



HAL
open science

Impacts de la pollution atmosphérique sur le phénotype pulmonaire de la mucoviscidose : étude expérimentale sur deux modèles précliniques

Marion Blayac

► **To cite this version:**

Marion Blayac. Impacts de la pollution atmosphérique sur le phénotype pulmonaire de la mucoviscidose : étude expérimentale sur deux modèles précliniques. Médecine humaine et pathologie. Université Paris-Est Créteil Val-de-Marne - Paris 12, 2022. Français. NNT : 2022PA120045 . tel-04390085

HAL Id: tel-04390085

<https://theses.hal.science/tel-04390085>

Submitted on 12 Jan 2024

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 de DOCTORAT

UNIVERSITÉ PARIS-EST CRÉTEIL

École Doctorale Sciences de la Vie et de la Santé

Spécialité Pathologie et Recherche clinique

Impacts de la pollution atmosphérique sur le phénotype pulmonaire de la mucoviscidose : étude expérimentale sur deux modèles précliniques

présentée et soutenue par

Marion BLAYAC

le 7 Décembre 2022

Directeurs de thèse : **Dr. Sophie LANONE** et **Pr. Patrice COLL**

Membres du jury

Mme. Harriet CORVOL, PU-PH, Sorbonne Université

M. Guillaume GARÇON, Professeur, Université de Lille

Mme. Carole PLANÈS, PU-PH, Université Sorbonne Paris Nord

M. Abdelwahid MELLOUKI, DR, CNRS

Mme. Sophie LANONE, DR, INSERM

M. Patrice COLL, Professeur, Université Paris Cité

Rapportrice

Rapporteur

Examinatrice

Examineur

Directrice de thèse

Co-directeur de thèse

Résumé

La mucoviscidose est une maladie génétique due à une mutation du gène CFTR qui code pour un canal chlorure épithélial. La pathologie se caractérise par une diminution progressive de la fonction respiratoire qui conditionne l'essentiel de la morbidité et de la mortalité de la maladie. Il existe une grande diversité génétique des patients qui s'accompagne d'une grande variabilité phénotypique, ceci même entre des individus présentant les mêmes mutations. Cela laisse supposer la mise en jeu d'autres facteurs d'origine génétique ou environnementale. Parmi les pistes évoquées, le rôle de la pollution atmosphérique nous a paru intéressant à considérer, celle-ci représentant le risque environnemental le plus important pour la santé. L'objectif de cette thèse était d'étudier par une approche expérimentale les effets de la pollution atmosphérique sur le phénotype pulmonaire de la mucoviscidose chez deux modèles murins dédiés. Pour cela, j'ai utilisé la chambre de simulation atmosphérique CESAM permettant de simuler au laboratoire des atmosphères multiphasiques réalistes. Cette chambre est couplée à des isolateurs permettant l'exposition d'organismes vivants aux atmosphères simulées. Nous avons ainsi simulé différents types d'atmosphères urbaines de niveau de pollution différents, représentatives des villes de Paris et de Pékin en été et en hiver, auxquelles nous avons exposé les modèles murins pendant 18H et 72H. Les effets biologiques ont ensuite été caractérisés par l'étude des structures et de la fonction pulmonaires, de la production de mucus et de la réponse inflammatoire et oxydative. Une exposition aux différentes atmosphères semblerait ainsi entraîner une stimulation de la sécrétion de mucus associée à une augmentation de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, du stress oxydant et de l'expression de protéases pulmonaires. Les effets observés étaient plus importants chez les souris atteintes de mucoviscidose par rapport aux souris saines, le type de réponse dépendant de la composition chimique de l'atmosphère considérée. Suite à ces constats, la pollution atmosphérique est donc fortement suspectée de contribuer à la physiopathologie de la mucoviscidose en augmentant la sévérité de la maladie.

Abstract

Cystic Fibrosis (CF) is a genetic disease due to a mutation of the CFTR gene encoding for an epithelial chloride channel. The disease is characterized by a progressive loss of respiratory function responsible for most of the morbidity and mortality of the disease. CF patients show an important genotypic variability along with a great phenotypic diversity between patients with the same mutations. This suggests the implication of other factors, either genetic or environmental. Among these factors, one that is of interest is air pollution, indeed representing the most important environmental risk for health. The objective of this thesis was to study, using an experimental approach, the effects of air pollution on CF pulmonary phenotype in two dedicated murine models. I used CESAM atmospheric simulation chamber to simulate at the laboratory multiphasic realistic atmospheres. This chamber is coupled to mice isolators allowing to expose living organisms to the simulated atmospheres. We simulated different types of urban atmospheres, with different levels of air pollutants, representative of Paris and Beijing atmospheres in summer and winter conditions. Mice were exposed to these atmospheres for 18H and 72H. Biological effects were then characterized by studying lung structure and function, mucus production as well as inflammatory and oxidative response. Exposure to urban atmospheres tended to stimulate mucus secretion and increased inflammatory biomarkers, oxidative stress, and expression of pulmonary proteinases. The effects were more important in CF mice compared to healthy mice and the type of response induced depended on the chemical composition of the considered atmosphere. Based on these effects, air pollution is highly suspected to contribute to CF physiopathology by increasing the severity of the disease.

Remerciements

Cette thèse marque l'aboutissement de 3 ans et demi de travail. Je souhaite ainsi remercier toutes les personnes que j'ai pu rencontrer et qui ont contribué, de près ou de loin par leur aide et leur implication, à la réalisation et au bon déroulé de cette thèse.

Tout d'abord, je souhaite remercier les Professeurs Carole PLANÈS, Harriet CORVOL, Guillaume GARÇON ainsi que le Docteur Abdelwahid MELLOUKI d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse et d'évaluer mon travail. Je souhaite également remercier les membres de mon comité de thèse, la Professeure Armelle BAEZA et le Docteur Loïc GUILLOT, pour leur bienveillance et leurs conseils.

Je souhaiterais remercier le DIM Qi², réseau de recherche sur la qualité de l'air en région Ile-de-France, d'avoir financé le projet dès mon stage de Master 2 puis lors de cette thèse.

Merci à mes deux directeurs de thèse Sophie LANONE et Patrice COLL. Tout d'abord, merci à Sophie de m'avoir accueillie dans l'équipe dès mon master 2 et de m'avoir ensuite permis de continuer en thèse. Je ne pourrais vous remercier suffisamment pour la confiance que vous m'avez accordée dès le début mais aussi pour l'indépendance que j'ai pu avoir sur ce projet. Merci à vous 2 de m'avoir accompagnée comme vous l'avez fait, d'avoir cru en moi et de m'avoir toujours poussée à aller plus loin dans mes réflexions. Un encadrement à votre image, dans la rigueur, mais toujours dans la détente et la convivialité et je n'aurais sincèrement pu espérer meilleur environnement de travail.

Si ce projet a pu être mené à terme c'est tout d'abord grâce à la collaboration avec le LISA. Un grand merci aux membres de l'équipe MEREIA et du Département Technique du LISA que j'ai pu côtoyer. Elie, Mathieu, Antonin, Camilo, Edouard et Aline merci pour votre implication jour et nuit lors des campagnes PolluRisk. Sans vous il n'y aurait pas pu y avoir d'exposition des souris.

Ce projet n'aurait pas non plus pu aboutir sans l'implication des personnels des plateformes de l'IMRB. A l'animalerie, merci à Alice, Florine, Marjorie et Damien d'avoir fait en sorte que

les campagnes PolluRisk se déroulent dans les meilleures conditions aussi bien pour les animaux que pour moi. A la plateforme d'imagerie et d'histologie, merci à Xavier pour sa disponibilité au moindre problème sur les microscopes mais également pour son aide dans le développement de plusieurs macros pour l'équipe. Également, merci à Wilfried et à Christelle pour la quantité de blocs inclus, lames coupées et colorées. Merci à Mathieu de la plateforme Luminex pour l'ensemble des dosages réalisés.

Merci à toute l'équipe « prélèvements » avec qui nous avons passé des journées entières de sacrifices, des journées stressantes mais toujours en musique et dans la bonne humeur. Un grand merci à tous les doctorants de vous être toujours rendus disponibles pour m'aider : Zhuyi, Vanessa, Danushki, Benjamin, Maëlle. Cette aventure doctorale s'achève pour nous tous en même temps mais on y est arrivé. Au-delà de votre aide, merci pour le soutien mutuel, les moments de vie passés au labo et en dehors du labo. Merci aux « anciens » qui ne sont plus là Pierrick, Cristina, Charlie, Alice et à ceux arrivés plus récemment Mélissa, Clément, Audrey. Merci à Rachid pour ton savoir-faire au flexivent, ton envie de transmission et pour ton aide sur l'élaboration de mon modèle de salivation. Je n'oublie pas non plus Marie-Laure qui m'a formée au labo et avec qui tout a commencé. Plus largement, merci à tous les membres de mon équipe pour leur aide et leur participation de près ou de loin dans le projet (Jeanne, Bénédicte, Pascale, Valérie, Pascal, Yuli). Enfin, merci à Julia d'avoir été une superbe gestionnaire administrative et d'avoir fait en sorte de nous faciliter la vie au quotidien.

Merci à celles avec qui j'ai eu la chance de partager mon bureau pendant ces années. Danushki, merci de m'avoir supportée en tant que voisine, cela n'a pas dû toujours être facile. Merci d'avoir été la première à rire à chacune de mes blagues. Maëlle, merci de ne pas m'avoir laissée la seule à râler dans le bureau et d'avoir toujours apporté ton optimisme quand il le fallait. Merci pour les idées de défis sportifs que tu as suscitées en moi. Une pensée à Charlie avec qui nous avons également partagé des pauses midi et des fins de journée centrées autour de questionnements totalement improbables mais finalement parfois pas si bêtes. Certains fous rires me laisseront de beaux souvenirs. Khadeeja, merci pour les échanges scientifiques et culturels enrichissants. Merci pour les échanges bilingues qui m'auront permis de travailler mon anglais et de savoir que mon humour peut s'exporter.

Un merci particulier à Céline devenue mon binôme de choc et sans qui ce projet n'aurait pas pu aller aussi loin. Merci de m'avoir suivie dans mes délires de manip démesurées et ce toujours dans la rigolade parce qu'on ne sait pas faire autrement. Merci de ton aide précieuse dans l'analyse des résultats. Merci de m'avoir épaulée, parfois rassurée et toujours encouragée.

Enfin, je souhaite remercier mon entourage. Merci à mes amis d'avoir été présents dans les moments difficiles.

Merci à ma famille que j'ai impliquée malgré elle dans cette aventure. Merci à mon frère et à mon père de m'avoir aidée à coder sous ImageJ et de m'avoir fait gagner du temps précieux durant cette dernière année. Maman, Papa, merci d'avoir été là. Merci de m'avoir soutenue dans les hauts comme dans les bas.

Sommaire

REMERCIEMENTS	I
LISTE DES ABREVIATIONS	IX
LISTE DES FIGURES	XI
LISTE DES TABLEAUX	XV
PREAMBULE	XVII
I. INTRODUCTION.....	1
1 LA MUCOVISCIDOSE.....	3
1.1 <i>Description de la maladie</i>	3
1.1.1 Nature de la maladie	3
1.1.2 Données démographiques.....	3
1.1.3 Diagnostic de la maladie.....	4
1.1.4 Mortalité.....	4
1.2 <i>Une maladie monogénique</i>	5
1.2.1 Bases génétiques de la maladie.....	5
1.2.2 Structure de la protéine CFTR.....	8
1.2.3 Fonctions physiologiques de la protéine CFTR	8
1.2.4 Atteinte fonctionnelle de CFTR dans la mucoviscidose	10
1.3 <i>Manifestations cliniques</i>	11
1.4 <i>Physiopathologie des atteintes pulmonaires de la maladie</i>	13
1.4.1 Obstruction des voies respiratoires par le mucus.....	13
1.4.2 Infections bactériennes	14
1.4.3 Inflammation chronique	15
1.5 <i>Facteurs modulateurs de la maladie</i>	17
1.5.1 Corrélation génotype/phénotype.....	17
1.5.2 Facteurs génétiques.....	18
1.5.3 Facteurs environnementaux.....	19
1.6 <i>Modèles d'étude pré-cliniques de la mucoviscidose</i>	20
2 LA POLLUTION ATMOSPHERIQUE : UN ENJEU ENVIRONNEMENTAL MAJEUR	23

