H. (2010). Cytotoxicity and genotoxicity in vitro and irritation potency in vivo of two red phosphorus-based pyrotechnic smokes. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 701(2), 137–144. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2010.06.007>
- Hemmilä, M., Hihkiö, M., & Linnainmaa, K. (2007). Evaluation of the Acute Toxicity and Genotoxicity of Orange, Red, Violet and Yellow Pyrotechnic Smokes In Vitro. *Propellants, Explosives, Pyrotechnics*, 32(5), 415–422. <https://doi.org/10.1002/prep.200700046>
- Hemmilä, M., Hihkiö, M., Norppa, H., Suhonen, S., & Callaway, J. (2013). *Toxicity assessment of signalling smokes*. 39th International Pyrotechnics Seminar, Valencia.
- Hermanns, M. I., Unger, R. E., Kehe, K., Peters, K., & Kirkpatrick, C. J. (2004). Lung epithelial cell lines in coculture with human pulmonary microvascular endothelial cells : Development of an alveolo-capillary barrier in vitro. *Laboratory Investigation*, 84(6), 736–752. <https://doi.org/10.1038/labinvest.3700081>
- Hickey, C., Gordon, C., Galdanes, K., Blaustein, M., Horton, L., Chillrud, S., Ross, J., Yinon, L., Chen, L. C., & Gordon, T. (2020). Toxicity of particles emitted by fireworks. *Particle and Fibre Toxicology*, 17(1), 28. <https://doi.org/10.1186/s12989-020-00360-4>
- Hiemstra, P. S., Grootaers, G., van der Does, A. M., Krul, C. A. M., & Kooter, I. M. (2018). Human lung epithelial cell cultures for analysis of inhaled toxicants : Lessons learned and future directions. *Toxicology in Vitro*, 47, 137–146. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2017.11.005>
- Hirai, K., Yamazaki, Y., Okada, K., Furuta, S., & Kubo, K. (2000). Acute Eosinophilic Pneumonia Associated with Smoke from Fireworks. *Internal Medicine*, 39(5), 401–403. <https://doi.org/10.2169/internalmedicine.39.401>
- Hleis, D., Fernández-Olmo, I., Ledoux, F., Kfoury, A., Courcot, L., Desmonts, T., & Courcot, D. (2013). Chemical profile identification of fugitive and confined particle emissions from an integrated iron and steelmaking plant. *Journal of Hazardous Materials*, 250–251, 246–255. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.01.080>
- Holder, A. L., Lucas, D., Goth-Goldstein, R., & Koshland, C. P. (2008). Cellular Response to Diesel Exhaust Particles Strongly Depends on the Exposure Method. *Toxicological Sciences*, 103(1), 108–115. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfn014>
- Holmes, P. S. (1999). Pneumomediastinum associated with inhalation of white smoke. *Military Medicine*, 164(10), 751–752.
- Hong, Z., Guo, Z., Zhang, R., Xu, J., Dong, W., Zhuang, G., & Deng, C. (2016). Airborne Fine Particulate Matter Induces Oxidative Stress and Inflammation in Human Nasal Epithelial Cells. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*, 239(2), 117–125. <https://doi.org/10.1620/tjem.239.117>
- Horwell, C. J., Fenoglio, I., Vala Ragnarsdottir, K., Sparks, R. S. J., & Fubini, B. (2003). Surface reactivity of volcanic ash from the eruption of Soufrière Hills volcano, Montserrat, West Indies with implications for health hazards. *Environmental Research*, 93(2), 202–215. [https://doi.org/10.1016/S0013-9351\(03\)00044-6](https://doi.org/10.1016/S0013-9351(03)00044-6)
- Hsu, H.-H., Tzao, C., Chang, W.-C., Wu, C.-P., Tung, H.-J., Chen, C.-Y., & Perng, W.-C. (2005). Zinc Chloride (Smoke Bomb) Inhalation Lung Injury. *Chest*, 127(6), 2064–2071.

- <https://doi.org/10.1378/chest.127.6.2064>
- Huang, K.-L., Chen, C.-W., Chu, S.-J., Perng, W.-C., & Wu, C.-P. (2008). Systemic Inflammation Caused by White Smoke Inhalation in a Combat Exercise. *Chest*, 133(3), 722–728.
<https://doi.org/10.1378/chest.07-2076>
- Huh, D., Matthews, B. D., Mammoto, A., Montoya-Zavala, M., Hsin, H. Y., & Ingber, D. E. (2010). Reconstituting Organ-Level Lung Functions on a Chip. *Science*, 328(5986), 1662–1668.
<https://doi.org/10.1126/science.1188302>
- Hur, J., Rhee, C. K., & Jo, Y. S. (2022). Effects of Antioxidant on Oxidative Stress and Autophagy in Bronchial Epithelial Cells Exposed to Particulate Matter and Cigarette Smoke Extract. *Tuberculosis and Respiratory Diseases*, 85(3), 237–248. <https://doi.org/10.4046/trd.2021.0152>
- IARC. (2015). *Outdoor air pollution—Volume 109—IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans* (IARC monographson N° 978-92-832-0175□5; p. 454). International Agency for Research on Cancer.
- Ighodaro, O. M., & Akinloye, O. A. (2018). First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX) : Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria Journal of Medicine*, 54(4), 287–293.
<https://doi.org/10.1016/j.ajme.2017.09.001>
- INERIS. (2016). *Base de données FICHES TOXICOLOGIQUES - Cuivre et composés—Fiche toxicologique n°294*.
- INRS. (2022). *Prévenir les risques liés aux poussières*.
- Iwasaki, A., Foxman, E. F., & Molony, R. D. (2017). Early local immune defences in the respiratory tract. *Nature Reviews Immunology*, 17(1), 7–20. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.117>
- Janssen, N. A. H., Strak, M., Yang, A., Hellack, B., Kelly, F. J., Kuhlbusch, T. A. J., Harrison, R. M., Brunekreef, B., Cassee, F. R., Steenhof, M., & Hoek, G. (2015). Associations between three specific a-cellular measures of the oxidative potential of particulate matter and markers of acute airway and nasal inflammation in healthy volunteers. *Occupational and Environmental Medicine*, 72(1), 49–56.
<https://doi.org/10.1136/oemed-2014-102303>
- Janssen, N. A. H., Yang, A., Strak, M., Steenhof, M., Hellack, B., Gerlofs-Nijland, M. E., Kuhlbusch, T., Kelly, F., Harrison, R., Brunekreef, B., Hoek, G., & Cassee, F. (2014). Oxidative potential of particulate matter collected at sites with different source characteristics. *Science of The Total Environment*, 472, 572–581. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.11.099>
- Ji, X., Sheng, Y., Guan, Y., Li, Y., Xu, Y., & Tang, L. (2022). Evaluation of Calu-3 cell lines as an *in vitro* model to study the inhalation toxicity of flavoring extracts. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 32(3), 171–179. <https://doi.org/10.1080/15376516.2021.1977880>
- Jiang, S. Y. N., Yang, F., Chan, K. L., & Ning, Z. (2014). Water solubility of metals in coarse PM and PM 2.5 in typical urban environment in Hong Kong. *Atmospheric Pollution Research*, 5(2), 236–244.
<https://doi.org/10.5094/APR.2014.029>
- Jin, L., Xie, J., Wong, C. K. C., Chan, S. K. Y., Abbaszade, G., Schnelle-Kreis, J., Zimmermann, R., Li, J., Zhang, G., Fu, P., & Li, X. (2019). Contributions of City-Specific Fine Particulate Matter (PM_{2.5}) to Differential *In Vitro* Oxidative Stress and Toxicity Implications between Beijing and Guangzhou of China. *Environmental Science & Technology*, 53(5), 2881–2891.
<https://doi.org/10.1021/acs.est.9b00449>
- 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. *The Journal of Toxicological Sciences*, 43(2), 101–111. <https://doi.org/10.2131/jts.43.101>
- Joly, A., Smargiassi, A., Kosatsky, T., Fournier, M., Dabek-Zlotorzynska, E., Celo, V., Mathieu, D., Servranckx, R., D'amours, R., Malo, A., & Brook, J. (2010). Characterisation of particulate exposure during fireworks displays. *Atmospheric Environment*, 44(34), 4325–4329.
<https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2009.12.010>
- Juarez Facio, A. T., Yon, J., Corbière, C., Rogez-Florent, T., Castilla, C., Lavanant, H., Mignot, M., Devouge-Boyer, C., Logie, C., Chevalier, L., Vaugeois, J.-M., & Monteil, C. (2022). Toxicological impact of organic ultrafine particles (UFPs) in human bronchial epithelial BEAS-2B cells at air-liquid interface. *Toxicology in Vitro*, 78, 105258. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2021.105258>
- 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. (2022). 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., Martin de Lagarde, V., Monteil, C., Vaugeois, J.-M., Corbiere, C., & Rogez-Florent, T. (2021). Validation of a Fast and Simple HPLC-UV Method for the Quantification of Adenosine Phosphates in Human Bronchial Epithelial Cells. *Molecules*, 26(20), 6324. <https://doi.org/10.3390/molecules26206324>
- Kanai, K., Koarai, A., Shishikura, Y., Sugiura, H., Ichikawa, T., Kikuchi, T., Akamatsu, K., Hirano, T., Nakanishi, M., Matsunaga, K., Minakata, Y., & Ichinose, M. (2015). Cigarette smoke augments MUC5AC production via the TLR3-EGFR pathway in airway epithelial cells. *Respiratory Investigation*, 53(4), 137–148. <https://doi.org/10.1016/j.resinv.2015.01.007>
- Karavalakis, G., Gysel, N., Schmitz, D. A., Cho, A. K., Sioutas, C., Schauer, J. J., Cocker, D. R., & Durbin, T. D. (2017). Impact of biodiesel on regulated and unregulated emissions, and redox and proinflammatory properties of PM emitted from heavy-duty vehicles. *Science of The Total Environment*, 584–585, 1230–1238. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.01.187>
- Karlsson, N., Fängmark, I., Häggqvist, I., Karlsson, B., Rittfeldt, L., & Marchner, H. (1991). Mutagenicity testing of condensates of smoke from titanium dioxide/hexachloroethane and zinc/hexachloroethane pyrotechnic mixtures. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 260(1), 39–46. [https://doi.org/10.1016/0165-1218\(91\)90078-Z](https://doi.org/10.1016/0165-1218(91)90078-Z)
- Kelly, F. J., & Fussell, J. C. (2012). Size, source and chemical composition as determinants of toxicity attributable to ambient particulate matter. *Atmospheric Environment*, 60, 504–526. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2012.06.039>
- Kelly, F. J., & Fussell, J. C. (2015). Linking ambient particulate matter pollution effects with oxidative biology and immune responses : Oxidative stress, inflammation, and particulate matter toxicity. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1340(1), 84–94. <https://doi.org/10.1111/nyas.12720>
- Khomenko, S., Cirach, M., Pereira-Barboza, E., Mueller, N., Barrera-Gómez, J., Rojas-Rueda, D., de Hoogh, K., Hoek, G., & Nieuwenhuijsen, M. (2021). Premature mortality due to air pollution in European cities : A health impact assessment. *The Lancet Planetary Health*, 5(3), e121–e134. [https://doi.org/10.1016/S2542-5196\(20\)30272-2](https://doi.org/10.1016/S2542-5196(20)30272-2)
- Khoshnamvand, N., Azizi, N., Naddafi, K., & Hassanzadeh, M. S. (2022). The effect of size distribution of ambient air particulate matter on oxidative potential by acellular method Dithiothreitol; a systematic review. *Journal of Environmental Health Science and Engineering*, 20(1), 579–588. <https://doi.org/10.1007/s40201-021-00768-w>
- Kiyokawa, H., & Morimoto, M. (2020). Notch signaling in the mammalian respiratory system, specifically the trachea and lungs, in development, homeostasis, regeneration, and disease. *Development, Growth & Differentiation*, 67–79.
- Klein, S. G., Serchi, T., Hoffmann, L., Blömeke, B., & Gutleb, A. C. (2013). An improved 3D tetraculture system mimicking the cellular organisation at the alveolar barrier to study the potential toxic effects of particles on the lung. *Particle and Fibre Toxicology*, 10(1), 31. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-10-31>
- Knowles, M. R., & Boucher, R. C. (2002). Mucus clearance as a primary innate defense mechanism for mammalian airways. *Journal of Clinical Investigation*, 109(5), 571–577. <https://doi.org/10.1172/JCI0215217>
- Koehler, K. A., Shapiro, J., Sameenoi, Y., Henry, C., & Volckens, J. (2014). Laboratory Evaluation of a Microfluidic Electrochemical Sensor for Aerosol Oxidative Load. *Aerosol Science and Technology*, 48(5), 489–497. <https://doi.org/10.1080/02786826.2014.891722>
- Kogianni, E., Samara, C., & Lialiaris, Th. (2021). Genotoxicity induced in vitro by water-soluble indoor PM_{2.5} fractions in relation to heavy metal concentrations. *Environmental Monitoring and Assessment*, 193(2), 82. <https://doi.org/10.1007/s10661-021-08884-8>
- Kong, S. F., Li, L., Li, X. X., Yin, Y., Chen, K., Liu, D. T., Yuan, L., Zhang, Y. J., Shan, Y. P., & Ji, Y. Q. (2015). The impacts of firework burning at the Chinese Spring Festival on air quality : Insights of tracers, source evolution and aging processes. *Atmospheric Chemistry and Physics*, 15(4), 2167–2184. <https://doi.org/10.5194/acp-15-2167-2015>
- 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. *Toxicology in Vitro*, 27(8), 2342–2349. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2013.10.007>
- Kooter, I. M., Gröllers-Mulderij, M., Steenhof, M., Duistermaat, E., van Acker, F. A. A., Staal, Y. C. M., Tromp, P. C., Schoen, E., Kuper, C. F., & van Someren, E. (2016). Cellular Effects in an In Vitro Human 3D Cellular Airway Model and A549/BEAS-2B In Vitro Cell Cultures Following Air Exposure to