2.1	<i>Qu'est-ce que la pollution atmosphérique ?</i>	23
2.1.1	Composition chimique	23
2.1.2	La pollution atmosphérique en zone urbaine et péri-urbaine	24
2.1.3	Evolution et transport des polluants	26
2.1.4	Métrologie de la qualité de l'air	29
2.1.5	Réglementation de la qualité de l'air	30
2.1.6	Niveaux de pollution mondiaux actuels	32
2.2	<i>Effets sur la santé</i>	34
2.2.1	Mortalité	34
2.2.2	Impacts sur la morbidité	37
a.	Effets respiratoires chez l'adulte	37
b.	Effets respiratoires chez l'enfant	38
c.	Autres effets systémiques	39
2.2.3	Mécanismes biologiques impliqués	41
3	IMPACTS DE LA POLLUTION ATMOSPHERIQUE SUR LE COURS DE LA MUCOVISCIDOSE	43
3.1	<i>Études épidémiologiques</i>	43
3.1.1	Études chroniques	44
3.1.2	Études aiguës	45
3.2	<i>Études expérimentales</i>	46
3.2.1	Études <i>in vivo</i>	46
3.2.2	Études <i>in vitro</i>	47
3.3	<i>Limites des études présentées</i>	49
II.	HYPOTHESE ET OBJECTIFS DE L'ETUDE	51
III.	MATERIELS ET METHODES	53
1	POLLURISK : PLATEFORME D'EXPOSITION D'ORGANISMES VIVANTS A DES ATMOSPHERES REALISTES COMPLEXES	55
1.1	<i>Chambre CESAM : simulation d'atmosphères réalistes</i>	56
1.2	<i>Atmosphères simulées</i>	57
1.3	<i>Dispositifs d'exposition des souris</i>	59
1.4	<i>Contrôle qualité de la simulation et qualification des atmosphères</i>	62
2	ÉTUDE <i>IN VIVO</i>	65
2.1	<i>Modèles animaux</i>	65
2.1.1	Lignée <i>Cftr^{tm1EUR}</i>	65
2.1.2	Lignée <i>Scnn1b-Tg</i>	65
2.1.3	Génotypage	66
2.2	<i>Campagnes d'exposition</i>	67
2.3	<i>Sacrifice</i>	68
2.3.1	Préparation de l'animal et prélèvement du sang	68
2.3.2	Réalisations des lavages bronchoalvéolaires	68
2.3.3	Prélèvement des poumons	70
3	ANALYSES HISTOLOGIQUES PULMONAIRES	72

3.1	<i>Détermination de la cellularité dans les lavages bronchoalvéolaires</i>	72
3.2	<i>Mesures histologiques</i>	73
3.2.1	Préparation des échantillons de poumons	73
3.2.2	Étude morphométrique	73
3.2.3	Quantification du mucus sécrété	74
3.3	<i>Immunofluorescence</i>	80
4	ÉTUDE DE LA FONCTION PULMONAIRE	81
5	ANALYSES BIOLOGIQUES	82
5.1	<i>Numération sanguine et prélèvement du plasma</i>	82
5.2	<i>Étude de l'expression des gènes</i>	82
5.2.1	Extraction et dosage des ARN totaux	82
5.2.2	Étude de la transcription par RT-qPCR	83
5.3	<i>Étude de l'expression des protéines</i>	85
5.3.1	Extraction et dosage des protéines	85
5.3.2	Western Blot	86
5.3.3	ELISA	87
5.3.4	Luminex	88
5.4	<i>Étude de l'activité de CFTR</i>	88
6	ANALYSES STATISTIQUES	91
IV.	RESULTATS	95
1	PARTIE 1 : EFFETS D'UNE EXPOSITION A DES ATMOSPHERES URBAINES REALISTES SUR LE MODELE <i>Scnn1b</i> -TG	99
2	PARTIE 2 : EFFETS D'UNE EXPOSITION A DES ATMOSPHERES URBAINES REALISTES SUR LE MODELE <i>Cftr^{tm1EUR}</i>	165
2.1	<i>Analyses physico-chimiques</i>	165
2.2	<i>Étude de l'expression des mucines</i>	166
2.3	<i>Analyse de la réponse inflammatoire</i>	168
2.4	<i>Analyse de marqueurs du stress oxydant</i>	171
2.5	<i>Analyse du remodelage pulmonaire</i>	173
2.6	<i>Étude la fonction pulmonaire</i>	176
2.7	<i>Analyse de l'expression génique</i>	179
2.8	<i>Étude cinétique : analyse des réponses induites après 18h et 72h d'exposition</i>	180
2.9	<i>Synthèse des effets globaux</i>	185
3	PARTIE 3 : ÉTUDE DE LA FONCTION DE CFTR – RESULTATS PRELIMINAIRES DES TESTS DE SALIVATION	191
3.1	<i>Analyse de la fonction de CFTR avant exposition à la pollution atmosphérique</i>	191
3.2	<i>Analyse de la fonction de CFTR après exposition à la pollution atmosphérique</i>	192
V.	DISCUSSION	195
1	DISCUSSION METHODOLOGIQUE	197
1.1	<i>Modèles in vivo</i>	197
1.1.1	Modèle <i>Cftr^{tm1EUR}</i>	197

1.1.2	Modèle <i>Scnn1b</i> -Tg	199
1.2	<i>Génération des atmosphères et protocole d'exposition</i>	200
1.2.1	Réalisme des simulations.....	200
1.2.2	Isolateur témoin	203
2	DISCUSSION DES RESULTATS	206
2.1	Modèle <i>Scnn1b</i> -Tg	206
2.2	Modèle <i>Cftr^{tm1EUR}</i>	206
2.3	<i>Discussion générale</i>	212
VI.	CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	217
VII.	VALORISATION DE LA THESE	225
	RÉFÉRENCES	231
VIII.	ANNEXES	269

Liste des abréviations

ACP : Analyse en Composantes Principales

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ADNc : Acide Désoxyribonucléique complémentaire

AOS : Aérosol Organique Secondaire

AP : Alkaline Phosphatase

ARN : Acide Ribonucléique

ASL : Airway Surface Liquid

BPCO : Bronchopneumopathie Chronique Obstructive

BSA : Bovine Serum Albumin

CESAM : Chambre Expérimentale de Simulation Atmosphérique Multiphasique

CF : Cystic Fibrosis

CIRC : Centre International de Recherche sur le Cancer

ELANE : Elastase des Neutrophiles

EP3 : Plateforme Expérimentation Physiologique et Physio-Pathologique

ERO : Espèces Réactives de l'Oxygène

HBEC : Human Bronchial Epithelial Cells

HE : Hématoxyline-Éosine

HRP : Horseradish Peroxidase

IMRB : Institut Mondor de Recherche Biomédicale

KO : Knock-out

LBA : Lavage Bronchoalvéolaire

LDH : Lactate Déshydrogénase

LISA : Laboratoire Interuniversitaire des Systèmes atmosphériques

MGG : May-Grünwald Giemsa

MLI : Mean Linear Intercept

MMP : Métalloprotéase Matricielle

MPO : Myéloperoxydase

NETs : Neutrophil Extracellular Traps

NP : Nanoparticules

NBD : Nucleotide Binding Domain

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PAS : Periodic Acid Schiff

PBS : Phosphate Buffered Saline

PCL : Periciliary Layer

PM : Particulate Matter

ppb : Parts-Per-Billion

ppm : Parts-Per-Million

PUF : Particules UltraFines

TAAM : Typage et Archivage d'Animaux modèles

TBST : Tris-Buffered Saline Tween

TMD : Transmembrane Domain

VEMS : Volume Expiratoire Maximal Seconde

WT : Wild-Type

Liste des Figures

Figure 1 Gène <i>Cftr</i> et structure de la protéine	6
Figure 2 Classification des mutations du gène <i>Cftr</i>	7
Figure 3 Mécanisme moléculaire de fonctionnement du canal CFTR	9
Figure 4 Transports ioniques et mouvement d'eau dans un épithélium respiratoire sain et dans un épithélium respiratoire atteint de mucoviscidose	10
Figure 5 Manifestations cliniques de la mucoviscidose	12
Figure 6 Triade constituée par l'obstruction, l'infection et l'inflammation dans la mucoviscidose	13
Figure 7 Mécanismes physiopathologiques impliqués dans de la mucoviscidose	14
Figure 8 Formation de l'ozone troposphérique	27
Figure 9 Distribution granulométrique des particules et formation des AOS résultant de processus d'oxydation photochimiques	28
Figure 10 Production et diffusion des données de Qualité de l'Air	30
Figure 11 Part de la population européenne vivant dans des lieux excédant les normes UE et les recommandations OMS relatives à la qualité de l'air	33
Figure 12 Cartes des concentrations moyennes annuelles de PM _{2.5} en 2019 et de la proportion de la population utilisant des combustibles fossiles à domicile	34
Figure 13 Taux de mortalité attribuables à la pollution atmosphérique totale chez les adultes et chez les nouveau-nés	36
Figure 14 Dépôt des particules dans l'appareil respiratoire en fonction de leur taille	41
Figure 15 Effets biologiques des polluants dans des cellules épithéliales bronchiques humaines CF et non-CF	49
Figure 16 Vue globale de la plateforme PolluRisk	55
Figure 17 Schéma expérimental de la plateforme PolluRisk dédiée à l'exposition d'organismes vivants à des atmosphères réalistes	56
Figure 18 Introduction des souris dans les isolateurs sous PSM	60

Figure 19 Ligne de transfert de l'atmosphère entre CESAM et l'isolateur exposé	61
Figure 20 Circulation d'air dans les isolateurs	61
Figure 21 Collecteur (manifold) pour l'échantillonnage de l'atmosphère dans les compartiments CESAM, isolateur exposé et isolateur témoin.....	64
Figure 22 Résultats de génotypage.....	67
Figure 23 Réalisation du LBA chez la souris.....	70
Figure 24 Prélèvement des poumons et devenir des différents lobes.....	71
Figure 25 Photographie de LBA et identification des différentes populations cellulaires.....	73
Figure 26 Méthode de détermination du MLI.....	74
Figure 27 Quantification du marquage PAS sur scan de LBA.....	76
Figure 28 Quantification du marquage PAS sur coupe entière de poumon	79
Figure 29 Machine flexiVent TM et branchement de la souris sous respirateur	82
Figure 30 Test de sécrétion salivaire chez la souris	89
Figure 31 Composition chimique des atmosphères urbaines simulées auxquelles ont été exposées les souris de la lignée <i>Cftr^{tm1EUR}</i>	166
Figure 32 Expression des mucines dans les poumons de souris WT et <i>Cftr^{tm1EUR}</i> exposées à différents types d'atmosphères urbaines	167
Figure 33 Analyse de la cellularité des lavages bronchoalvéolaires de souris WT et <i>Cftr^{tm1EUR}</i> exposées à différents types d'atmosphères urbaines	169
Figure 34 Profil de sécrétion cytokinique de souris WT et <i>Cftr^{tm1EUR}</i> exposées à différents types d'atmosphères urbaines	171
Figure 35 Mesure de marqueurs du stress oxydant chez des souris exposées à des différents types d'atmosphères urbaines.....	172
Figure 36 Analyse morphométrique réalisée chez des souris exposées à différents types d'atmosphères urbaines	174
Figure 37 Analyse de l'expression de protéases impliquées dans le remodelage pulmonaire à la suite d'une exposition à différents types d'atmosphère urbaines.....	175
Figure 38 Étude de la fonction pulmonaire chez des souris exposées à différents types d'atmosphères urbaines	177
Figure 39 Courbes de pression-volume tracées chez des souris WT et <i>Cftr^{tm1EUR}</i> exposées à une atmosphère contrôle et exposées aux atmosphères Paris-S, Beijing-S ₂ et Beijing-S ₃	178
Figure 40 Profil d'expression génique de souris WT et <i>Cftr^{tm1EUR}</i> exposées à différents types d'atmosphères urbaines réalistes	180

Figure 41 Expression des mucines dans les poumons de souris WT et <i>Cftr^{tm1EUR}</i> exposées à l'atmosphère Beijing-W ₁ pendant 18H et 72H	181
Figure 42 Effets d'une exposition de 18H et 72H à l'atmosphère Beijing-W ₁ sur l'inflammation pulmonaire et le stress oxydant	183
Figure 43 Analyse morphométrique et expression d'acteurs du remodelage pulmonaire chez des souris exposées 18H et 72H à l'atmosphère Beijing-W ₁	184
Figure 44 Profil d'expression génique de souris WT et <i>Cftr^{tm1EUR}</i> exposées pendant 18H et 72H à l'atmosphère Beijing-W ₁	185
Figure 45 Synthèse des effets observés chez des souris WT et <i>Cftr^{tm1EUR}</i> à la suite d'une exposition à des atmosphères urbaines réalistes	187
Figure 46 Synthèse des effets observés chez des souris WT et <i>Cftr^{tm1EUR}</i> à la suite d'une exposition de 18H et 72H à l'atmosphère Beijing-W ₁	189
Figure 47 Evaluation de l'activité de CFTR grâce au test de salivation	192
Figure 48 Mesure longitudinale de l'activité de CFTR à l'aide du test de salivation réalisé avant et après exposition à des atmosphères urbaines	193
Figure 49 Production d'ozone en fonction des concentrations de composés organiques volatils (COV) et d'oxydes d'azote (NO _x)	202
Figure 50 Composition chimique de l'atmosphère de l'isolateur témoin au cours des différentes campagnes réalisées	205
Figure 51 Histologie de souris témoins	208
Figure 52 Photographies de LBA de souris témoins exposées à l'atmosphère contrôle de la campagne Beijing-W ₁	208

N.B. : Toutes les figures non référencées ont été réalisées par mes soins à l'aide du site BioRender et de powerpoint.

Liste des Tableaux

Tableau 1 Valeurs limites européennes et recommandations de l’OMS relatives à la qualité de l’air.	31
Tableau 2 Résumé des associations significatives trouvées dans les études épidémiologiques	44
Tableau 3 Composition chimique et concentrations cibles des polluants des atmosphères simulées.	59
Tableau 4 Parc analytique de la plateforme PolluRisk pour la caractérisation physico-chimique des atmosphères générées.	63
Tableau 5 Séquence des amorces utilisées pour le génotypage des deux lignées.	66
Tableau 6 Récapitulatif des campagnes d’exposition PolluRisk réalisées.	68
Tableau 7 Séquences des amorces des gènes étudiés par RT-qPCR	83
Tableau 8 Liste des protéines étudiées en western blot et anticorps utilisés	87
Tableau 9 Liste des paramètres considérés dans chaque groupe biologique étudié.	91

Préambule

La mucoviscidose est une maladie génétique due à la mutation du gène *CFTR*. Cette maladie se caractérise par une atteinte des systèmes digestif et respiratoire majoritairement. Dans le cadre de ma problématique de thèse, je me suis intéressée uniquement à l'appareil respiratoire. En effet, l'atteinte broncho-pulmonaire conditionne aujourd'hui l'essentiel de la morbidité et de la mortalité de la mucoviscidose. De plus, il existe une importante variabilité de l'expression pulmonaire de la maladie chez des patients présentant les mêmes mutations. Si cette variabilité phénotypique commence à être étayée par l'influence de facteurs génétiques, l'influence de facteurs environnementaux reste à ce jour encore peu documentée. Ainsi, le présent travail de recherche a été motivé par ce besoin de compréhension de la variabilité phénotypique pulmonaire observée chez les patients atteints de mucoviscidose.

La pollution atmosphérique constitue à ce jour le facteur de risque environnemental le plus important pour la santé des individus, aussi bien des populations saines que des populations plus vulnérables. La pollution atmosphérique est ainsi suspectée de pouvoir influencer la survenue et le cours de maladies respiratoires telles que l'asthme et la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO). Pourtant, dans un contexte de mucoviscidose les effets de la pollution atmosphérique ne sont pas bien décrits. L'objectif de ce projet de thèse était donc d'étudier les effets d'une exposition à une pollution atmosphérique de nature urbaine chez deux modèles murins pré-cliniques de mucoviscidose en se focalisant sur les effets engendrés au niveau pulmonaire. Pour cela, nous avons fait le choix d'utiliser une chambre de simulation atmosphérique permettant de simuler des atmosphères réalistes auxquelles ont pu être exposés nos deux modèles pré-cliniques.

Le présent mémoire rend compte de mon travail de thèse dont le sujet portait sur les « Impacts de la pollution atmosphérique sur le phénotype pulmonaire de la mucoviscidose : étude expérimentale sur deux modèles pré-cliniques ». Cette thèse s'est déroulée sous la direction de Sophie LANONE et la co-direction de Patrice COLL au sein de l'équipe

Interactions génétique-environnement dans la BPCO, la mucoviscidose et autres (rares) pathologies respiratoires de l'Institut Mondor de Recherche Biomédicale situé à la Faculté de Santé de Créteil et en collaboration avec le Laboratoire Interuniversitaire des Systèmes Atmosphériques situé à Créteil. Cette thèse a bénéficié d'un financement de la part du DIM Qi², réseau de recherche sur la qualité de l'air en région Ile-de-France, et constitue la continuité d'un travail que j'ai débuté au laboratoire en Master 2.

CHAPITRE I

I. Introduction

1 La mucoviscidose

1.1 Description de la maladie

1.1.1 Nature de la maladie

La mucoviscidose, littéralement « maladie des mucus visqueux » ou fibrose kystique dans les pays anglo-saxons (CF pour *Cystic Fibrosis*), est une maladie génétique, d'évolution chronique et progressive, affectant les épithéliums respiratoires et digestifs principalement. La première description moderne de cette maladie remonte à 1938 par Dorothy Hansine Andersen (1). Cette maladie, due à une mutation du gène *CFTR* (Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator) qui code pour un canal chlorure s'exprimant dans de nombreuses cellules épithéliales, se caractérise par une atteinte multi-organes et plus particulièrement par une obstruction des appareils respiratoires et digestifs responsable de l'essentiel de la mortalité des individus atteints.

1.1.2 Données démographiques

Dans le monde, plus de 80 000 personnes en sont atteints. En 2020, plus de 30 000 malades ont été dénombrés aux Etats-Unis (2), plus de 4 300 au Canada (3) et plus de 52 000 en Europe (4), le Royaume-Uni et la France étant les deux pays comptant le plus de malades avec environ 10 000 et 7 000 patients recensés respectivement (5,6). Il s'agit de la maladie génétique la plus fréquente dans les populations caucasiennes alors qu'elle est très rare dans les populations africaines et asiatiques. La prévalence de la maladie à la naissance varie en effet selon l'origine ethnique des individus. Avec une incidence moyenne d'environ 1:4 500 dans toute l'Europe mais une incidence maximale en Irlande et au Royaume-Uni (un nouveau cas pour 1 300 naissances et un nouveau cas pour près de 2 300 naissances respectivement), la mucoviscidose est plus fréquente en Europe de l'ouest que dans le nord de l'Europe où l'incidence la plus faible est en Finlande avec un cas pour 25 000 naissances (7). En Amérique du Nord, la maladie concerne 1 naissance sur 2 900 chez les Blancs Américains, 1 naissance sur 4 000-20 000 chez les Hispaniques et Latino-Américains et 1 naissance sur 15 000-20 000 chez les Afro-Américains (8). Aux Etats-Unis et au Canada, les individus d'origine asiatique ne représentent qu'environ 1% des individus atteints. De même, la mucoviscidose reste très peu commune en Asie. Au Japon, elle n'affecte qu'une personne sur 350 000 (9). En Chine,

seulement soixante-dix cas de mucoviscidose ont été identifiés dans la littérature jusqu'à présent (10).

1.1.3 Diagnostic de la maladie

La mucoviscidose se caractérise par des perturbations des transports ioniques qui se traduisent physiologiquement par une sueur salée dont la concentration en sel sert, entre autres, de valeur diagnostique. Le diagnostic de la maladie est posé en suivant un tableau clinique bien précis : dosage de la trypsine immunoréactive dans le sang, réalisation d'un test de la sueur révélant une concentration de chlore élevée (> 60 mmol/L), analyse génétique afin d'identifier la ou les mutation(s) de *CFTR* mise(s) en cause et observation de caractéristiques cliniques évocatrices de la maladie (11–13).

La plupart des pays occidentaux ont mis en place un programme de dépistage néonatal systématique permettant un diagnostic de la maladie au cours de la première année de vie dans 70% des cas (2,6,14,15). De telles structures de dépistage n'existent pas dans les pays asiatiques. Ce manque de structure, combiné à un spectre de mutations beaucoup plus divers au sein des populations asiatiques pourrait rendre le diagnostic plus compliqué (16,17). De plus, toujours en comparaison aux populations caucasiennes, les patients Chinois présenteraient plutôt des formes atypiques de la maladie avec des symptômes préférentiellement pulmonaires et moins de symptômes digestifs (10). Plus difficilement identifiée, il est donc probable que la maladie soit sous-diagnostiquée. Ainsi, depuis 1975 seuls soixante-dix cas de mucoviscidose ont été identifiés en Chine (10). Ce sous-diagnostic pourrait donc expliquer l'incidence en apparence relativement faible de la maladie dans ce groupe ethnique alors qu'il n'est pas à exclure que celle-ci y soit déjà bien établie (18,19).

1.1.4 Mortalité

La mucoviscidose est une maladie létale incurable. Depuis plusieurs décennies, on observe une nette augmentation de l'espérance de vie à la naissance. Si l'âge de survie médian n'était que d'une dizaine d'années dans les années 1960 et d'une vingtaine d'années dans les années 1980, il dépasse désormais les 50 ans dans plusieurs pays (2,3,5,20). Parallèlement à l'augmentation de l'âge de survie médian, le taux de mortalité ne cesse de diminuer et l'âge médian des patients décédés ne cesse de reculer. Par exemple aux États-Unis, celui-ci était de 25.7 ans en 2003 contre 34 ans en 2020 (2), 25 ans en 2001 contre 42 ans en 2020 au Canada

(3) et 25.9 ans en 2007 contre 33 ans en France en 2020 (6). Ceci est en grande partie due aux importants progrès qui ont été effectués sur la prise en charge des patients mais aussi grâce au développement de nouvelles thérapies (21). Le diagnostic précoce de la maladie grâce au programme de dépistage néonatal systématique, et parfois même par dépistage prénatal, aide aussi à une prise en charge anticipée et un meilleur suivi des patients. Ainsi, avec cette augmentation de l'espérance de vie, la proportion de patients adultes (patients âgés de plus 18 ans) tend à s'équilibrer avec celle des patients enfants voire la surpasse : 53% de patients adultes tous pays Européens confondus (4) et environ 60% de patients adultes recensés en France, au Royaume-Uni et Canada (3,5,6). Dans les pays Européens développés, le nombre d'adultes atteints de mucoviscidose atteindrait les 70% d'ici 2025 (22), soutenant la notion que cette maladie devient de plus en plus une maladie de l'adulte.

1.2 Une maladie monogénique

1.2.1 Bases génétiques de la maladie

La mucoviscidose est une maladie génétique autosomique récessive due à une mutation d'un seul gène, le gène *CFTR*. Sa transmission suit l'hérédité mendélienne. Le gène *CFTR*, identifié en 1989 (23), est localisé sur le bras long du chromosome 7 (7q31.2) et comporte 27 exons, couvrant au total 250 kb. Une fois transcrit et épissé, l'ARNm fait 6.13 kb de long et tous les exons sont nécessaires pour la synthèse d'une protéine fonctionnelle (Figure 1).

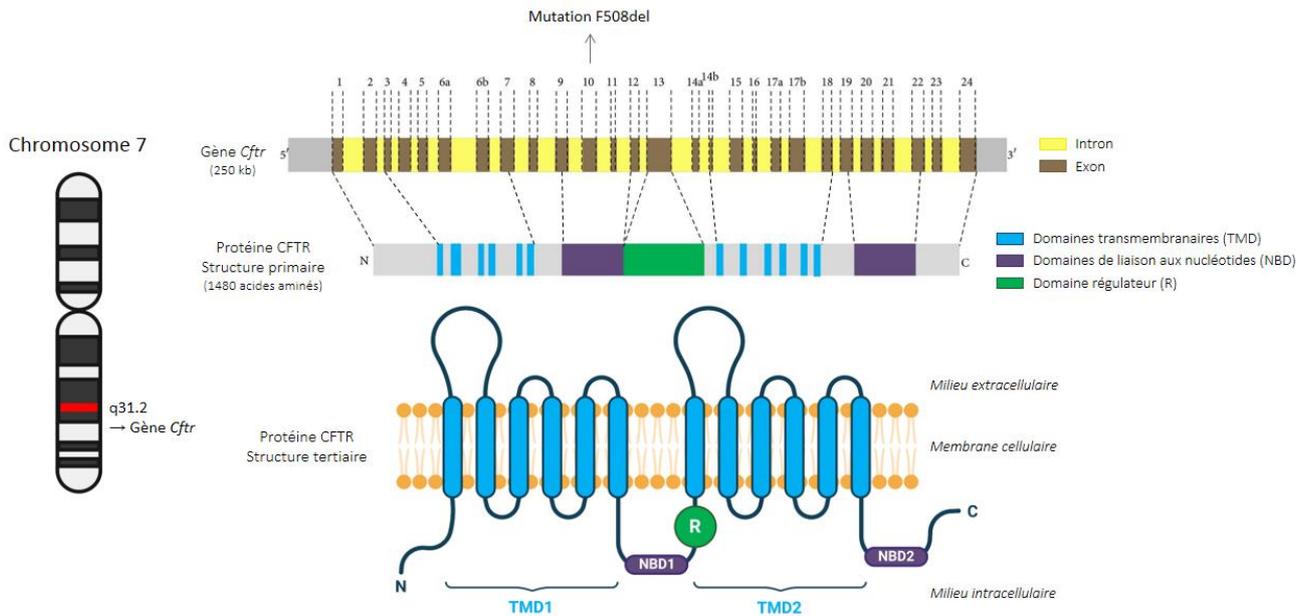


Figure 1 Gène *CFTR* et structure de la protéine. TMD1/TMD2 : domaines transmembranaires 1 et 2 ; NBD : domaine de liaison aux nucléotides ; R : région régulatrice.

Plus de 2 000 mutations du gène *CFTR* ont été identifiées à ce jour bien que toutes ne causent pas la maladie (24). Ces mutations ont été regroupées en six classes en fonction des conséquences sur la synthèse, la maturation, la fonction ou la stabilité de la protéine. En 1993, Welsh et Smith furent les premiers à décrire quatre classes de mutations sur la base de quatre mécanismes différents conduisant à la perturbation de la fonction de CFTR (25). Cette classification sert toujours de référence et a été complétée par deux nouvelles classes décrites plus tard (Figure 2). La classe I regroupe les mutations causant des codons stop prématurés. Il en résulte une absence totale de production de la protéine (26). Les mutations de classe II sont associées à un défaut de glycosylation et de repliement de la protéine qui est alors dégradée par le système ubiquitine/protéasome avant d'atteindre la membrane. Dans les mutations de classe III et IV, la protéine CFTR parvient à rejoindre la membrane mais elle n'y est pas fonctionnelle. Dans la classe III, la régulation de l'activation du canal est affectée et ne permet pas l'ouverture de celui-ci tandis que les mutants de classe IV présentent un canal CFTR défectueux avec une conductance ionique diminuée. La classe V rassemble des mutations situées sur des sites d'épissage : des ARNm corrects et incorrects sont formés, les ARNm corrects étant produits en moins grande quantité. La synthèse protéique en elle-même est normale mais la quantité de protéine fonctionnelle à la membrane se retrouve diminuée. Enfin, la classe VI est caractérisée par une durée de vie moindre de la protéine à la membrane. La protéine y est instable et son turn-over est augmenté (27).