- Cerium Oxide Particles at an Air–Liquid Interface. *Applied In Vitro Toxicology*, 2(1), 56–66.
<https://doi.org/10.1089/aivt.2015.0030>
- Kosanke, K. L., Kosanke, B. J., Sturman, B., Shimizu, T., Wilson, M., von Maltiz, I., Hancox, R., Kubota, N., Jennings-White, C., Chapman, D., Dillehay, D. R., Smith, T., & Podlesak, M. (2013). *Pyrotechnic Chemistry* (Journal of Pyrotechnics Inc). <http://www.jpyro.com>
- Kreft, M. E., Jerman, U. D., Lasič, E., Hevir-Kene, N., Rižner, T. L., Peternel, L., & Kristan, K. (2015). The characterization of the human cell line Calu-3 under different culture conditions and its use as an optimized in vitro model to investigate bronchial epithelial function. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 69, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2014.12.017>
- Kulshrestha, U. C., Nageswara Rao, T., Azhaguvel, S., & Kulshrestha, M. J. (2004). Emissions and accumulation of metals in the atmosphere due to crackers and sparkles during Diwali festival in India. *Atmospheric Environment*, 38(27), 4421–4425.
<https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2004.05.044>
- Kumar, M., Singh, R. K., Murari, V., Singh, A. K., Singh, R. S., & Banerjee, T. (2016). Fireworks induced particle pollution : A spatio-temporal analysis. *Atmospheric Research*, 180, 78–91.
<https://doi.org/10.1016/j.atmosres.2016.05.014>
- Kumar, P., Kalaiarasan, G., Porter, A. E., Pinna, A., Kłosowski, M. M., Demokritou, P., Chung, K. F., Pain, C., Arvind, D. K., Arcucci, R., Adcock, I. M., & Dillway, C. (2021). An overview of methods of fine and ultrafine particle collection for physicochemical characterisation and toxicity assessments. *Science of The Total Environment*, 756, 143553. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143553>
- Künzli, N., Mudway, I. S., Götschi, T., Shi, T., Kelly, F. J., Cook, S., Burney, P., Forsberg, B., Gauderman, J. W., Hazenkamp, M. E., Heinrich, J., Jarvis, D., Norbäck, D., Payo-Losa, F., Poli, A., Sunyer, J., & Borm, P. J. A. (2006). Comparison of Oxidative Properties, Light Absorbance, and Total and Elemental Mass Concentration of Ambient PM_{2.5} Collected at 20 European Sites. *Environmental Health Perspectives*, 114(5), 684–690. <https://doi.org/10.1289/ehp.8584>
- Kwon, H.-S., Ryu, M. H., & Carlsten, C. (2020). Ultrafine particles : Unique physicochemical properties relevant to health and disease. *Experimental & Molecular Medicine*, 52(3), 318–328.
<https://doi.org/10.1038/s12276-020-0405-1>
- Lacroix, G., Koch, W., Ritter, D., Gutleb, A. C., Larsen, S. T., Loret, T., Zanetti, F., Constant, S., Chortarea, S., Rothen-Rutishauser, B., Hiemstra, P. S., Frejafon, E., Hubert, P., Gribaldo, L., Kearns, P., Aublant, J.-M., Diabaté, S., Weiss, C., de Groot, A., & Kooter, I. (2018). Air–Liquid Interface *In Vitro* Models for Respiratory Toxicology Research : Consensus Workshop and Recommendations. *Applied In Vitro Toxicology*, 4(2), 91–106. <https://doi.org/10.1089/aivt.2017.0034>
- Lakhdar, R., Mumby, S., Abubakar-Waziri, H., Porter, A., Adcock, I. M., & Chung, K. F. (2022). Lung toxicity of particulates and gaseous pollutants using ex-vivo airway epithelial cell culture systems. *Environmental Pollution*, 305, 119323. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.119323>
- Lan, Y., Ng, C. T., Ong, C. N., Yu, L. E., & Bay, B. H. (2021). Transcriptomic analysis identifies dysregulated genes and functional networks in human small airway epithelial cells exposed to ambient PM_{2.5}. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 208, 111702.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111702>
- Lancaster, M. A., & Knoblich, J. A. (2014). Organogenesis in a dish : Modeling development and disease using organoid technologies. *Science*, 345(6194), 1247125.
<https://doi.org/10.1126/science.1247125>
- Lauwerys, R., Hoet, P., Haufroid, V., & Lison, D. (2007). *Toxicologie Industrielle et Intoxications Professionnelles* (5ème). Masson.
- Lechanteur, A., das Neves, J., & Sarmiento, B. (2018). The role of mucus in cell-based models used to screen mucosal drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 124, 50–63.
<https://doi.org/10.1016/j.addr.2017.07.019>
- Leclercq, B., Happillon, M., Antherieu, S., Hardy, E. M., Alleman, L. Y., Grova, N., Perdrix, E., Appenzeller, B. M., Lo Guidice, J.-M., Coddeville, P., & Garçon, G. (2016). Differential responses of healthy and chronic obstructive pulmonary diseased human bronchial epithelial cells repeatedly exposed to air pollution-derived PM₄. *Environmental Pollution*, 218, 1074–1088.
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.08.059>
- Lenz, A. G., Karg, E., Lentner, B., Dittrich, V., Brandenberger, C., Rothen-Rutishauser, B., Schulz, H., Ferron, G. A., & Schmid, O. (2009). A dose-controlled system for air-liquid interface cell exposure and application to zinc oxide nanoparticles. *Particle and Fibre Toxicology*, 6(1), 32.
<https://doi.org/10.1186/1743-8977-6-32>
- Lenz, A.-G., Karg, E., Brendel, E., Hinze-Heyn, H., Maier, K. L., Eickelberg, O., Stoeger, T., & Schmid, O. (2013). Inflammatory and Oxidative Stress Responses of an Alveolar Epithelial Cell Line to Airborne Zinc