	Normal	Classe I	Classe II	Classe III	Classe IV	Classe V	Classe VI
Description	La protéine CFTR est synthétisée, acheminée à la membrane et permet le transport de chlore et d'eau	La protéine CFTR n'est pas synthétisée	La protéine CFTR est synthétisée mais elle mal rempliée et n'est pas transportée à la membrane	La protéine CFTR est synthétisée, acheminée à la membrane mais le canal ne s'ouvre pas correctement	La protéine CFTR est synthétisée, acheminée à la membrane mais la fonction du canal est altérée	La protéine CFTR est synthétisée, acheminée à la membrane mais en quantité insuffisante	La protéine CFTR est synthétisée, acheminée à la membrane mais le canal est instable
Type de mutation	Pas de mutation	Mutation de production Non sens, déplacement du cadre de lecture	Mutation de maturation Faux sens, délétion acide aminé	Mutation de régulation Faux sens, changement acide aminé	Mutation de conduction Faux sens, changement acide aminé	Synthèse réduite Faux sens, défaut d'épissage	Instabilité membranaire Faux sens, changement acide aminé
Exemples de mutation		G542X W1282X R553X	F508del	G551D S549N	R347P R117H R334W	A455E 3849+10kbC → T 2789+5G → A	Q1412X 4279insA

Figure 2 Classification des mutations du gène *CFTR*.

Les mutations de classe II sont les plus fréquentes. Parmi celles-ci, c'est la mutation F508del correspondant à la délétion d'un seul acide aminé, la phénylalanine en position 508, qui est la plus fréquente. Elle représente à elle seule 66% de la totalité des allèles mutés dans la population mondiale (28,29). En Europe près de 90% des individus présentent au moins un exemplaire de cette mutation, la moitié environ étant homozygotes F508del/F508del (30). Les autres mutations les plus « fréquentes » ne représentent chacune pas plus de 5% des mutations totales. A titre d'exemple, les deux autres mutations les plus fréquentes, les mutations G542X (classe I) et G551D (classe III), ne représentent respectivement que 2.5% et 1.5% des mutations totales, les individus présentant ces mutations étant en général hétérozygotes avec une mutation de classe II (29,30). Toutefois, il est à noter que l'on observe une hétérogénéité dans la distribution géographique des mutations. Si la mutation F508del est de loin la plus fréquente au niveau mondial, sa prévalence varie en fonction des régions. Elle décline en effet du Nord-Ouest de l'Europe vers le Sud-Est (29,31) et n'est que de 45% en Amérique Centrale et du Sud

et de seulement 28.5% dans le Moyen-Orient (32). D'autre part, la diversité des mutations se retrouve également modifiée selon l'ethnicité des populations considérées. Le pool de mutations est ainsi plus riche dans le Sud que dans le Nord de l'Europe. De même, les populations Asiatiques semblent présenter spécifiquement une plus grande hétérogénéité mutationnelle par rapport aux populations Caucasiennes avec des mutations qui leurs sont caractéristiques et que l'on ne retrouve pas en Europe ni en Amérique du Nord (16,17,33–35).

1.2.2 Structure de la protéine CFTR

Le gène *CFTR* code pour la protéine du même nom. La protéine CFTR est constituée de 1480 acides aminés et s'exprime au pôle apical des cellules épithéliales de nombreux organes tels que les poumons, les intestins et les glandes exocrines (pancréas, glandes salivaires, glandes sudoripares). Cette protéine appartient à la superfamille des transporteurs ABC (ATP-Binding Cassette) – sous-famille C membre 7 (ABCC7) – et présente la structure classique de ces transporteurs (36) : deux domaines transmembranaires (TMD1 et TMD2), composés chacun de six hélices transmembranaires, et deux domaines de liaison des nucléotides (NBD1 et NBD2) (Figure 1). CFTR possède en plus, comme certains ABC transporteurs, une région régulatrice R, comprenant environ 240 résidus localisés entre le premier domaine de liaison des nucléotides (NB1) et le second domaine transmembranaire (TMD2) (37). Ces cinq domaines sont arrangés dans l'ordre suivant, de l'extrémité N-terminale vers l'extrémité C-terminale : TMD1-NBD1-R-TMD2-NBD2. Les domaines TMD constituent le pore du canal tandis que les domaines NBD sont impliqués dans le mécanisme de « gating » (ouverture/fermeture) du canal ; le domaine R est lui essentiel pour l'activation du canal (38).

1.2.3 Fonctions physiologiques de la protéine CFTR

Malgré les similarités structurales avec les transporteurs ABC, la protéine CFTR s'en distingue fonctionnellement car il s'agit de l'unique membre de cette famille constituant un canal ionique (39). CFTR est un canal chlorure régulé par l'AMPc. Son activité dépend de la phosphorylation de sa région régulatrice par la protéine kinase A (PKA – protéine dépendante de l'AMPc) et de la présence d'ATP intracellulaire. La phosphorylation de la région R provoque un changement de conformation qui rend possible la liaison de l'ATP à NBD1 (Figure 3). Ceci permet alors la dimérisation des domaines NBD et la fixation d'une deuxième molécule d'ATP sur le domaine NBD2 entraînant simultanément un changement de conformation des domaines

TMD conduisant à l'ouverture du canal (40). Lorsque le canal est ouvert, les ions Cl^- sont transportés à travers l'épithélium, du cytosol vers le milieu extracellulaire en suivant le gradient électrochimique. L'hydrolyse de l'ATP au domaine NBD2 induit finalement la fermeture du canal. Bien que le canal CFTR discrimine fortement les cations, son pore n'est toutefois pas très sélectif envers les petits anions monovalents comme la plupart des canaux chlorures (41). Ainsi, même si la conductance de CFTR est maximum pour le chlore, sa perméabilité n'est quant à elle pas restreinte uniquement aux ions Cl^- et n'est d'ailleurs pas maximale pour ces derniers (42). CFTR est donc capable de transporter d'autres substrats et joue un rôle important dans le transport de certains anions notamment les ions bicarbonate HCO_3^- (43,44).

La fonction de la protéine CFTR ne se limite toutefois pas qu'au transport d'ions. CFTR possède également un rôle régulateur sur le fonctionnement d'autres canaux ioniques et sur certains mécanismes de transport intracellulaire (45). Parmi les canaux ioniques régulés par CFTR, on peut citer les canaux ENaC (Epithelial Na Channel), canaux sodiques dont l'activité est inhibée par CFTR (46) et qui jouent un rôle particulièrement important dans la physiopathologie de la mucoviscidose.

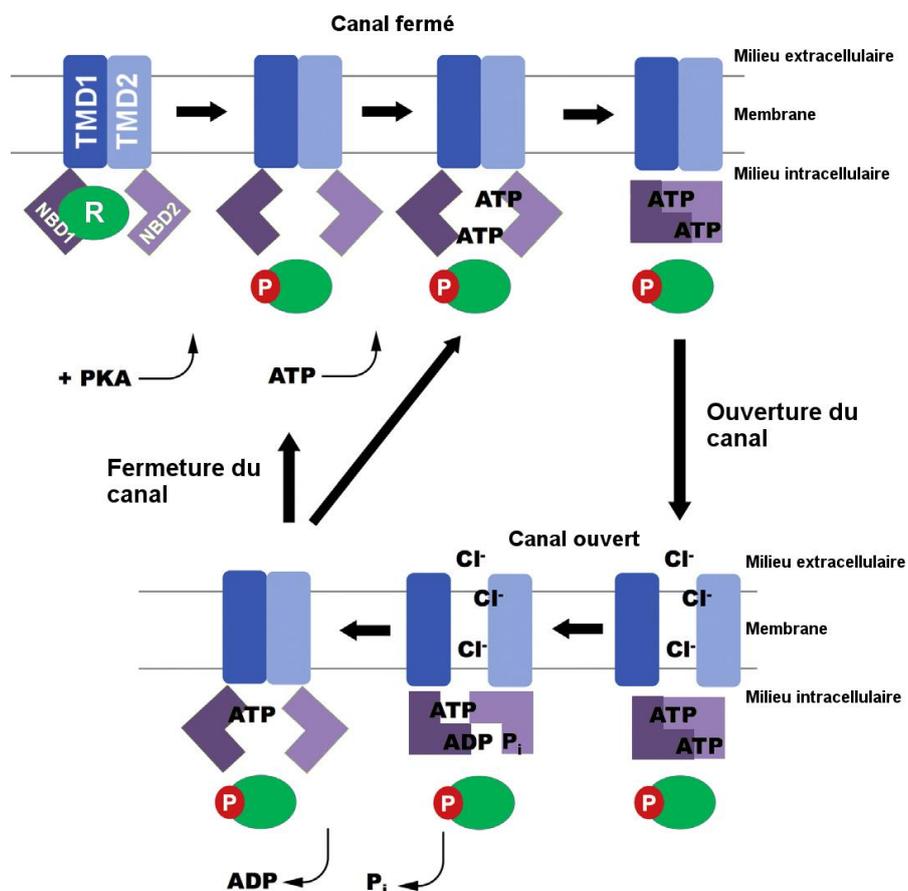


Figure 3 Mécanisme moléculaire de fonctionnement du canal CFTR (Adapté de Cant et al., 2014).

1.2.4 Atteinte fonctionnelle de CFTR dans la mucoviscidose

La mucoviscidose est surnommée « maladie des mucus visqueux ». Cette appellation prend son origine dans l'altération de la couche liquidienne présente à la surface des voies respiratoires. La surface des voies respiratoires est en effet recouverte d'un liquide appelé ASL (Airway Surface Liquid). Ce liquide de surface regroupe deux composantes : la couche périciliaire, ou PCL (Periciliary Layer), et le mucus (Figure 4). La PCL constitue la phase inférieure de l'ASL tandis que le mucus constitue la phase supérieure et se positionne au-dessus des cils. Il est sécrété par les glandes sous-muqueuses et les cellules caliciformes et est constitué de 1% de sels, 1% de macromolécules (glycoprotéines majoritairement – mucines, glycolipides) et de 98% d'eau (47). L'eau est ainsi un composant essentiel du mucus. Le niveau d'hydratation du mucus reflète l'équilibre de la balance ionique de part et d'autre de la membrane cellulaire. En conditions physiologiques, l'épithélium respiratoire assure différents transports actifs d'ions : les ions Cl^- sont sécrétés par le canal CFTR tandis que les ions Na^+ sont réabsorbés par le canal ENaC. L'eau suit ces gradients ioniques par mouvements osmotiques (48,49) (Figure 4). A l'état physiologique, absorption et sécrétion sont coordonnées et permettent un maintien du volume physiologique de l'ASL. CFTR, en tant que canal chlorure et inhibiteur du canal ENaC, possède donc un rôle régulateur important sur la capacité de l'épithélium respiratoire à maintenir un état d'hydratation adéquat du mucus.

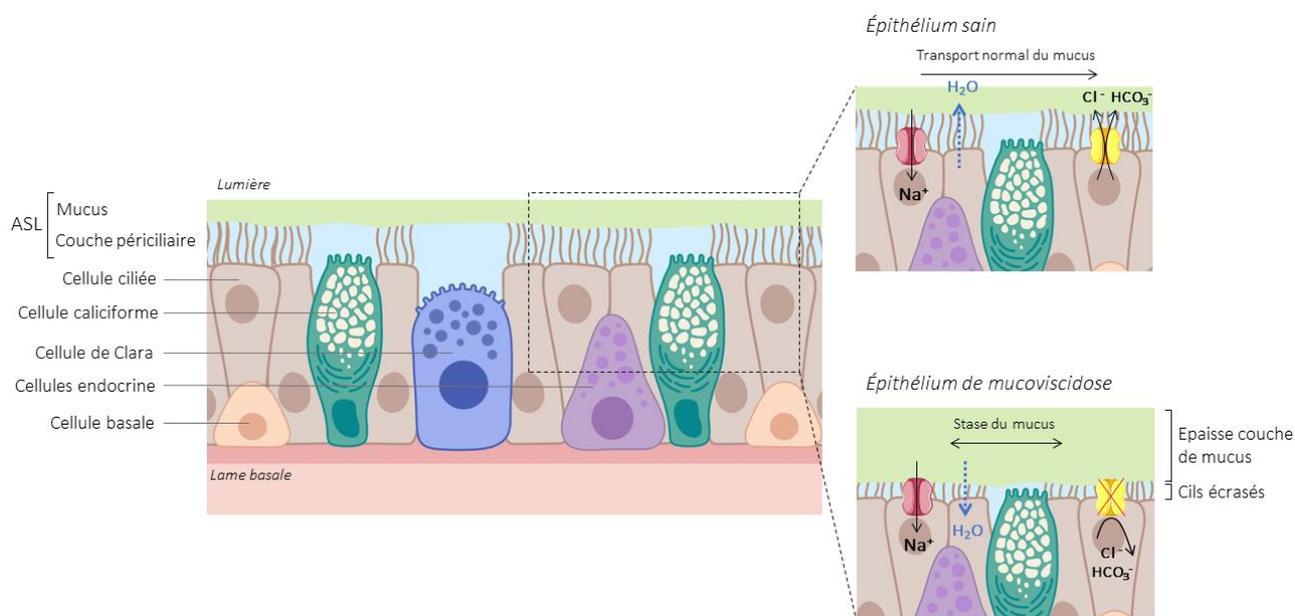


Figure 4 Transports ioniques et mouvement d'eau dans un épithélium respiratoire sain et dans un épithélium respiratoire atteint de mucoviscidose. ASL : Airway Surface Liquid.

Lorsque le gène *CFTR* est muté, la protéine CFTR n'est pas présente à la membrane ou est non fonctionnelle entraînant alors un déséquilibre des flux ioniques décrits plus haut. Ce déséquilibre se caractérise par une augmentation de la différence du potentiel transépithélial à l'épithélium respiratoire due à une réabsorption excessive d'ions Na^+ par levée d'inhibition des canaux ENaC et à une sécrétion réduite d'ions Cl^- par perte de capacité à sécréter le chlore (47,50–52). La perméabilité membranaire à la face apicale se retrouve augmentée pour les ions Na^+ et diminuée pour les ions Cl^- (53–55). L'eau est alors réabsorbée par les cellules épithéliales : la surface des voies respiratoires est déshydratée et l'ASL diminue en épaisseur (52,56) (Figure 4). Il en résulte la formation d'un mucus visqueux. La dérégulation du transport des ions HCO_3^- participe également à la formation de ce mucus visqueux. En effet, la déplétion du milieu extracellulaire en ions bicarbonate, qui ne sont plus excrétés par le canal CFTR lorsque celui-ci est muté, empêche le déploiement correct des mucines (57–60).

1.3 Manifestations cliniques

La mucoviscidose est une maladie multi-systémique qui touche un grand nombre d'organes et se caractérise par une apparition progressive des signes cliniques (61,62). Les premières manifestations apparaissent durant la période néonatale et sont d'ordre digestives. Environ 15% des enfants atteints de mucoviscidose naissent avec un iléus méconial, obstruction intestinale due à la présence de mucus visqueux dans les intestins. De plus, 85 à 90% des enfants développent une insuffisance pancréatique responsable d'une malabsorption des nutriments (61). Ces complications intestinales sont à l'origine d'un retard de croissance des individus (63). Les glandes sudoripares, le système respiratoire, le foie et le système reproducteur sont également affectés. L'ensemble des manifestations cliniques de la maladie sont résumées dans la Figure 5. Dans la suite de ce manuscrit nous nous intéresserons uniquement aux atteintes pulmonaires.

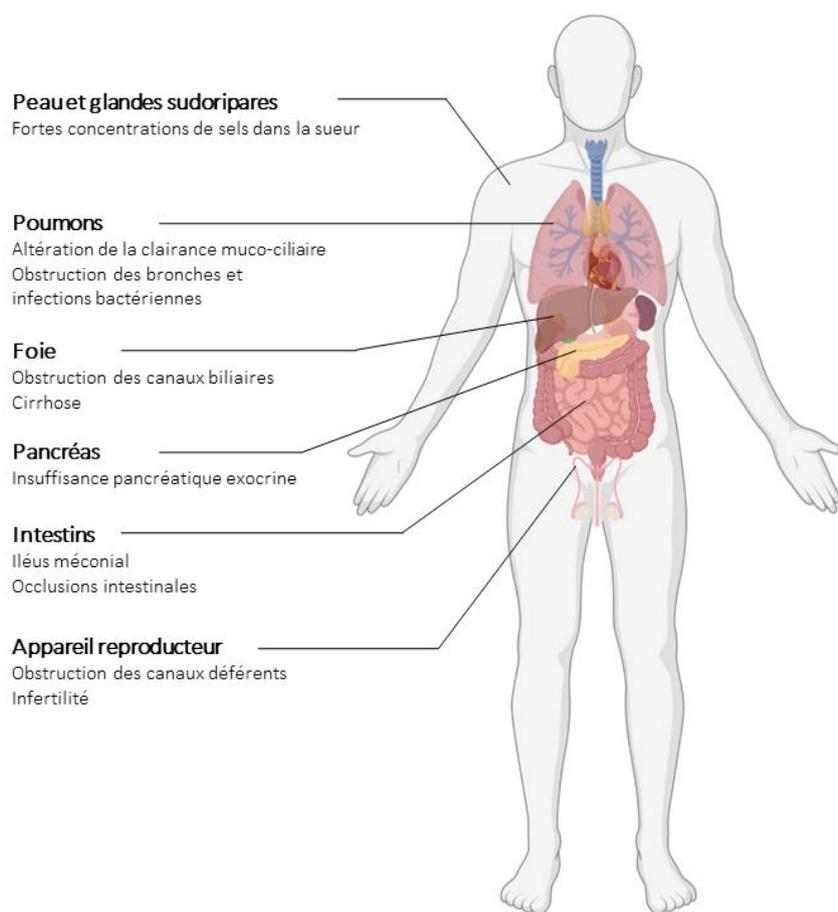


Figure 5 Manifestations cliniques de la mucoviscidose.

L'atteinte pulmonaire constitue une atteinte secondaire par rapport aux autres manifestations précoces et notamment intestinales de la maladie. En effet, les poumons sont en apparence normaux à la naissance mais ils sont rapidement colonisés par les bactéries et deviennent inflammés dans les premiers mois de vie (64–66). La progression de la maladie a lieu par poussées successives due à des phénomènes d'exacerbations. Bien que ces phénomènes d'exacerbations tiennent une place centrale dans l'évolution de la maladie, il n'existe actuellement pas de définition standardisée des exacerbations pulmonaires. Celles-ci sont identifiées sur la base d'un diagnostic clinique et correspondent globalement à des épisodes aigus d'une aggravation des symptômes respiratoires associés à une détérioration de la qualité de vie (67,68). Les symptômes respiratoires se caractérisent par une augmentation de la toux et des expectorations et un déclin irréversible de la fonction pulmonaire (68–72). Ces exacerbations pulmonaires, causées le plus souvent par des infections bactériennes, ont un impact négatif sur le pronostic de la maladie et conduisent, à terme, à une insuffisance respiratoire qui constitue aujourd'hui 80% de la morbidité et de la mortalité de maladie (2,61,73).

1.4 Physiopathologie des atteintes pulmonaires de la maladie

Les processus physiopathologiques impliqués dans la mucoviscidose s'organisent autour d'une triade formée par l'obstruction, l'infection et l'inflammation des voies respiratoires. Cette triade, dont les mécanismes sont décrits dans cette partie, assure l'auto-entretien et la progression de la maladie (Figure 6).

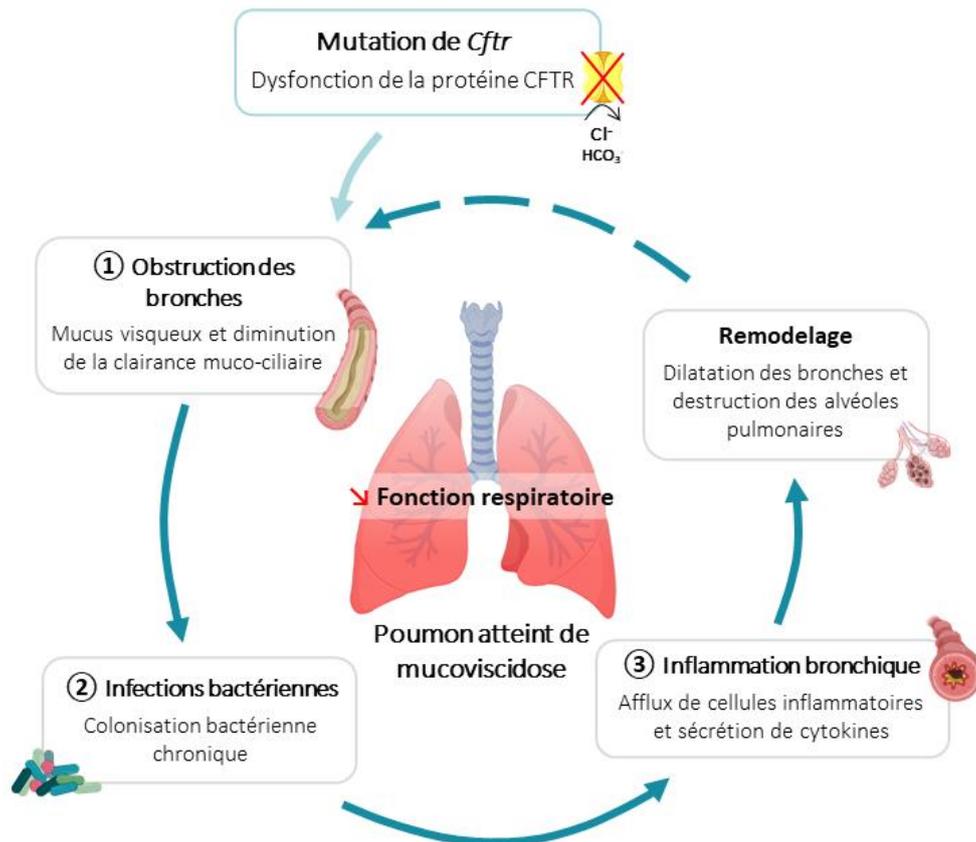


Figure 6 Triade constituée par l'obstruction, l'infection et l'inflammation dans la mucoviscidose.

1.4.1 Obstruction des voies respiratoires par le mucus

Comme décrit précédemment la dérégulation des transports ioniques dans la mucoviscidose aboutit à la formation d'un mucus visqueux. Ce mucus visqueux écrase la PCL (Figure 7). La PCL correspond à un gel qui constitue un environnement favorable aux battements ciliaires en diminuant les forces de friction et en jouant un rôle de lubrifiant pour empêcher l'adhésion du mucus aux cellules (74,75). Ainsi dans la mucoviscidose, l'écrasement de la PCL ne permet plus aux cils de battre librement car ils sont englués dans le mucus. La clairance muco-ciliaire est ainsi diminuée : le mucus n'est plus évacué correctement et il

s'accumule dans les voies respiratoires où il y forme des bouchons obstructeurs au passage de l'air à l'origine de difficultés à respirer.

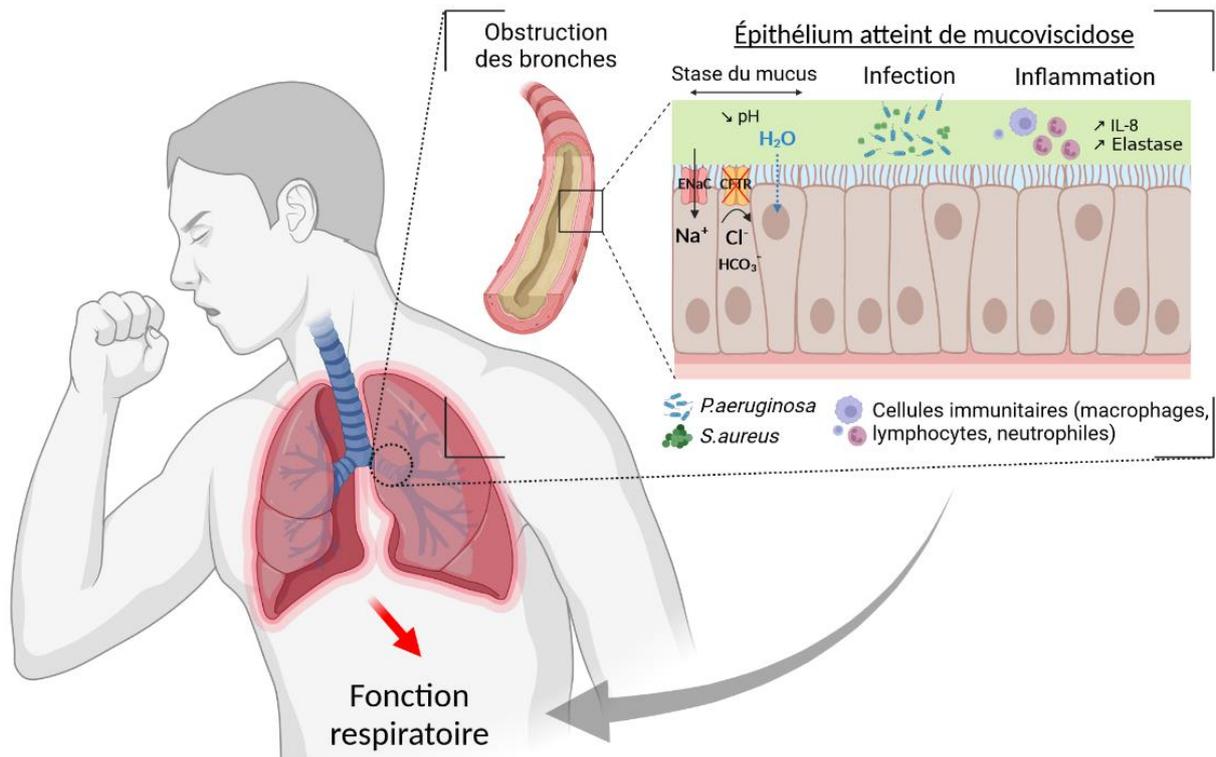


Figure 7 Mécanismes physiopathologiques impliqués dans de la mucoviscidose.

1.4.2 Infections bactériennes

En situation physiologique, le mucus est protecteur. Son rôle est de retenir les bactéries et particules inhalées qui seront ensuite éliminées par la clairance muco-ciliaire. Cette clairance muco-ciliaire constitue le premier mécanisme de défense de l'appareil respiratoire contre les pathogènes (76,77). Sous certaines conditions physiopathologiques particulières comme c'est le cas dans la mucoviscidose, la clairance muco-ciliaire est diminuée. Le mucus non évacué devient alors un nid propice au développement des bactéries. Dans la mucoviscidose, la stase du mucus est associée à des infections chroniques des voies respiratoires par *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae*, *Burkholderia cepacia* ou encore *Stenotrophomonas maltophilia* (61,62). *S.aureus* et *P.aeruginosa* sont les 2 pathogènes prédominants (2,6) (Figure 7). La première acquisition de ces pathogènes respiratoires a lieu dans les premières années de vie de l'enfant (78–80). Ces infections bactériennes constituent un élément clé des épisodes d'exacerbations pulmonaires car elles participent à la diminution de la fonction respiratoire observée lors de ces épisodes (81–83).