- Oxide Nanoparticles at the Air-Liquid Interface : A Comparison with Conventional, Submerged Cell-Culture Conditions. *BioMed Research International*, 2013, 1□12.
<https://doi.org/10.1155/2013/652632>
- Li, J., Li, J., Wang, G., Ho, K. F., Dai, W., Zhang, T., Wang, Q., Wu, C., Li, L., Li, L., & Zhang, Q. (2021). Effects of atmospheric aging processes on in vitro induced oxidative stress and chemical composition of biomass burning aerosols. *Journal of Hazardous Materials*, 401, 123750.
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123750>
- Li, M., Shen, F., & Sun, X. (2021). 2019–2020 Australian bushfire air particulate pollution and impact on the South Pacific Ocean. *Scientific Reports*, 11(1), 12288. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-91547-y>
- Li, N., Hao, M., Phalen, R. F., Hinds, W. C., & Nel, A. E. (2003). Particulate air pollutants and asthma. *Clinical Immunology*, 109(3), 250□265. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2003.08.006>
- 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. *Environmental Health Perspectives*, 111(4), 455□460. <https://doi.org/10.1289/ehp.6000>
- Li, N., Wang, M., Oberley, T. D., Sempf, J. M., & Nel, A. E. (2002). Comparison of the Pro-Oxidative and Proinflammatory Effects of Organic Diesel Exhaust Particle Chemicals in Bronchial Epithelial Cells and Macrophages. *The Journal of Immunology*, 169(8), 4531□4541.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.169.8.4531>
- Lieber, M., Todaro, G., Smith, B., Szakal, A., & Nelson-Rees, W. (1976). A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells. *International Journal of Cancer*, 17(1), 62□70. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910170110>
- Lin, C.-C. (2016). A review of the impact of fireworks on particulate matter in ambient air. *Journal of the Air & Waste Management Association*, 66(12), 1171□1182.
<https://doi.org/10.1080/10962247.2016.1219280>
- Lin, C.-C., Huang, K.-L., Chen, H.-L., Tsai, J.-H., Chiu, Y.-P., Lee, J.-T., & Chen, S.-J. (2014). Influences of Beehive Firework Displays on Ambient Fine Particles during the Lantern Festival in the YanShuei Area of Southern Taiwan. *Aerosol and Air Quality Research*, 14(7), 1998□2009.
<https://doi.org/10.4209/aaqr.2014.09.0201>
- Lin, C.-H., Lung, S.-C. C., Chen, Y.-C., & Wang, L.-C. (2021). Pulmonary toxicity of actual alveolar deposition concentrations of ultrafine particulate matters in human normal bronchial epithelial cell. *Environmental Science and Pollution Research*, 28(36), 50179□50187.
<https://doi.org/10.1007/s11356-021-14265-y>
- Lin, Q., Chen, X., Huo, T., Dong, F., & Deng, J. (2022). [PM_{2.5} dust induces autophagy and epithelial-mesenchymal transition in human bronchial epithelial 16HBE cells]. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi = Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology*, 38(4), 328□332.
- Liu, L., Chu, K. K., Houser, G. H., Diephuis, B. J., Li, Y., Wilsterman, E. J., Shastry, S., Dierksen, G., Birket, S. E., Mazur, M., Byan-Parker, S., Grizzle, W. E., Sorscher, E. J., Rowe, S. M., & Tearney, G. J. (2013). Method for Quantitative Study of Airway Functional Microanatomy Using Micro-Optical Coherence Tomography. *PLoS ONE*, 8(1), e54473. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054473>
- Liu, Q., Baumgartner, J., Zhang, Y., Liu, Y., Sun, Y., & Zhang, M. (2014). Oxidative Potential and Inflammatory Impacts of Source Apportioned Ambient Air Pollution in Beijing. *Environmental Science & Technology*, 48(21), 12920□12929. <https://doi.org/10.1021/es5029876>
- Loboda, A., Damulewicz, M., Pyza, E., Jozkowicz, A., & Dulak, J. (2016). Role of Nrf2/HO-1 system in development, oxidative stress response and diseases : An evolutionarily conserved mechanism. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73(17), 3221□3247. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2223-0>
- Loh, C.-H., Chang, Y.-W., Liou, S.-H., Chang, J.-H., & Chen, H.-I. (2006). Case Report : Hexachloroethane Smoke Inhalation: A Rare Cause of Severe Hepatic Injuries. *Environmental Health Perspectives*, 114(5), 763□765. <https://doi.org/10.1289/ehp.8635>
- Loh, C.-H., Liou, S.-H., Chang, Y.-W., Chen, H.-I., Perng, W.-C., Ku, H.-Y., & Chen, Y.-H. (2008). Hepatic injuries of hexachloroethane smoke inhalation : The first analytical epidemiological study. *Toxicology*, 247(2□3), 119□122. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2008.02.012>
- Longhin, E., Pezzolato, E., Mantecca, P., Holme, J. A., Franzetti, A., Camatini, M., & Gualtieri, M. (2013). Season linked responses to fine and quasi-ultrafine Milan PM in cultured cells. *Toxicology in Vitro*, 27(2), 551□559. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2012.10.018>
- Longmire, T. A., Ikononou, L., Hawkins, F., Christodoulou, C., Cao, Y., Jean, J. C., Kwok, L. W., Mou, H., Rajagopal, J., Shen, S. S., Dowton, A. A., Serra, M., Weiss, D. J., Green, M. D., Snoeck, H.-W., Ramirez,

- M. I., & Kotton, D. N. (2012). Efficient Derivation of Purified Lung and Thyroid Progenitors from Embryonic Stem Cells. *Cell Stem Cell*, 10(4), 398–411.
<https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.01.019>
- Loomis, D., Grosse, Y., Lauby-Secretan, B., Ghissassi, F. E., Bouvard, V., Benbrahim-Tallaa, L., Guha, N., Baan, R., Mattock, H., & Straif, K. (2013). The carcinogenicity of outdoor air pollution. *The Lancet Oncology*, 14(13), 1262–1263. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(13\)70487-X](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(13)70487-X)
- 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. *Particle and Fibre Toxicology*, 13(1), 58. <https://doi.org/10.1186/s12989-016-0171-3>
- Losacco, C., & Perillo, A. (2018). Particulate matter air pollution and respiratory impact on humans and animals. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(34), 33901–33910.
<https://doi.org/10.1007/s11356-018-3344-9>
- Lourenço, R. V., & Cotromanes, E. (1982). Clinical aerosols. I. Characterization of aerosols and their diagnostic uses. *Archives of Internal Medicine*, 142(12), 2163–2172.
- Lovera-Leroux, M., Crobeddu, B., Kassis, N., Petit, P. X., Janel, N., Baeza-Squiban, A., & Andreau, K. (2015). The iron component of particulate matter is antiapoptotic : A clue to the development of lung cancer after exposure to atmospheric pollutants? *Biochimie*, 118, 195–206.
<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2015.09.030>
- Luo, F., Guo, H., Yu, H., Li, Y., Feng, Y., & Wang, Y. (2021). PM2.5 organic extract mediates inflammation through the ER β pathway to contribute to lung carcinogenesis in vitro and vivo. *Chemosphere*, 263, 127867. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127867>
- Lyu, Y., Guo, H., Cheng, T., & Li, X. (2018). Particle Size Distributions of Oxidative Potential of Lung-Deposited Particles : Assessing Contributions from Quinones and Water-Soluble Metals. *Environmental Science & Technology*, 52(11), 6592–6600.
<https://doi.org/10.1021/acs.est.7b06686>
- Macaulay, M. B., & Mant, A. K. (1964). SMOKE-BOMB POISONING. A FATAL CASE FOLLOWING THE INHALATION OF ZINC CHLORIDE SMOKE. *Journal of the Royal Army Medical Corps*, 110, 27–32.
- Maikawa, C. L., Weichenthal, S., Wheeler, A. J., Dobbin, N. A., Smargiassi, A., Evans, G., Liu, L., Goldberg, M. S., & Pollitt, K. J. G. (2016). Particulate Oxidative Burden as a Predictor of Exhaled Nitric Oxide in Children with Asthma. *Environmental Health Perspectives*, 124(10), 1616–1622.
<https://doi.org/10.1289/EHP175>
- Mariussen, E., Fjellsbø, L., Frømyr, T. R., Johnsen, I. V., Karsrud, T. E., & Voie, Ø. A. (2021). Toxic effects of gunshot fumes from different ammunitions for small arms on lung cells exposed at the air liquid interface. *Toxicology in Vitro*, 72, 105095. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2021.105095>
- Marrazzo, P., Maccari, S., Taddei, A., Bevan, L., Telford, J., Soriani, M., & Pezzicoli, A. (2016). 3D Reconstruction of the Human Airway Mucosa In Vitro as an Experimental Model to Study NTHi Infections. *PLOS ONE*, 11(4), e0153985. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153985>
- Martin de Lagarde, V., Rogez-Florent, T., Cazier, F., Dewaele, D., Cazier-Dennin, F., Ollivier, A., Janona, M., Achard, S., André, V., Monteil, C., & Corbière, C. (2022). Oxidative potential and in vitro toxicity of particles generated by pyrotechnic smokes in human small airway epithelial cells. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 239, 113637. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.113637>
- Mazzarella, G., Ferraraccio, F., Prati, M. V., Annunziata, S., Bianco, A., Mezzogiorno, A., Liguori, G., Angelillo, I. F., & Cazzola, M. (2007). Effects of diesel exhaust particles on human lung epithelial cells : An in vitro study. *Respiratory Medicine*, 101(6), 1155–1162.
<https://doi.org/10.1016/j.rmed.2006.11.011>
- Méausoone, C., Landkocz, Y., Cazier, F., Seigneur, M., Courcot, D., & Billet, S. (2021). Toxicological responses of BEAS-2B cells to repeated exposures to benzene, toluene, m -xylene, and mesitylene using air-liquid interface method. *Journal of Applied Toxicology*, 41(8), 1262–1274.
<https://doi.org/10.1002/jat.4113>
- Mekki, M. (2017). *Caractérisation physico-chimique et évaluation toxicologique de fumées particulières produites lors de tirs de petit calibre et de fumigènes : Étude comparative*. Normandie Université.
- Memon, T. A., Nguyen, N. D., Burrell, K. L., Scott, A. F., Almestica-Roberts, M., Rapp, E., Deering-Rice, C. E., & Reilly, C. A. (2020). Wood Smoke Particles Stimulate MUC5AC Overproduction by Human Bronchial Epithelial Cells Through TRPA1 and EGFR Signaling. *Toxicological Sciences*, 174(2), 278–290. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfaa006>
- Merk, R., Heßelbach, K., Osipova, A., Popadić, D., Schmidt-Heck, W., Kim, G.-J., Günther, S., Piñeres, A. G., Merfort, I., & Humar, M. (2020). Particulate Matter (PM2.5) from Biomass Combustion Induces an Anti-Oxidative Response and Cancer Drug Resistance in Human Bronchial Epithelial BEAS-2B