La seconde ligne de défense des voies respiratoires est assurée par l'activité phagocytaire de cellules immunitaires (macrophages et neutrophiles) et par l'action de substances antimicrobiennes (défensines, lactoferrine, lysozyme) (84). Une altération de ces mécanismes contribue à la mise en place d'un environnement favorable pour la prolifération et la persistance des bactéries dans les voies respiratoires. Les zones hypoxiques formées par l'accumulation du mucus favorisent le développement de *P.aeruginosa* en conditions anaérobies sous la forme de biofilms (85,86). La croissance de *P.aeruginosa* en conditions anaérobies favorise la transition vers sa forme mucoïde, plus virulente et plus difficile à éradiquer (87–89). En effet, les bactéries se retrouvent piégées dans le réseau très compact formé par les mucines et se situent hors d'atteinte des cellules phagocytaires et des substances antimicrobiennes (90,91). D'autre part, la sécrétion de bicarbonate, qui fait défaut chez les patients atteints de mucoviscidose, entraîne une diminution du pH de l'ASL (92–96). Cette acidification de l'ASL a un rôle pivot car de nombreux mécanismes du système des défenses sont pH-dépendants : clairance muco-ciliaire (97,98), propriétés visqueuses du mucus (99), fonction phagocytaire des macrophages alvéolaires (100–102), activité protéique des substances antimicrobiennes (94,96,103,104) ou encore inhibition directe de la croissance bactérienne (105). En cas d'acidification du mucus, ces mécanismes de défense sont supprimés et rendent l'hôte plus susceptible aux infections bactériennes.

1.4.3 Inflammation chronique

Les voies respiratoires des patients atteints de mucoviscidose contiennent un nombre important de cellules inflammatoires (106) (Figure 7). L'infiltrat inflammatoire pulmonaire observé chez ces patients est à dominance neutrophilique. Les interleukines 8 et 17 (IL-8 et IL-17) constituent les chimio-attractants majeurs pour l'afflux des neutrophiles dans les poumons. L'activation de ces neutrophiles est essentiellement médiée par le facteur de nécrose tumorale α (TNF- α), l'interleukine 1 β (IL-1 β) et les facteurs de stimulation des colonies de granulocytes et de macrophages (G-CSF et GM-CSF). Une fois activés, les neutrophiles jouent un rôle central dans la génération et le maintien de la réponse inflammatoire. Ils assurent en effet la sécrétion d'importantes quantités de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires permettant le recrutement d'autres cellules impliquées dans la réponse immunitaire y compris eux-mêmes. Les macrophages et les lymphocytes sont en effet augmentés dans les lavages bronchoalvéolaires (LBA) des patients atteints de mucoviscidose. Ces macrophages et ces lymphocytes produisent eux aussi plusieurs cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 β ,

l'IL-6, l'IL-8, le TNF- α , l'interféron γ (IFN γ) ou encore certains ligands de chimiokines (CCL2, CCL5) qui perpétuent la réponse inflammatoire (106–108). L'analyse de LBA des patients atteints de mucoviscidose révèle d'autre part que les molécules anti-inflammatoires comme l'IL-10 et les médiateurs de résolution de l'inflammation (lipoxines, résolvines, protectines) sont sécrétées en moins grande quantité soulignant la prédisposition de ces patients à développer un phénotype inflammatoire chronique (109–111). Le facteur de transcription NF- κ B tient une place centrale dans la régulation de cette inflammation et de ces sécrétions cytokiniques (108). En condition physiologique, les neutrophiles participent également à l'élimination des pathogènes par la sécrétion de substances antimicrobiennes, la production de pièges extracellulaires des pathogènes ou NETs (Neutrophil Extracellular Traps) et la phagocytose des micro-organismes. Dans la mucoviscidose, ces processus d'élimination des bactéries apparaissent anormaux (112–114). Les neutrophiles sécrètent également plusieurs protéases (neutrophile élastase – ELANE, cathepsine G, protéinase 3) et certaines métalloprotéases matricielles (MMP – MMP8 et MMP9). Ces protéases ont un rôle essentiel dans la dégradation de la matrice extracellulaire. La sécrétion abondante de ces protéases, associée à un système anti-protéasique submergé, conduit *in fine* à la dilatation irréversible des bronches, à la destruction des tissus pulmonaires et à une diminution de la fonction respiratoire (115–118). Dans ce contexte, ELANE est un effecteur tout à fait particulier puisqu'il est en plus associé à une augmentation de la production de mucus, à une activation d'ENaC et à une dégradation de CFTR, éléments clés de la physiopathologie de la mucoviscidose (108).

En plus du déséquilibre de la balance protéolytique, les neutrophiles génèrent également des espèces réactives de l'oxygène (ERO). Ces ERO sont à l'origine d'un déséquilibre de la balance redox et donc d'un stress oxydant. Ils provoquent aussi des dommages tissulaires, stimulent la production de cytokines et participent à la diminution de la fonction respiratoire (108,119). De plus, si les ERO constituent normalement un moyen de défense contre les pathogènes, un relargage permanent est d'autant plus dommageable que les défenses antioxydantes sont surpassées chez les individus atteints de mucoviscidose (120–123).

Les neutrophiles ne sont toutefois pas les seules cellules à participer à la persistance de l'inflammation des voies respiratoires. En effet, les macrophages et les lymphocytes sont présents en grandes concentrations dans les poumons des patients mucoviscidosiques et leur fonction y est dérégulée (106,108). Ces cellules produisent notamment de très grandes quantités de cytokines pro-inflammatoires qui alimentent le recrutement et l'activation d'autres cellules inflammatoires (124). De plus, les macrophages présentent une activité phagocytaire des micro-

organismes réduite et une activité efferocytaire des débris apoptotiques et nécrotiques des neutrophiles réduite (106,108). La non-élimination des pathogènes par les macrophages et les neutrophiles perpétue les infections bactériennes. De même, les débris de décomposition des neutrophiles, comprenant médiateurs de l'inflammation, ADN, protéases et ERO promeuvent la réaction inflammatoire, l'épaississement du mucus et les dommages tissulaires.

Enfin, si on a longtemps cru que l'infection bactérienne était la cause première de l'inflammation dans la mucoviscidose, plusieurs études suggèrent l'existence d'une inflammation préalable à toute infection (65,125–127). Les mécanismes à l'origine de cette inflammation stérile ne sont pas encore entièrement élucidés mais pourrait impliquer une réponse à l'hypoxie ou plus directement une réponse à la dysfonction de CFTR (128,129).

1.5 Facteurs modulateurs de la maladie

1.5.1 Corrélation génotype/phénotype

La sévérité d'une maladie décrit l'ampleur de la maladie chez les personnes qui en sont atteintes. La sévérité d'une maladie héréditaire est déterminée par l'interaction de 3 facteurs (130). La nature de la mutation dans le gène incriminé qui modifie de manière plus ou moins importante le rôle physiologique de la protéine codée par ce gène. Le contexte génétique dans lequel le gène muté opère : l'expression du gène défectueux est-elle dépendante de l'expression d'autres gènes ? L'activité de la protéine implique-t-elle d'autres partenaires protéiques ? Si oui, quels seraient les effets de mutation sur de tels gènes et protéines ? D'autre part, des mutations sur des gènes codant pour des protéines impliquées dans les processus physiopathologiques de la maladie peuvent également directement moduler la sévérité de la maladie. Enfin, l'environnement influence également l'expression des gènes et des protéines. Avec une fonction protéique de CFTR totalement abolie, les mutations des classes I à III sont usuellement associées à un pronostic sévère de mucoviscidose (131,132). Au contraire, les mutations des classes IV à VI, caractérisées par une fonction résiduelle de CFTR et un transport d'ions chlorure réduit mais existant, sont associées à une sévérité de la maladie plus modérée. Cette relation entre génotype de *CFTR* et sévérité de la maladie est surtout vraie dans la détermination du statut de la fonction pancréatique (133–135). Si la nature de la mutation de *CFTR* semble aussi être corrélée à la concentration de chlorures dans la sueur et donc à la fonction de la protéine, celle-ci reste très variable même entre des individus de même génotype (136–138). Il en est de même pour la fonction pulmonaire (139–141). Il existe ainsi une grande

variabilité phénotypique des patients présentant les mêmes mutations qui ne permet pas d'établir clairement une corrélation entre génotype de *CFTR* et expression pulmonaire de la maladie (142–144). La diversité des cas cliniques ne peut être expliquée par la seule variabilité génotypique de *CFTR*. Cela penche en faveur de l'implication d'autres facteurs modulateurs de la maladie, de nature génétique ou environnementale (135).

1.5.2 Facteurs génétiques

Plusieurs études menées chez des jumeaux et des frères et sœurs ont montré que la variation de la fonction pulmonaire était plus faible entre des jumeaux monozygotes qu'entre des jumeaux dizygotes ou des frères et sœurs (145–147). Ces résultats suggèrent l'implication de facteurs héréditaires autres que *CFTR* dans la modulation de l'aspect pulmonaire de la maladie. Ces facteurs héréditaires sont des gènes qui, par leur génotype et leur expression, viennent modifier l'expression de *CFTR*. La part de contribution de ces gènes modificateurs dans la variation de la fonction pulmonaire a été estimée à 50% (146,147).

Sur la base d'études d'association pangénomique (ou GWAS pour *Genome-Wide Associated Study*), cinq loci modulateurs de la sévérité pulmonaire de la mucoviscidose ont pu être identifiés. Ces loci comprennent les gènes *MUC4/MUC20*, *SLC9A3*, le complexe d'histocompatibilité de classe II (HLA II), *AGTR2/SLC6A14* et *EHF/APIP* (148,149). Les niveaux de modulation de ces gènes sont pléiotropiques – iléus méconial, insuffisance pancréatique, déclin de la fonction pulmonaire, précocité de la primo-infection par *P.aeruginosa* (150–153) – et les mécanismes par lesquels ces gènes modulent la maladie sont plus ou moins identifiés (149,154–158). Par ailleurs, d'autres gènes ont été sélectionnés et testés à l'aide d'une approche gène candidat basée sur la compréhension et les connaissances actuelles de la physiopathologie de la maladie. Les études se sont surtout intéressées à des gènes impliqués dans la réponse inflammatoire, la réponse immunitaire, le remodelage tissulaire et à des gènes codant pour des canaux ioniques. Ainsi, des gènes comme *TGFBI*, *IL8*, *IL1B*, *NOS* ou bien *MBL2* ont été identifiés comme potentiels gènes modificateurs de la sévérité de la maladie (157,159). Enfin, des modifications épigénétiques altérant la machinerie de l'épissage pourraient aussi être impliquées dans la régulation de la sévérité de la maladie (160–162).

1.5.3 Facteurs environnementaux

Si les facteurs génétiques permettent d'expliquer 50% de la variation de la fonction pulmonaire, les 50% restant seraient quant à eux expliqués par des facteurs non génétiques ou facteurs environnementaux (147). En effet, il a pu être montré que la différence de fonction respiratoire entre jumeaux et frères et sœurs augmente lorsque ceux-ci commencent à vivre dans des environnements différents. Ces facteurs environnementaux regroupent tout ce qui ne touche pas à la génétique et qui a trait au milieu et au mode de vie : expositions environnementales, conditions météorologiques, statut socio-économique, régime alimentaire, activité physique ... L'ensemble de ces facteurs environnementaux définit ce que l'on appelle l'exposome. L'exposome correspond à la somme de toutes les expositions environnementales qu'un individu subit au cours de sa vie, de sa conception jusqu'à sa mort (163).

Une exposition aux bactéries présentes dans l'environnement conduit à des infections bactériennes intermittentes ou chroniques par *P.aeruginosa*, *S.aureus* et *H.influenzae*. Or, ces infections bactériennes constituent un élément central des exacerbations et un déterminant clé de la morbidité et de la progression de la pathologie. Comme mentionné précédemment, la primo-infection par *P.aeruginosa* survient généralement dans les 2 à 3 premières années de vie (78–80). Il a été montré qu'une primo-infection plus précoce par *P.aeruginosa* était associée à une forme plus sévère de mucoviscidose (164). La précocité de l'infection est ainsi corrélée à une diminution accélérée de la fonction respiratoire et à une augmentation du taux d'exacerbations pulmonaires et constitue un facteur prédictif de mortalité (165–169). Par ailleurs, des études récentes attestent de l'influence de facteurs météorologiques et géographiques sur l'acquisition de ces pathogènes. Entre autres, la température, l'humidité, les précipitations, la saisonnalité ainsi que la longitude, la latitude et l'altitude du lieu de résidence ont été associées avec un risque accru de primo-infection par *P.aeruginosa* (170–176).

Le polluant environnemental le plus étudié jusqu'à présent est sans doute la fumée de cigarette (177,178). Celui-ci a été étudié chez des patients atteints de mucoviscidose dès les années 1990. Une exposition à la fumée de cigarette est ainsi associée à un pronostic clinique plus mauvais. Parmi les effets induits, on peut citer : diminution de la croissance et du poids chez les enfants (179–181), fonction respiratoire réduite (180,182,183), augmentation de l'incidence des infections par MRSA et par des bactéries anaérobies et durée de traitement par antibiotiques plus longue (181,184), déshydratation de l'ASL (185) et dysfonction de CFTR (186–189). Outre la fumée de cigarette, d'autres polluants environnementaux, la pollution atmosphérique a également été associée à une augmentation de la morbidité de la maladie (190).

Les effets spécifiques de la pollution atmosphérique dans un contexte de mucoviscidose seront détaillés en dernière plus loin.

Le statut socio-économique correspond à la position sociale d'un individu. Il s'agit d'une mesure globale de son accès à un certain niveau de ressources économiques, éducatives et sociales. Ce statut peut tout à fait influencer l'évolution d'une maladie dans la mesure où des individus de statut socio-économique bas tendent à vivre dans des zones plus polluées, à avoir des ressources financières plus faibles et un accès limité aux structures de soins et à certains traitements ce qui pourrait contribuer à une augmentation de la morbidité. Ainsi, il a été montré qu'un statut socio-économique bas était associé à un indice de masse corporelle plus faible, une fonction respiratoire diminuée et un risque de mortalité augmenté chez des patients mucoviscidosiques (191).

Enfin, d'autres facteurs peuvent cependant avoir des effets positifs sur le cours de la maladie. La pratique d'une activité physique chez des enfants atteints de mucoviscidose est clairement associée à des effets bénéfiques sur la progression de la maladie avec un ralentissement du déclin de la fonction respiratoire, une augmentation de la capacité aérobie et une amélioration globale de la qualité de la vie (192–195). L'activité physique pourrait également compenser les effets néfastes du tabagisme passif (184).

1.6 Modèles d'étude pré-cliniques de la mucoviscidose

Les modèles d'étude pré-cliniques actuels de mucoviscidose sont nombreux et on trouve aussi bien des modèles animaux que des modèles cellulaires.

Le premier modèle animal de mucoviscidose a vu le jour en 1992 par insertion d'un codon stop prématuré dans l'exon 10 de la séquence du gène *Cftr* (196). Depuis, de nombreux autres modèles ont suivi sur des fonds génétiques variés. Une description de ces modèles peut être trouvée dans l'article de Wilke et al. (197). Ces modèles se différencient sur leur construction et la nature de la mutation présente dans le gène *Cftr* mais sont pour la plupart des modèles dits « knock-out » chez lesquels le gène *Cftr* a été inactivé. Cette inactivation de *Cftr* entraîne une perte de fonction totale de la protéine CFTR. Ces animaux présentent une mortalité sévère dans la période périnatale pour cause d'obstruction intestinale ce qui limite l'étude de la maladie à l'âge adulte. D'autres modèles dits « knock-in » présentent eux des mutations spécifiques de *Cftr* et un taux de survie plus grand jusqu'au sevrage. Si le phénotype intestinal est bien reproduit chez ces modèles et que l'épithélium nasal reflète les anomalies de transport

ionique observées chez l'Homme, aucun phénotype pulmonaire n'est observé en l'absence de toute stimulation infectieuse. Ceci pourrait en partie être expliqué par un transport de chlore pris en charge par des canaux chlore activés par le calcium (198).

Parmi tous les modèles murins qui existent, nous allons nous intéresser à 2 modèles en particulier dans la suite de ce manuscrit. Le premier modèle est le modèle *Cftr*^{tm1EUR}. Il s'agit d'un modèle pour une délétion ponctuelle de la phénylalanine en position 508 a été insérée dans l'exon 10 par la méthode du « hit and run » (199). Ce modèle possède donc l'avantage de présenter la mutation la plus fréquemment observée chez les patients. Comme évoqué plus haut, ce modèle est caractérisé par un phénotype intestinal mais échoue à reproduire un phénotype pulmonaire. Le second modèle qui nous intéresse est le modèle *Scnn1b*-Tg décrit en 2004 par Mall et al. (200). Ce modèle présente une surexpression spécifique de la sous-unité β du canal sodique ENaC (Epithelial Sodium Channel) dans les cellules pulmonaires. Cette surexpression ciblée, responsable d'une hyperabsorption de sodium, permet à elle seule de reproduire un phénotype pulmonaire très proche de celui observé chez l'Homme caractérisé par une déplétion de l'ASL, une obstruction des voies respiratoires par le mucus, une susceptibilité aux infections bactériennes spontanées et de l'inflammation d'origine neutrophilique. Le transport de chlore reste normal puisque le gène *Cftr* n'est pas affecté. De même, ces souris ne présentent pas d'atteinte intestinale. Les souris de cette lignée constituent actuellement le modèle le plus complet en terme de fidélité de reproduction du phénotype pulmonaire de la mucoviscidose. Si à ce jour, les modèles murins restent les plus nombreux et les plus utilisés, quelques modèles de rats, furets et cochons émergent car ils présentent l'avantage de pouvoir développer spontanément un phénotype pulmonaire (198,201,202).

En conclusion, la mucoviscidose est une maladie génétique multi-systémique affectant principalement les appareils digestifs et respiratoires et qui est due à la mutation d'un seul gène, le gène *CFTR*, pour lequel plus de 2 000 mutations ont été identifiées. La dysfonction de *CFTR* résulte en une déshydratation de la surface des voies respiratoires qui conduit à un épaissement des sécrétions muqueuses qui obstruent les voies respiratoires. L'obstruction des voies respiratoires par le mucus est associée à des infections bactériennes persistantes et une inflammation chronique qui conditionnent à terme une destruction des tissus pulmonaires et un déclin irréversible de la fonction respiratoire responsable de l'essentiel de la morbidité et de la mortalité des patients. Toutefois, la mucoviscidose se caractérise par une grande diversité des cas cliniques qui reste à ce jour encore mal comprise. En effet, des patients présentant les

mêmes mutations peuvent présenter une expression différente de la maladie, notamment au niveau pulmonaire. La variabilité génétique de *CFTR* ne suffit ainsi pas à expliquer la variabilité phénotypique observée chez les patients. Ceci suggère l'implication de facteurs modulateurs de la maladie, d'origine génétique ou environnementale. Si l'implication des gènes modificateurs dans la modulation de l'expression phénotypique de la mucoviscidose est de mieux en mieux étudiée, il subsiste au contraire un manque de connaissance sur l'implication des facteurs environnementaux.

2 La pollution atmosphérique : un enjeu environnemental majeur

2.1 Qu'est-ce que la pollution atmosphérique ?

2.1.1 Composition chimique

La pollution atmosphérique se définit comme un mélange de milliers de polluants dont les concentrations sont pour la plupart à l'état de trace et varient de quelques parties par milliards (ppb) à des parties par millions (ppm). Ce mélange est souvent décrit comme complexe, et ce à plusieurs titres :

- 1) Il est multiphasique, c'est-à-dire qu'il existe en son sein aussi bien une phase gazeuse (non condensée) et une phase particulaire (condensée).
- 2) En plus d'être constitué de divers composés de diverses natures chimiques, ce mélange évolue à la fois dans le temps et dans l'espace.

La phase gazeuse correspond à l'ensemble des polluants gazeux présents dans l'atmosphère à savoir en plus des composés majoritaires de l'atmosphère du dioxyde de carbone – CO₂, du méthane – CH₄ mais aussi des oxydes d'azote – NO_x, du dioxyde de soufre – SO₂, de l'ozone – O₃ et des composés organiques volatils – COV. Les COV sont des composés organiques caractérisés par leur grande volatilité et comprennent des membres de plusieurs familles chimiques : des alcanes (par exemple éthane, propane, isopentane, isobutane ...), des alcènes (éthylène, propène ...), des hydrocarbures aromatiques mono et polycycliques – HAM et HAP (benzène, xylène, toluène, benzo[a]pyrène ...), des aldéhydes (formaldéhyde, acétaldéhyde ...), des cétones (acétone ...) ou encore des acides carboxyliques (acide formique, acide acétique ...).

La phase particulaire, encore appelée aérosol, correspond à l'ensemble des particules liquides ou solides en suspension dans un gaz. Les matières particulaires, ou PM pour *Particulate Matter*, sont catégorisées en fonction de leur taille qui s'étend de plusieurs micromètres à quelques nanomètres (203). Les plus grosses, les PM₁₀ dites particules « grossières », correspondent aux particules ayant un diamètre aérodynamique moyen inférieur à 10 µm. Les PM_{2,5} et les PM_{0,1}, particules plus petites appelées particules fines et ultrafines (PUF), présentent un diamètre inférieur à 2.5 et 0.1 µm respectivement. En plus de cette diversité de taille, les particules possèdent des morphologies variables. En ce qui concerne leur

composition, on y distingue une fraction inorganique ou minérale, composée de sels (carbonate de calcium, chlorure de sodium ...), de sulfates, de nitrates, d'ammoniums, de métaux lourds (vanadium, chrome, zinc, cobalt ...) ou encore de composés d'origine biogène (pollens, spores, micro-organismes ...), et une fraction organique constituée de carbone élémentaire amorphe (particules « black carbon » ou particules de suies) et de carbone organique présent sous forme de nombreux composés différents (alcanes, alcènes, esters, acides carboxyliques, alcools, aldéhydes, HAP ...) (203,204). La taille et la composition chimique des particules sont fortement influencées par la nature de la source émettrice des particules, ce qui induit une grande hétérogénéité des aérosols.

2.1.2 La pollution atmosphérique en zone urbaine et péri-urbaine

Les polluants sont émis par des sources de natures différentes, naturelles ou anthropiques, qui varient largement en fonction du temps et de l'espace. Dans le cadre de ces travaux de thèse je me suis rapidement focalisée sur des cas d'étude en lien avec l'urbain et le péri-urbain, pour les trois raisons suivantes : 1) c'est dans ces zones qu'est concentrée la majeure partie de la population mondiale, 2) c'est dans ces zones que l'on a les meilleurs suivis épidémiologiques de cohortes, 3) c'est dans ces zones que l'on a une excellente vision de ce qui constitue la pollution atmosphérique au vu de la densité de certains réseaux de surveillance de la qualité de l'air. Ces environnements sont notamment fortement influencés par les sources anthropiques (trafic, industries...), qui de plus voient l'émission de COV d'origine biogénique (COVB).

La pollution urbaine est, de manière synthétique, liée à des sources de pollution nombreuses, en lien avec la diversité des activités urbaines, la mobilité et la densité de population des villes. Historiquement les premières évaluations des pollutions (acidité forte et fumées noires) révélaient surtout l'impact des émissions soufrées industrielles (tout particulièrement SO₂), comme en France où les premières mesures ont été effectuées au début des années 1960. Les industriels et les médecins qui voulaient mieux connaître le risque sanitaire quantifiaient dans le même temps les polluants, afin d'objectiver les plaintes et les confronter à des normes qui se sont imposées progressivement. La surveillance, pilotée par l'Europe et les instances internationales, s'est progressivement développée grâce à la mise au point d'outils de mesure et de modèles présentant une résolution de plus en plus fine, si bien

qu'actuellement les niveaux des polluants atmosphériques peuvent être pour certains connus à l'échelle de la rue.

La surveillance de la pollution n'a cessé d'évoluer en fonction du développement des activités polluantes de la ville. Si les industries ont pour beaucoup de villes peu à peu déserté le milieu urbain (notamment en Europe de l'Ouest, réduisant de ce fait les émissions soufrées au sein des villes), la circulation automobile s'est au contraire intensifiée, entraînant une augmentation des oxydes d'azote dans l'atmosphère.

Le chauffage domestique est également une source de pollution, la nature des fumées émises dépendant du combustible utilisé. Il a évolué au fil des années : le charbon a été progressivement remplacé par le fuel, puis par le gaz et l'électricité, sans oublier le bois, considéré comme « vertueux » vis-à-vis de l'effet de serre, puisque le dioxyde de carbone (CO₂) dégagé au cours de sa combustion correspond à celui qui a été emmagasiné par l'arbre au cours de sa croissance. Cependant, les recherches entreprises sur les effets négatifs des combustibles sur la santé ont mis en avant la responsabilité du carbone suie (black carbon) que dégagent des combustions incomplètes comme celle du charbon, du diesel et du bois.

La mesure des oxydes d'azote (NO_x), polluants caractéristiques de la circulation automobile, s'est généralisée plus tardivement – seulement dans les années 1990 en France, alors que l'augmentation du nombre de véhicules fut continue au cours du XXe siècle. Par exemple, à Paris, le nombre de voitures immatriculées était de 288 en 1899, 11 136 en 1913, 400 000 en 1938 et 800 000 en 1954 (205)

Les oxydes d'azote et les particules sont désormais les polluants les plus caractéristiques de la mauvaise qualité de l'air de l'ensemble des villes du monde. La répartition spatiale des niveaux de dioxyde d'azote (NO₂) reflète son origine, qui est principalement liée au transport automobile puisque les zones présentant les niveaux les plus élevés de NO₂ suivent les grandes infrastructures routières. C'est ainsi que l'étude Aphekom (*Improving Knowledge and communication for Decision Making on Air Pollution and Health in Europe*), qui a évalué l'impact sanitaire et économique de la pollution atmosphérique urbaine dans 25 villes européennes, a pu mettre en évidence une perte d'espérance de vie pour les personnes qui vivent à proximité des grands axes routiers.