- Cells. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(21), 8193.
<https://doi.org/10.3390/ijerph17218193>
- Methner, M. M., Gibbins, J., & Niemeier, T. (2013). *Evaluation of Instructor and Range Officer Exposure to Emissions from Copper-Based Frangible Ammunition at a Military Firing Range* (N° 2012-0091-3187; p. 32). U.S. Department of Health and Human Services Centers for Disease Control and Prevention National Institute for Occupational Safety and Health.
<https://www.cdc.gov/niosh/hhe/reports/pdfs/2012-0091-3187.pdf>
- Migdal, C., & Serres, M. (2011). Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant. *médecine/sciences*, 27(4), 405-412. <https://doi.org/10.1051/medsci/2011274017>
- Miguel, A. G., Cass, G. R., Glovsky, M. M., & Weiss, J. (1999). Allergens in Paved Road Dust and Airborne Particles. *Environmental Science & Technology*, 33(23), 4159-4168.
<https://doi.org/10.1021/es9904890>
- Mills, P. R., Davies, R. J., & Devalia, J. L. (1999). Airway Epithelial Cells, Cytokines, and Pollutants. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 160(supplement_1), S38-S43.
https://doi.org/10.1164/ajrccm.160.supplement_1.11
- Min, K. A., Rosania, G. R., Kim, C.-K., & Shin, M. C. (2016). Functional and cytometric examination of different human lung epithelial cell types as drug transport barriers. *Archives of Pharmacal Research*, 39(3), 359-369. <https://doi.org/10.1007/s12272-015-0704-6>
- Møller, P., Danielsen, P. H., Karottki, 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. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 762, 133-166.
<https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2014.09.001>
- Mondrinos, M. J., Jones, P. L., Finck, C. M., & Lelkes, P. I. (2014). Engineering De Novo Assembly of Fetal Pulmonary Organoids. *Tissue Engineering Part A*, 20(21-22), 2892-2907.
<https://doi.org/10.1089/ten.tea.2014.0085>
- Moore, J. X., McGwin, G., & Griffin, R. L. (2014). The epidemiology of firework-related injuries in the United States : 2000-2010. *Injury*, 45(11), 1704-1709. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2014.06.024>
- Moorthy, B., Chu, C., & Carlin, D. J. (2015). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons : From Metabolism to Lung Cancer. *Toxicological Sciences*, 145(1), 5-15. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfv040>
- Moran, M. P., & Ott, D. K. (2008). *Lead Free Frangible Ammunition Exposure at United States Air Force Small Arms Firing Ranges, 2005-2007* (N° ADA487506; p. 56). Air Force Institute for Operational Health Risk Analysis Directorate Health and Safety Division.
<https://apps.dtic.mil/sti/pdfs/ADA487506.pdf>
- Moschini, E., Gualtieri, M., Colombo, M., Fascio, U., Camatini, M., & Mantecca, P. (2013). The modality of cell-particle interactions drives the toxicity of nanosized CuO and TiO₂ in human alveolar epithelial cells. *Toxicology Letters*, 222(2), 102-116.
<https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2013.07.019>
- 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>
- Moxnes, J. F., Jensen, T. L., Smestad, E., Unneberg, E., & Dullum, O. (2013). Lead Free Ammunition without Toxic Propellant Gases. *Propellants, Explosives, Pyrotechnics*, 38(2), 255-260.
<https://doi.org/10.1002/prep.201200021>
- National Research Council (U.S.) (Éd.). (1997a). *Toxicity of Military Smokes and Obscurants : Volume 2*. National Academy Press.
- National Research Council (U.S.). (1997b). *Toxicity of Military Smokes and Obscurants : Volume 1* (p. 5582). National Academy Press. <https://doi.org/10.17226/5582>
- National Research Council (U.S.) (Éd.). (1999). *Toxicity of Military Smokes and Obscurants : Volume 3* (p. 9645). National Academies Press. <https://doi.org/10.17226/9645>
- Newhouse, M., Sanchis, J., & Bienenstock, J. (1976). Lung Defense Mechanisms : (Second of Two Parts). *New England Journal of Medicine*, 295(19), 1045-1052.
<https://doi.org/10.1056/NEJM197611042951905>
- Nicholson, D. G. (1943). Chemical agents as screening smokes. *Journal of Chemical Education*, 20(10), 499.
<https://doi.org/10.1021/ed020p499>
- Niden, A. H. (1967). Bronchiolar and Large Alveolar Cell in Pulmonary Phospholipid Metabolism. *Science*, 158(3806), 1323-1324. <https://doi.org/10.1126/science.158.3806.1323>

- Niemann, B., Rohrbach, S., Miller, M. R., Newby, D. E., Fuster, V., & Kovacic, J. C. (2017). Oxidative Stress and Cardiovascular Risk : Obesity, Diabetes, Smoking, and Pollution. *Journal of the American College of Cardiology*, 70(2), 230–251. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2017.05.043>
- Nirmalkar, J., Deb, M. K., Deshmukh, D. K., & Verma, S. K. (2013). Mass Loading of Size-Segregated Atmospheric Aerosols in the Ambient Air During Fireworks Episodes in Eastern Central India. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 90(4), 434–439. <https://doi.org/10.1007/s00128-012-0938-7>
- Nishita-Hara, C., Hirabayashi, M., Hara, K., Yamazaki, A., & Hayashi, M. (2019). Dithiothreitol-Measured Oxidative Potential of Size-Segregated Particulate Matter in Fukuoka, Japan : Effects of Asian Dust Events. *GeoHealth*, 3(6), 160–173. <https://doi.org/10.1029/2019GH000189>
- Niu, B.-Y., Li, W.-K., Li, J.-S., Hong, Q.-H., Khodahemmati, S., Gao, J.-F., & Zhou, Z.-X. (2020). Effects of DNA Damage and Oxidative Stress in Human Bronchial Epithelial Cells Exposed to PM_{2.5} from Beijing, China, in Winter. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(13), 4874. <https://doi.org/10.3390/ijerph17134874>
- Nordberg, M., Täubel, M., Jalava, P. I., Bérubé, K., Tervahauta, A., Hyvärinen, A., & Huttunen, K. (2020). Human airway construct model is suitable for studying transcriptome changes associated with indoor air particulate matter toxicity. *Indoor Air*, 30(3), 433–444. <https://doi.org/10.1111/ina.12637>
- North Atlantic Treaty Organization. (2016). *Guidelines for Toxicity Testing of Smokes, Obscurants, and Pyrotechnic Mixtures* (SCI-273).
- Oberdörster, G., Oberdörster, E., & Oberdörster, J. (2005). Nanotoxicology : An Emerging Discipline Evolving from Studies of Ultrafine Particles. *Environmental Health Perspectives*, 113(7), 823–839. <https://doi.org/10.1289/ehp.7339>
- Ochsmann, E., Göen, T., Schaller, K.-H., & Drexler, H. (2009). Lead – Still a health threat for marksmen. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 212(5), 557–561. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2008.11.001>
- OMS. (2021). *Pollution de l'air ambiant (extérieur)*. <https://www.who.int/fr/news/item/22-09-2021-new-who-global-air-quality-guidelines-aim-to-save-millions-of-lives-from-air-pollution>
- Oudin, A., Carlsen, H., Forsberg, B., & Johansson, C. (2013). Volcanic Ash and Daily Mortality in Sweden after the Icelandic Volcano Eruption of May 2011. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 10(12), 6909–6919. <https://doi.org/10.3390/ijerph10126909>
- 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. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(19), 4772. <https://doi.org/10.3390/ijms20194772>
- Pardo, M., Porat, Z., Rudich, A., Schauer, J. J., & Rudich, Y. (2016). Repeated exposures to roadside particulate matter extracts suppresses pulmonary defense mechanisms, resulting in lipid and protein oxidative damage. *Environmental Pollution*, 210, 227–237. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.12.009>
- Pardo, M., Qiu, X., Zimmermann, R., & Rudich, Y. (2020). Particulate Matter Toxicity Is Nrf2 and Mitochondria Dependent : The Roles of Metals and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Chemical Research in Toxicology*, 33(5), 1110–1120. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.0c00007>
- Pardo, M., Shafer, M. M., Rudich, A., Schauer, J. J., & Rudich, Y. (2015). Single Exposure to near Roadway Particulate Matter Leads to Confined Inflammatory and Defense Responses : Possible Role of Metals. *Environmental Science & Technology*, 49(14), 8777–8785. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b01449>
- Patel, R., & Mukherjee, B. (2014). Crash & Burn : Ocular Injuries due to Fireworks. *Seminars in Ophthalmology*, 1–6. <https://doi.org/10.3109/08820538.2014.962157>
- Pathak, B., Biswas, J., Bharali, C., & Bhuyan, P. K. (2015). Short term introduction of pollutants into the atmosphere at a location in the Brahmaputra Basin : A case study. *Atmospheric Pollution Research*, 6(2), 220–229. <https://doi.org/10.5094/APR.2015.026>
- Paz, H. B., Tisdale, A. S., Danjo, Y., Spurr-Michaud, S. J., Argüeso, P., & Gipson, I. K. (2003). The role of calcium in mucin packaging within goblet cells. *Experimental Eye Research*, 77(1), 69–75. [https://doi.org/10.1016/S0014-4835\(03\)00084-8](https://doi.org/10.1016/S0014-4835(03)00084-8)
- Peixoto, M. S., de Oliveira Galvão, M. F., & Batistuzzo de Medeiros, S. R. (2017). Cell death pathways of particulate matter toxicity. *Chemosphere*, 188, 32–48. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.08.076>
- Persoz, C., Achard, S., Momas, I., & Seta, N. (2012). Inflammatory response modulation of airway epithelial cells exposed to formaldehyde. *Toxicology Letters*, 211(2), 159–163.

- <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2012.03.799>
- Pettilä, V., Takkunen, O., & Tukiainen, P. (2000). Zinc chloride smoke inhalation : A rare cause of severe acute respiratory distress syndrome. *Intensive Care Medicine*, 26(2), 215–217. <https://doi.org/10.1007/s001340050049>
- 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., & Nesslany, 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. *Science of The Total Environment*, 711, 134666. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134666>
- Pohl, C., Hermanns, M. I., Uboldi, C., Bock, M., Fuchs, S., Dei-Anang, J., Mayer, E., Kehe, K., Kummer, W., & Kirkpatrick, C. J. (2009). Barrier functions and paracellular integrity in human cell culture models of the proximal respiratory unit. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 72(2), 339–349. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2008.07.012>
- Querol, X., Viana, M., Alastuey, A., Amato, F., Moreno, T., Castillo, S., Pey, J., de la Rosa, J., Sánchez de la Campa, A., Artíñano, B., Salvador, P., García Dos Santos, S., Fernández-Patier, R., Moreno-Grau, S., Negral, L., Minguillón, M. C., Monfort, E., Gil, J. I., Inza, A., ... Zabalza, J. (2007). Source origin of trace elements in PM from regional background, urban and industrial sites of Spain. *Atmospheric Environment*, 41(34), 7219–7231. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2007.05.022>
- Rahman, Q., Abidi, P., Afaq, F., Schiffmann, D., Mossman, B. T., Kamp, D. W., & Athar, M. (1999). Glutathione Redox System in Oxidative Lung Injury. *Critical Reviews in Toxicology*, 29(6), 543–568. <https://doi.org/10.1080/10408449991349276>
- Raisi, L., Aleksandropoulou, V., Lazaridis, M., & Katsivela, E. (2013). Size distribution of viable, cultivable, airborne microbes and their relationship to particulate matter concentrations and meteorological conditions in a Mediterranean site. *Aerobiologia*, 29(2), 233–248. <https://doi.org/10.1007/s10453-012-9276-9>
- 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. *Scientific Reports*, 9(1), 500. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36735-z>
- Reddel, R. R., Ke, Y., Gerwin, B. I., McMenamin, M. G., Lechner, J. F., Su, R. T., Brash, D. E., Park, J. B., Rhim, J. S., & Harris, C. C. (1988). Transformation of human bronchial epithelial cells by infection with SV40 or adenovirus-12 SV40 hybrid virus, or transfection via strontium phosphate coprecipitation with a plasmid containing SV40 early region genes. *Cancer Research*, 48(7), 1904–1909.
- Retama, A., Neria-Hernández, A., Jaimes-Palomera, M., Rivera-Hernández, O., Sánchez-Rodríguez, M., López-Medina, A., & Velasco, E. (2019). Fireworks : A major source of inorganic and organic aerosols during Christmas and New Year in Mexico city. *Atmospheric Environment: X*, 2, 100013. <https://doi.org/10.1016/j.aeaoa.2019.100013>
- Rocha, E. D., Sarkis, J. E. S., Carvalho, M. de F. H., Santos, G. V. dos, & Canesso, C. (2014). Occupational exposure to airborne lead in Brazilian police officers. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 217(6), 702–704. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2013.12.004>
- Rock, J. R., Onaitis, M. W., Rawlins, E. L., Lu, Y., Clark, C. P., Xue, Y., Randell, S. H., & Hogan, B. L. M. (2009). Basal cells as stem cells of the mouse trachea and human airway epithelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(31), 12771–12775. <https://doi.org/10.1073/pnas.0906850106>
- Rogula-Kozłowska, W., Klejnowski, K., Rogula-Kopiec, P., Ośródk, L., Krajny, E., Błaszczak, B., & Mathews, B. (2014). *Air Quality, Atmosphere & Health*, 7(1), 41–58. <https://doi.org/10.1007/s11869-013-0222-y>
- Rokicki, W., Rokicki, M., Wojtacha, J., & Dzelijli, A. (2016). The role and importance of club cells (Clara cells) in the pathogenesis of some respiratory diseases. *Polish Journal of Cardio-Thoracic Surgery*, 1, 26–30. <https://doi.org/10.5114/kitp.2016.58961>
- Ross, A. J., Dailey, L. A., Brighton, L. E., & Devlin, R. B. (2007). Transcriptional Profiling of Mucociliary Differentiation in Human Airway Epithelial Cells. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 37(2), 169–185. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2006-0466OC>
- Rothen-Rutishauser, B., Blank, F., Mühlfeld, C., & Gehr, P. (2008). In vitro models of the human epithelial airway barrier to study the toxic potential of particulate matter. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 4(8), 1075–1089. <https://doi.org/10.1517/17425255.4.8.1075>
- Roy, R., Jan, R., Yadav, S., Vasave, M. H., & Gursumeeran Satsangi, P. (2016). Study of metals in radical-mediated toxicity of particulate matter in indoor environments of Pune, India. *Air Quality*,

- Atmosphere & Health*, 9(6), 669–680. <https://doi.org/10.1007/s11869-015-0376-x>
- Salam, A., Assaduzzaman, Md., Hossain, M. N., & Siddiki, A. K. M. N. A. (2015). Water Soluble Ionic Species in the Atmospheric Fine Particulate Matters (PM_{2.5}) in a Southeast Asian Mega City (Dhaka, Bangladesh). *Open Journal of Air Pollution*, 04(03), 99–108. <https://doi.org/10.4236/ojap.2015.43010>
- Salomon, J. J., Muchitsch, V. E., Gausterer, J. C., Schwagerus, E., Huwer, H., Daum, N., Lehr, C.-M., & Ehrhardt, C. (2014). The Cell Line NCI-H441 Is a Useful *in Vitro* Model for Transport Studies of Human Distal Lung Epithelial Barrier. *Molecular Pharmaceutics*, 11(3), 995–1006. <https://doi.org/10.1021/mp4006535>
- Samara, C., Voutsas, D., Kouras, A., Eleftheriadis, K., Maggos, T., Saraga, D., & Petrakakis, M. (2014). Organic and elemental carbon associated to PM₁₀ and PM_{2.5} at urban sites of northern Greece. *Environmental Science and Pollution Research*, 21(3), 1769–1785. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-2052-8>
- Sanchez-Guzman, D., Boland, S., Brookes, O., Mc Cord, C., Lai Kuen, R., Sirri, V., Baeza Squiban, A., & Devineau, S. (2021). Long-term evolution of the epithelial cell secretome in preclinical 3D models of the human bronchial epithelium. *Scientific Reports*, 11(1), 6621. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-86037-0>
- Sandvall, B. K., Keys, K. A., & Friedrich, J. B. (2017). Severe Hand Injuries From Fireworks : Injury Patterns, Outcomes, and Fireworks Types. *The Journal of Hand Surgery*, 42(5), 385.e1-385.e8. <https://doi.org/10.1016/j.jhsa.2017.01.028>
- Sarnat, S. E., Chang, H. H., & Weber, R. J. (2016). Ambient PM_{2.5} and Health : Does PM_{2.5} Oxidative Potential Play a Role? *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 194(5), 530–531. <https://doi.org/10.1164/rccm.201603-0589ED>
- Seidel, D. J., & Birnbaum, A. N. (2015). Effects of Independence Day fireworks on atmospheric concentrations of fine particulate matter in the United States. *Atmospheric Environment*, 115, 192–198. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2015.05.065>
- Seinfeld, J. H., & Pandis, S. N. (2006). *Atmospheric chemistry and physics : From air pollution to climate change—2nd Edition* (John Wiley&Sons).
- 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. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(10), 9862–9870. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6228-x>
- Sethi, G. S., Dharwal, V., & Naura, A. S. (2019). Immunological Basis of Oxidative Stress-Induced Lung Inflammation in Asthma and COPD. In S. Chakraborti, T. Chakraborti, S. K. Das, & D. Chattopadhyay (Éds.), *Oxidative Stress in Lung Diseases* (p. 195–223). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-13-8413-4_11
- Shen, G., Tao, S., Wei, S., Zhang, Y., Wang, R., Wang, B., Li, W., Shen, H., Huang, Y., Chen, Y., Chen, H., Yang, Y., Wang, W., Wei, W., Wang, X., Liu, W., Wang, X., & Simonich, S. L. M. (2012). Reductions in Emissions of Carbonaceous Particulate Matter and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons from Combustion of Biomass Pellets in Comparison with Raw Fuel Burning. *Environmental Science & Technology*, 46(11), 6409–6416. <https://doi.org/10.1021/es300369d>
- Shi, T., Schins, R. P. F., Knaapen, A. M., Kuhlbusch, T., Pitz, M., Heinrich, J., & Borm, P. J. A. (2003). Hydroxyl radical generation by electron paramagnetic resonance as a new method to monitor ambient particulate matter composition. *Journal of Environmental Monitoring*, 5(4), 550. <https://doi.org/10.1039/b303928p>
- Sillanpää, M., Hillamo, R., Saarikoski, S., Frey, A., Pennanen, A., Makkonen, U., Spolnik, Z., Van Grieken, R., Braniš, M., & Brunekreef, B. (2006). Chemical composition and mass closure of particulate matter at six urban sites in Europe. *Atmospheric Environment*, 40, 212–223. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2006.01.063>
- Singh, A., Kamal, R., Ahamed, I., Wagh, M., Bihari, V., Sathian, B., & Kesavachandran, C. N. (2018). PAH exposure-associated lung cancer : An updated meta-analysis. *Occupational Medicine*, 68(4), 255–261. <https://doi.org/10.1093/occmed/kqy049>
- Singh, G., & Katyal, S. L. (2006). Clara Cell Proteins. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 923(1), 43–58. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2000.tb05518.x>
- Sisler, J. D., Pirela, S. V., Friend, S., Farcas, M., Schwegler-Berry, D., Shvedova, A., Castranova, V., Demokritou, P., & Qian, Y. (2015). Small airway epithelial cells exposure to printer-emitted

- engineered nanoparticles induces cellular effects on human microvascular endothelial cells in an alveolar-capillary co-culture model. *Nanotoxicology*, 9(6), 769–779.
<https://doi.org/10.3109/17435390.2014.976603>
- Sisler, J. D., Shaffer, J., Soo, J.-C., LeBouf, R. F., Harper, M., Qian, Y., & Lee, T. (2018). In vitro toxicological evaluation of surgical smoke from human tissue. *Journal of Occupational Medicine and Toxicology*, 13(1), 12. <https://doi.org/10.1186/s12995-018-0193-x>
- Skuland, T. S., Refsnes, M., Magnusson, P., Oczkowski, M., Gromadzka-Ostrowska, J., Kruszewski, M., Mruk, R., Myhre, O., Lankoff, A., & Øvrevik, J. (2017). Proinflammatory effects of diesel exhaust particles from moderate blend concentrations of 1st and 2nd generation biodiesel in BEAS-2B bronchial epithelial cells—The FuelHealth project. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 52, 138–142. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2017.04.004>
- Son, E. S., Park, J.-W., Kim, Y. J., Jeong, S. H., Hong, J. H., Kim, S.-H., & Kyung, S. Y. (2020). Effects of antioxidants on oxidative stress and inflammatory responses of human bronchial epithelial cells exposed to particulate matter and cigarette smoke extract. *Toxicology in Vitro*, 67, 104883. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2020.104883>
- Song, C., Pei, T., & Yao, L. (2015). Analysis of the Characteristics and Evolution Modes of PM_{2.5} Pollution Episodes in Beijing, China During 2013. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 12(2), 1099–1111. <https://doi.org/10.3390/ijerph120201099>
- Sonntag, T., Rapp, M., Didier, P., Lebeau, L., Pons, F., & Casset, A. (2022). Mucus-producing epithelial models for investigating the activity of gene delivery systems in the lung. *International Journal of Pharmaceutics*, 614, 121423. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.121423>
- 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. *Environmental Research*, 176, 108538. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.108538>
- Souza, D. Z., Vasconcellos, P. C., Lee, H., Aurela, M., Saarnio, K., Teinilä, K., & Hillamo, R. (2014). Composition of PM_{2.5} and PM₁₀ Collected at Urban Sites in Brazil. *Aerosol and Air Quality Research*, 14(1), 168–176. <https://doi.org/10.4209/aaqr.2013.03.0071>
- Steenhof, M., Gosens, I., Strak, M., Godri, K. J., Hoek, G., Cassee, F. R., Mudway, I. S., Kelly, F. J., Harrison, R. M., Lebret, E., Brunekreef, B., Janssen, N. A., & Pieters, R. H. (2011). In vitro toxicity of particulate matter (PM) collected at different sites in the Netherlands is associated with PM composition, size fraction and oxidative potential—The RAPTES project. *Particle and Fibre Toxicology*, 8(1), 26. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-8-26>
- 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. *Journal of Allergy*, 2012, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2012/943982>
- Strak, M., Janssen, N. A. H., Godri, K. J., Gosens, I., Mudway, I. S., Cassee, F. R., Lebret, E., Kelly, F. J., Harrison, R. M., Brunekreef, B., Steenhof, M., & Hoek, G. (2012). Respiratory Health Effects of Airborne Particulate Matter : The Role of Particle Size, Composition, and Oxidative Potential—The RAPTES Project. *Environmental Health Perspectives*, 120(8), 1183–1189. <https://doi.org/10.1289/ehp.1104389>
- Stuart, B. O. (1984). Deposition and clearance of inhaled particles. *Environmental Health Perspectives*, 55, 369–390. <https://doi.org/10.1289/ehp.8455369>
- Stucki, A. O., Stucki, J. D., Hall, S. R. R., Felder, M., Mermoud, Y., Schmid, R. A., Geiser, T., & Guenat, O. T. (2015). A lung-on-a-chip array with an integrated bio-inspired respiration mechanism. *Lab on a Chip*, 15(5), 1302–1310. <https://doi.org/10.1039/C4LC01252F>
- Švédová, B., Kuchel, M., Raclavská, H., Růžicková, J., Raclavský, K., & Sassmanová, V. (2019). Water-soluble ions in dust particles depending on meteorological conditions in urban environment. *Journal of Environmental Management*, 237, 322–331. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.02.086>
- Svensson, B.-G., Schötz, A., Nilsson, A., & Skerfving, S. (1992). Lead exposure in indoor firing ranges. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 64(4), 219–221. <https://doi.org/10.1007/BF00378278>
- Svensson, C. R., Ameer, S. S., Ludvigsson, L., Ali, N., Alhamdow, A., Messing, M. E., Pagels, J., Gudmundsson, A., Bohgard, M., Sanfins, E., Kåredal, M., Broberg, K., & Rissler, J. (2016). Validation of an air-liquid interface toxicological set-up using Cu, Pd, and Ag well-characterized nanostructured aggregates and spheres. *Journal of Nanoparticle Research*, 18(4), 86. <https://doi.org/10.1007/s11051-016-3389-y>
- Terzano, C., Di Stefano, F., Conti, V., Graziani, E., & Petroianni, A. (2010). Air pollution ultrafine particles : Toxicity beyond the lung. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 14(10),

- Thaikootathil, J. V., Martin, R. J., Zdunek, J., Weinberger, A., Rino, J. G., & Chu, H. W. (2009). Cigarette smoke extract reduces VEGF in primary human airway epithelial cells. *European Respiratory Journal*, 33(4), 835–843. <https://doi.org/10.1183/09031936.00080708>
- Thannickal, V. J., & Fanburg, B. L. (2000). Reactive oxygen species in cell signaling. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 279(6), L1005–L1028. <https://doi.org/10.1152/ajplung.2000.279.6.L1005>
- Tian, Y. Z., Wang, J., Peng, X., Shi, G. L., & Feng, Y. C. (2014). Estimation of the direct and indirect impacts of fireworks on the physicochemical characteristics of atmospheric PM₁₀ and PM_{2.5}. *Atmospheric Chemistry and Physics*, 14(18), 9469–9479. <https://doi.org/10.5194/acp-14-9469-2014>
- Tilly, T. B., Nelson, M. T., Chakravarthy, K. B., Shira, E. A., Debrose, M. C., Grabinski, C. M., Salisbury, R. L., Mattie, D. R., & Hussain, S. M. (2020). In Vitro Aerosol Exposure to Nanomaterials : From Laboratory to Environmental Field Toxicity Testing. *Chemical Research in Toxicology*, 33(5), 1179–1194. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.9b00237>
- Tomašek, I., Horwell, C. J., Damby, D. E., Barošová, H., Geers, C., Petri-Fink, A., Rothen-Rutishauser, B., & Clift, M. J. D. (2016). Combined exposure of diesel exhaust particles and respirable Soufrière Hills volcanic ash causes a (pro-)inflammatory response in an in vitro multicellular epithelial tissue barrier model. *Particle and Fibre Toxicology*, 13(1), 67. <https://doi.org/10.1186/s12989-016-0178-9>
- Tonne, C., Yanosky, J. D., Beevers, S., Wilkinson, P., & Kelly, F. J. (2012). PM Mass Concentration and PM Oxidative Potential in Relation to Carotid Intima-media Thickness. *Epidemiology*, 23(3), 486–494. <https://doi.org/10.1097/EDE.0b013e31824e613e>
- Totlandsdal, A. I., Cassee, F. R., Schwarze, P., Refsnes, M., & Låg, M. (2010). Diesel exhaust particles induce CYP1A1 and pro-inflammatory responses via differential pathways in human bronchial epithelial cells. *Particle and Fibre Toxicology*, 7(1), 41. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-7-41>
- Upadhyay, S., & Palmberg, L. (2018). Air-Liquid Interface : Relevant In Vitro Models for Investigating Air Pollutant-Induced Pulmonary Toxicity. *Toxicological Sciences*, 164(1), 21–30. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfy053>
- Valavanidis, A., Vlachogianni, T., Fiotakis, K., & Loridas, S. (2013). Pulmonary Oxidative Stress, Inflammation and Cancer : Respirable Particulate Matter, Fibrous Dusts and Ozone as Major Causes of Lung Carcinogenesis through Reactive Oxygen Species Mechanisms. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 10(9), 3886–3907. <https://doi.org/10.3390/ijerph10093886>
- Van Lommel, A., Bollé, T., Fannes, W., & Lauweryns, J. M. (1999). The Pulmonary Neuroendocrine System : The Past Decade. *Archives of Histology and Cytology*, 62(1), 1–16. <https://doi.org/10.1679/aohc.62.1>
- van Hulst, M., de Klerk, W. P. C., Langenberg, J. P., Tuinman, I. L., & Alblas, M. J. (2013, mai 27). *The effects of smoke and grenades on human lung cells and bacteria for toxicity screening purposes*. 39th International Pyrotechnic Seminar, Valencia, Spain.
- van Hulst, M., Langenberg, J. P., de Klerk, W. P. C., & Alblas, M. J. (2017). Acute Toxicity Resulting from Human Exposures to Military Smokes. *Propellants, Explosives, Pyrotechnics*, 42(1), 17–23. <https://doi.org/10.1002/prep.201600223>
- Varga, G. (2020). Changing nature of Saharan dust deposition in the Carpathian Basin (Central Europe) : 40 years of identified North African dust events (1979–2018). *Environment International*, 139, 105712. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.105712>
- Vattanasit, U., Navasumrit, P., Khadka, M. B., Kanitwithayanun, J., Promvijit, J., Autrup, H., & Ruchirawat, M. (2014). Oxidative DNA damage and inflammatory responses in cultured human cells and in humans exposed to traffic-related particles. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 217(1), 23–33. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2013.03.002>
- Vecchi, R., Bernardoni, V., Cricchio, D., D'Alessandro, A., Fermo, P., Lucarelli, F., Nava, S., Piazzalunga, A., & Valli, G. (2008). The impact of fireworks on airborne particles. *Atmospheric Environment*, 42(6), 1121–1132. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2007.10.047>
- Verma, V., Fang, T., Xu, L., Peltier, R. E., Russell, A. G., Ng, N. L., & Weber, R. J. (2015). Organic Aerosols Associated with the Generation of Reactive Oxygen Species (ROS) by Water-Soluble PM_{2.5}. *Environmental Science & Technology*, 49(7), 4646–4656. <https://doi.org/10.1021/es505577w>
- Villar-Vidal, M., Lertxundi, A., Martínez López de Dicastillo, M. D., Alvarez, J. I., Santa Marina, L., Ayerdi, M., Basterrechea, M., & Ibarluzea, J. (2014). Air Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) associated

- with PM_{2.5} in a North Cantabric coast urban environment. *Chemosphere*, 99, 233–238. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.11.006>
- Vinzens, P. S., Møller, P., Sørensen, M., Knudsen, L. E., Hertel, O., Jensen, F. P., Schibye, B., & Loft, S. (2005). Personal Exposure to Ultrafine Particles and Oxidative DNA Damage. *Environmental Health Perspectives*, 113(11), 1485–1490. <https://doi.org/10.1289/ehp.7562>
- Visentin, M., Pagnoni, A., Sarti, E., & Pietrogrande, M. C. (2016). Urban PM_{2.5} oxidative potential : Importance of chemical species and comparison of two spectrophotometric cell-free assays. *Environmental Pollution*, 219, 72–79. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.09.047>
- Voie, Ø., Borander, A.-K., Sikkeland, L. I. B., Grahnstedt, S., Johnsen, A., Danielsen, T. E., Longva, K., & Kongerud, J. (2014). Health effects after firing small arms comparing leaded and unleaded ammunition. *Inhalation Toxicology*, 26(14), 873–879. <https://doi.org/10.3109/08958378.2014.970783>
- Wang, C.-S. (2005). Chapter 10 : Fate of deposited particles. In *Inhaled particles* (Vol. 5).
- Wang, H., Shen, X., Liu, J., Wu, C., Gao, J., Zhang, Z., Zhang, F., Ding, W., & Lu, Z. (2019). The effect of exposure time and concentration of airborne PM_{2.5} on lung injury in mice : A transcriptome analysis. *Redox Biology*, 26, 101264. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101264>
- Webster, M. J., & Tarran, R. (2018). Slippery When Wet. In *Current Topics in Membranes* (Vol. 81, p. 293–335). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.ctm.2018.08.004>
- Weichenthal, S., Crouse, D. L., Pinault, L., Godri-Pollitt, K., Lavigne, E., Evans, G., van Donkelaar, A., Martin, R. V., & Burnett, R. T. (2016). Oxidative burden of fine particulate air pollution and risk of cause-specific mortality in the Canadian Census Health and Environment Cohort (CanCHEC). *Environmental Research*, 146, 92–99. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2015.12.013>
- Whitsett, J. A. (2018). Airway Epithelial Differentiation and Mucociliary Clearance. *Annals of the American Thoracic Society*, 15(Supplement_3), S143–S148. <https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.201802-128AW>
- Whitsett, J. A., Wert, S. E., & Weaver, T. E. (2015). Diseases of Pulmonary Surfactant Homeostasis. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 10(1), 371–393. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-012513-104644>
- Williams, L. J., Chen, L., & Zosky, G. R. (2017). The respiratory health effects of geogenic (earth derived) PM₁₀. *Inhalation Toxicology*, 29(8), 342–355. <https://doi.org/10.1080/08958378.2017.1367054>
- Wingfors, H., Svensson, K., Hägglund, L., Hedenstierna, S., & Magnusson, R. (2014). Emission Factors for Gases and Particle-Bound Substances Produced by Firing Lead-Free Small-Caliber Ammunition. *Journal of Occupational and Environmental Hygiene*, 11(5), 282–291. <https://doi.org/10.1080/15459624.2013.858821>
- Wu, Z., Shi, P., Lim, H. K., Ma, Y., Setyawati, M. I., Bitounis, D., Demokritou, P., Ng, K. W., & Tay, C. Y. (2020). Inflammation Increases Susceptibility of Human Small Airway Epithelial Cells to Pneumonic Nanotoxicity. *Small*, 16(21), 2000963. <https://doi.org/10.1002/sml.202000963>
- Xiao, G. G., Wang, M., Li, N., Loo, J. A., & Nel, A. E. (2003). Use of Proteomics to Demonstrate a Hierarchical Oxidative Stress Response to Diesel Exhaust Particle Chemicals in a Macrophage Cell Line. *Journal of Biological Chemistry*, 278(50), 50781–50790. <https://doi.org/10.1074/jbc.M306423200>
- Xie, F., & Xie, L. (2018). Serum zinc level is associated with liver dysfunction caused by white smoke inhalation. *Gastroenterology Report*, 6(4), 304–307. <https://doi.org/10.1093/gastro/goy008>
- Xu, F., Shi, X., Qiu, X., Jiang, X., Fang, Y., Wang, J., Hu, D., & Zhu, T. (2020). Investigation of the chemical components of ambient fine particulate matter (PM_{2.5}) associated with in vitro cellular responses to oxidative stress and inflammation. *Environment International*, 136, 105475. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.105475>
- Xu, M., Halimu, G., Zhang, Q., Song, Y., Fu, X., Li, Y., Li, Y., & Zhang, H. (2019). Internalization and toxicity : A preliminary study of effects of nanoplastic particles on human lung epithelial cell. *Science of The Total Environment*, 694, 133794. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.133794>
- Yadav, S. K., Kumar, M., Sharma, Y., Shukla, P., Singh, R. S., & Banerjee, T. (2019). Temporal evolution of submicron particles during extreme fireworks. *Environmental Monitoring and Assessment*, 191(9), 576. <https://doi.org/10.1007/s10661-019-7735-2>
- Yadav, S., Kumbhar, N., Jan, R., Roy, R., & Satsangi, P. G. (2019). Genotoxic effects of PM₁₀ and PM_{2.5} bound metals : Metal bioaccessibility, free radical generation, and role of iron. *Environmental Geochemistry and Health*, 41(3), 1163–1186. <https://doi.org/10.1007/s10653-018-0199-4>
- Yang, A., Janssen, N. A. H., Brunekreef, B., Cassee, F. R., Hoek, G., & Gehring, U. (2016). Children's respiratory health and oxidative potential of PM_{2.5} : The PIAMA birth cohort study. *Occupational and Environmental Medicine*, 73(3), 154–160. <https://doi.org/10.1136/oemed-2015-103175>

- Yao, L., Wang, D., Fu, Q., Qiao, L., Wang, H., Li, L., Sun, W., Li, Q., Wang, L., Yang, X., Zhao, Z., Kan, H., Xian, A., Wang, G., Xiao, H., & Chen, J. (2019a). The effects of firework regulation on air quality and public health during the Chinese Spring Festival from 2013 to 2017 in a Chinese megacity. *Environment International*, 126, 96–106. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.01.037>
- Yao, L., Wang, D., Fu, Q., Qiao, L., Wang, H., Li, L., Sun, W., Li, Q., Wang, L., Yang, X., Zhao, Z., Kan, H., Xian, A., Wang, G., Xiao, H., & Chen, J. (2019b). The effects of firework regulation on air quality and public health during the Chinese Spring Festival from 2013 to 2017 in a Chinese megacity. *Environment International*, 126, 96–106. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.01.037>
- Yerramsetti, V. S., Sharma, A. R., Gauravarapu Navlur, N., Rapolu, V., Dhulipala, N. S. K. C., & Sinha, P. R. (2013). The impact assessment of Diwali fireworks emissions on the air quality of a tropical urban site, Hyderabad, India, during three consecutive years. *Environmental Monitoring and Assessment*, 185(9), 7309–7325. <https://doi.org/10.1007/s10661-013-3102-x>
- Yu, T., Zhang, X., Zhong, L., Cui, Q., Hu, X., Li, B., Wang, Z., Dai, Y., Zheng, Y., & Bin, P. (2017). The use of a 0.20 µm particulate matter filter decreases cytotoxicity in lung epithelial cells following air-liquid interface exposure to motorcycle exhaust. *Environmental Pollution*, 227, 287–295. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.04.080>
- 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. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(6), 2124. <https://doi.org/10.3390/ijerph17062124>
- Zhang, H., Liu, H., Davies, K. J. A., Sioutas, C., Finch, C. E., Morgan, T. E., & Forman, H. J. (2012). Nrf2-regulated phase II enzymes are induced by chronic ambient nanoparticle exposure in young mice with age-related impairments. *Free Radical Biology and Medicine*, 52(9), 2038–2046. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.02.042>
- Zhang, W., Li, Q., Tang, M., Zhang, H., Sun, X., Zou, S., Jensen, J. L., Liou, T. G., & Zhou, A. (2019). A multi-scale approach to study biochemical and biophysical aspects of resveratrol on diesel exhaust particle-human primary lung cell interaction. *Scientific Reports*, 9(1), 18178. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54552-w>
- Zhang, W., Lu, Z., Xu, Y., Wang, C., Gu, Y., Xu, H., & Streets, D. G. (2018). Black carbon emissions from biomass and coal in rural China. *Atmospheric Environment*, 176, 158–170. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2017.12.029>
- Zhang, Y., Cai, J., Wang, S., He, K., & Zheng, M. (2017). Review of receptor-based source apportionment research of fine particulate matter and its challenges in China. *Science of The Total Environment*, 586, 917–929. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.02.071>
- Zhao, C., Wang, Y., Su, Z., Pu, W., Niu, M., Song, S., Wei, L., Ding, Y., Xu, L., Tian, M., & Wang, H. (2020). Respiratory exposure to PM2.5 soluble extract disrupts mucosal barrier function and promotes the development of experimental asthma. *Science of The Total Environment*, 730, 139145. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139145>
- Zhao, J., Lewinski, N., & Riediker, M. (2015). Physico-Chemical Characterization and Oxidative Reactivity Evaluation of Aged Brake Wear Particles. *Aerosol Science and Technology*, 49(2), 65–74. <https://doi.org/10.1080/02786826.2014.998363>
- Zheng, F., Gonçalves, F. M., Abiko, Y., Li, H., Kumagai, Y., & Aschner, M. (2020). Redox toxicology of environmental chemicals causing oxidative stress. *Redox Biology*, 34, 101475. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101475>
- Zielinski, H., Mudway, I. S., Bérubé, K. A., Murphy, S., Richards, R., & Kelly, F. J. (1999). Modeling the interactions of particulates with epithelial lining fluid antioxidants. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 277(4), L719–L726. <https://doi.org/10.1152/ajplung.1999.277.4.L719>

ABSTRACT

Pyrotechnic smokes are widely used in the military field. Their combustion generates particles with complex physicochemical properties that might cause toxic effects. Although respiratory damages have been described after inhalation of smoke aerosols in humans and animals, very few studies have focused on the toxicity of the particulate fraction and even less on the cellular mechanisms potentially involved.

This work aimed to explore the *in vitro* toxicity of particles from a red signaling smoke (RSS), an anti-intrusion smoke (AIS) and an hexachloroethane-based obscuring smoke (HC-OS). In order, to be closer of a physiological airway epithelium, we used models of primary normal human bronchial epithelial cell (NHBE) and small airway epithelial cells (SAEC) cultured at the air-liquid interface (ALI). ALI culture of NHBE cells allowed working with a mucociliary pseudo-stratified.

The results from the physicochemical characterization showed that particles can be classified as fine to ultrafine particles and exhibited variable chemical compositions in terms of metals and organic compounds. All the particles have an oxidative potential, highlighted by the depletions of ascorbic acid and dithiothreitol, with specificities of response depending on the particle type. No cytotoxic effect was measured after acute (24h) or repeated (4 x 16h) exposures to the different particles and for the two cell models. Changes in antioxidant and inflammatory markers were observed after acute particles exposure in SAEC model. The study of acute toxicity on the NHBE model was characterized by the induction of oxidative stress, internalization of particles and cuboic changes of the airway epithelium by RSS particles while few effects were observed with HC-OS particles. Surprisingly, repeated exposures to RSS particles on the NHBE model did not induce oxidative stress, although epithelial airway remodeling was observed.

In conclusion, this work highlights the need to further investigate on smoke particle toxicity in order to establish exposure guidelines in the scope of military professional exposures.

Keywords: Pyrotechnic smokes, particles, oxidative potential, *in vitro* toxicity, primary cells cultured at air-liquide interface, oxidative stress

RÉSUMÉ

Les fumigènes s'inscrivent dans le cadre des activités pyrotechniques et sont très utilisés dans le domaine militaire. Or, la combustion de fumigènes génère des particules aux propriétés physicochimiques complexes susceptibles de causer des effets toxiques. Si des atteintes respiratoires ont été décrites après inhalation d'aérosols de fumigènes chez l'homme et l'animal, très peu d'études se sont intéressées à la toxicité par inhalation de la fraction particulaire uniquement et moins encore aux mécanismes cellulaires potentiellement impliqués.

Ainsi, l'objectif général de ce travail a été d'évaluer la toxicité respiratoire de particules issues de la combustion de fumigènes par des approches *in vitro* impliquant l'utilisation de modèles de cellules primaires épithéliales trachéo-bronchiques (NHBE) et bronchiolaires (SAEC) cultivés à l'interface air liquide (IAL), représentatifs de l'épithélium respiratoire. La culture à l'IAL du modèle NHBE a permis de travailler sur un épithélium pseudo-stratifié mucociliaire. Nous avons étudié la fraction particulaire d'un fumigène de signalisation de couleur rouge (RSS), d'un fumigène anti-intrusion (AIS) et d'un fumigène de camouflage à base d'hexachloroéthane (HC-OS), principalement utilisés dans un cadre militaire.

Les résultats de la caractérisation physicochimiques des particules montrent qu'elles peuvent être classées comme particules fines à ultrafines et qu'elles présentent des compositions chimiques variables, en termes de métaux et de composés organiques. Toutes les particules possèdent un potentiel oxydant, mis en évidence par les déplétions de l'acide ascorbique et du dithiothréitol, avec des spécificités de réponses dépendantes du type de particules. Aucun effet cytotoxique n'a été mesuré après expositions aiguës (24h) ou répétées (4 x 16h), aux différentes particules et pour les deux modèles cellulaires. Des modifications de marqueurs antioxydants et inflammatoires ont été observés après exposition aiguë aux particules sur le modèle SAEC. La toxicité aiguë sur le modèle NHBE est caractérisée par l'induction d'un stress oxydant, d'une internalisation des particules et de changements morphologiques cubiques de l'épithélium après expositions aux particules RSS alors que peu d'effets sont observés avec les particules HC-OS. Étonnement, les expositions répétées aux particules RSS sur le modèle NHBE n'a pas induit de stress oxydant alors qu'un remodelage de l'épithélium a été visible.

En conclusion, l'ensemble de ces résultats met en évidence la nécessité de poursuivre les recherches sur les effets toxiques de la fraction particulaire des fumigènes, afin d'améliorer la réglementation et de permettre d'établir des limites d'expositions notamment dans le cadre professionnel militaire.

Mots clés : fumigènes, particules, potentiel oxydant, toxicité *in vitro*, cultures primaires cultivées à l'interface air-liquide, stress oxydant