Les particules, dont on connaît de mieux en mieux la nocivité, restent un polluant urbain majeur. Les particules fines en suspension (inférieures à 1 ou 2 micromètres) sont invisibles et peuvent adsorber ou agglomérer d'autres polluants toxiques – comme les hydrocarbures

aromatiques polycycliques, les dioxines, les composés organiques volatils non méthaniques, les métaux lourds – puis les transporter dans les poumons. Les suies sont des particules dites primaires, car directement issues des sources de pollution – ici les processus de combustion. En dépit des filtres à particules, le moteur Diesel reste le principal responsable des émissions de carbone.

A l'échelle mondiale, les particules d'origine naturelle soit essentiellement les grosses particules représentent environ 90% de la masse des émissions totales, les 10% restant étant d'origine anthropique et essentiellement des petites particules (206). Si cette disproportion paraît à première vue étonnante, elle s'explique par les importantes émissions de sels de mer et de poussières désertiques qui représentent à elles seules 90% des émissions naturelles. En effet, la surface terrestre est couverte à 72% par les océans et les déserts. Cependant, il est à noter que la source anthropique est l'élément contributeur majeur sur la taille et la composition des aérosols totaux. L'émission d'aérosols fins ainsi que les concentrations atmosphériques de métaux lourds, sulfates, soufre particulaire et de certains composés organiques sont aujourd'hui quasiment exclusivement liées à la composante anthropique (206,207).

Même si elles n'ont pas été considérées dans mon premier modèle d'atmosphère urbaine simulée, les sources de pollution en milieu intérieur sont également nombreuses : appareils à combustion, tabagisme, produits ménagers, produits de bricolage, allergènes ... Les processus de combustion aux énergies fossiles pour le chauffage et la cuisine sont par exemple particulièrement émetteurs de particules, CO, suies et NO_x.

2.1.3 Evolution et transport des polluants

Le mode de formation des polluants définit leur caractère primaire ou secondaire. Ainsi, les polluants primaires correspondent aux polluants directement émis dans l'atmosphère depuis la source. Une fois rejetés dans l'atmosphère, ces polluants réagissent entre eux par réactions photochimiques induites sous l'effet de l'irradiation solaire pour former des polluants dits secondaires. Cette réactivité chimique est instantanée. Une illustration classique du polluant secondaire est l'ozone, oxydant qui n'est émis par aucune source naturelle ou anthropique : l'ozone se forme dans le contexte d'un cycle chimique impliquant les NO_x et les COV, notamment en conditions de fort ensoleillement (Figure 8).

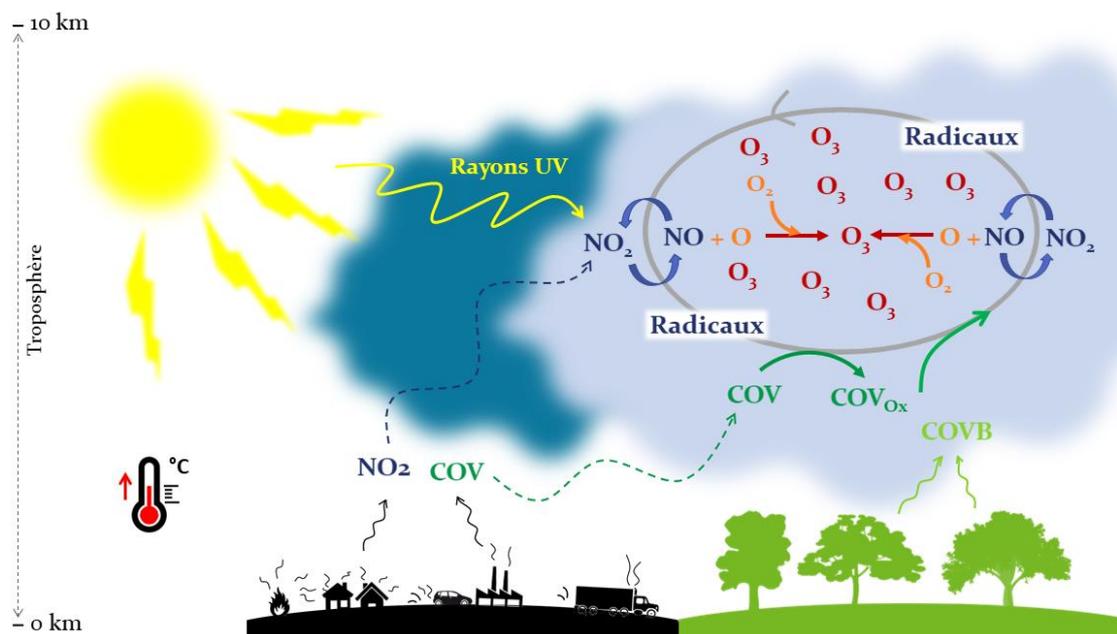


Figure 8 Formation de l'ozone troposphérique. L'ozone, en tant que polluant secondaire, se forme dans la troposphère (0 à 10 km d'altitude), soit dans la couche basse de l'atmosphère disjointe de la « la couche d'ozone » à plus haute altitude formée par l'ozone stratosphérique. Sous l'action des rayons du soleil, le dioxyde d'azote (NO_2) émis par le trafic routier se photodissocie en monoxyde d'azote (NO), libérant ainsi un atome d'oxygène. Cet atome d'oxygène réagit avec le dioxygène de l'air (O_2) pour former de l'ozone (O_3). Le NO peut réagir avec l' O_3 pour reformer du NO_2 . Ce cycle peut aboutir à une situation d'équilibre des concentrations d' O_3 . Cependant, en présence de composés organiques volatils (COV) émis par les activités industrielles ce cycle est perturbé. Ces COV réagissent avec les radicaux présents dans l'atmosphère pour former des COV_{Ox} . Les COV_{Ox} , tout comme les COV biogéniques émis par la végétation (COVB), alimentent le cycle de formation de l' O_3 . Ils entrent en effet en compétition avec l' O_3 pour réagir avec le NO et reformer du NO_2 . L' O_3 n'est plus consommé et s'accumule. En période de fort ensoleillement et de fortes chaleurs comme c'est le cas en été, ces réactions sont à l'origine de pics de pollution à l' O_3 . Ces pics sont maximums dans l'après-midi car l'irradiation solaire et par conséquent les réactions photochimiques sont maximales (*Adapté de Blayac et al., 2022*).

Les aérosols secondaires que nous considérons dans nos simulations d'épisodes de pollution urbains sont les Aérosols Organiques Secondaires (AOS), désignés ainsi car ils sont formés majoritairement de matière organique. Ils résultent ainsi de la conversion en particules des gaz présents dans l'atmosphère et représentent 70 à 80% de l'aérosol de pollution (204). Cette conversion, soit directement gaz-particule par condensation de précurseurs gazeux sur eux-mêmes (comme les COV par exemple), soit par condensation de molécules de gaz ou d'eau sur des nanoparticules préexistantes, est appelée nucléation et constitue le mécanisme de base pour la formation de nouvelles particules (PUF). D'autres phénomènes de condensation et d'adsorption de gaz à la surface des particules associés à des phénomènes de coagulation,

agrégation puis coalescence de plusieurs particules, participent à la formation d'aérosols secondaires de granulométrie plus élevée (PM_{2.5} et PM₁₀) (Figure 9). Les principaux précurseurs de ces AOS sont les NO_x et les nitrates, les COVB et les COV ainsi que l'ammoniac (NH₃).

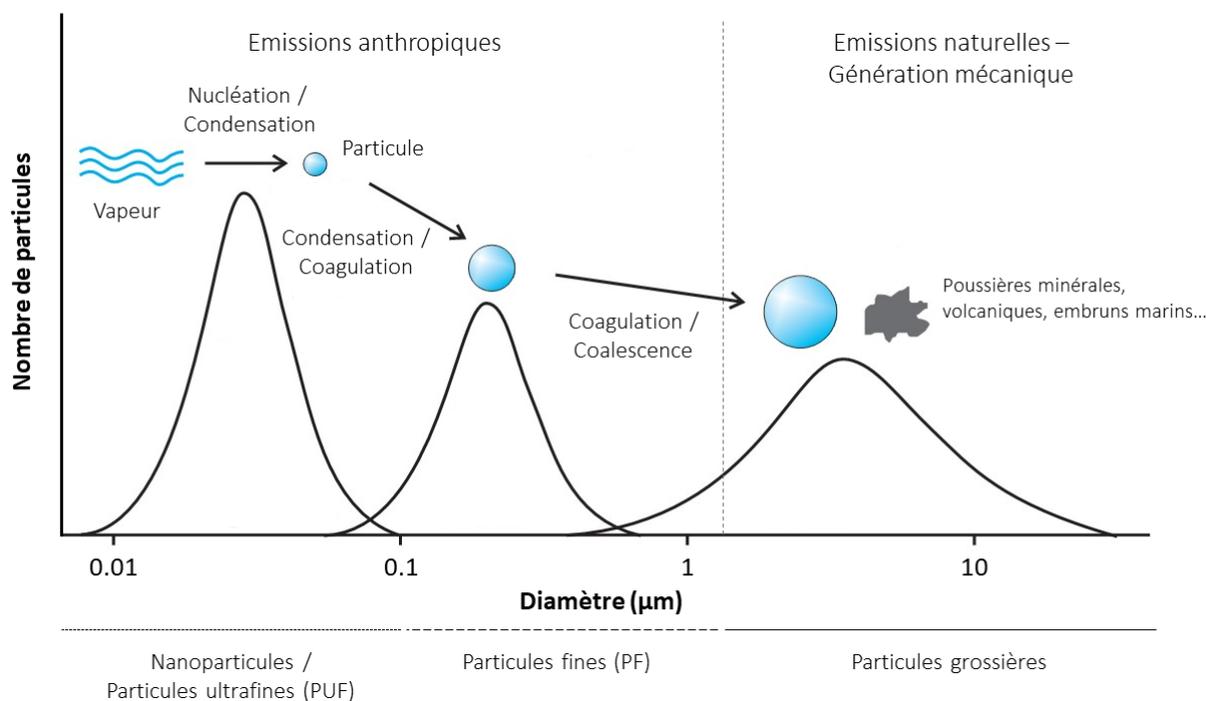


Figure 9 Distribution granulométrique des particules et formation des AOS résultant de processus d'oxydation photochimiques.

Une fois émis, les polluants ne restent pas sur leur site d'émission mais transportés dans l'atmosphère où leur temps de résidence est fonction des conditions météorologiques (208). Suite à des phénomènes de convection, les polluants montent en altitude et sont dispersés dans l'atmosphère. Leur déplacement est ensuite lié à celui des masses d'air (vent). La distance parcourue par les polluants dépend de leurs propriétés physico-chimiques. Les aérosols les plus fins pourront se déplacer sur de très longues distances alors que les grosses particules vont rapidement sédimenter. La durée de vie d'un aérosol est en moyenne de 7 à 10 jours après son émission (209,210). Après avoir été transportées, les particules finissent par se redéposer soit par dépôt sec avec la gravité soit lors d'épisodes de précipitations, c'est ce qu'on appelle le dépôt humide (203,211,212). La réactivité chimique des polluants, liée à leur composition, entre également en jeu dans le transport de ces derniers. Un polluant très réactif ne pourra logiquement pas être transporté loin de son site d'émission puisqu'il réagira quasiment instantanément après son émission. On peut citer par exemple, le radical hydroxyle (OH^{*}) qui

réagit quasi instantanément après sa production et n'est transporté que sur quelques mètres tout au plus (203). Au contraire, des polluants peu réactifs comme le CH₄, les chlorofluorocarbones ou les polluants organiques persistants (HAP, polychlorobiphényles, dioxines, furanes) vont être transportés sur de longues distances par rapport à leur site initial de production (jusqu'à 10 000 km) et resteront dans l'atmosphère pendant plusieurs dizaines voire une centaine d'années (203). La contamination de l'atmosphère devient ainsi globale et affecte même des zones dépourvues de sources d'émission (Arctique, Antarctique).

2.1.4 Métrologie de la qualité de l'air

Face aux préoccupations grandissantes de santé publique concernant la pollution atmosphérique, la qualité de l'air a été amenée à être surveillée (Figure 10). Les concentrations de polluants sont ainsi contrôlées dans de nombreux pays à l'aide de stations de mesure de la qualité de l'air. Ces stations ont pour but de mesurer les concentrations en polluants de l'air dans une zone donnée. Les polluants classiquement surveillés, car considérés comme des indicateurs globaux de la qualité de l'air, sont les NO_x, les particules (PM_{2.5} et PM₁₀), l'O₃, le SO₂ et le CO, et permettent d'intercomparer divers niveaux de pollution atmosphérique. Les stations de métrologie qualité de l'air réalisent des mesures en continu (mesures quart-horaire à horaire classiquement) et permettent ainsi un suivi en temps réel de la qualité de l'air.

Il existe différentes « typologies » de sites permettant de qualifier la pollution de l'air dans des environnements variés afin d'appréhender au mieux l'exposition réelle de la population. Les différentes typologies de stations sont les sites urbains (suivi de l'exposition moyenne de la population aux phénomènes de pollution atmosphérique dits "de fond" dans les centres urbains), les sites périurbains (suivi de la pollution photochimique notamment de l'ozone et de ses précurseurs, et éventuellement les polluants primaires et suivi du niveau moyen d'exposition de la population aux phénomènes de pollution atmosphérique dits "de fond" à la périphérie du centre urbain), les sites trafic (suivi des informations sur les concentrations mesurées dans des zones représentatives du niveau maximum d'exposition auquel la population, située en proximité d'une infrastructure routière, est susceptible d'être exposée), les sites ruraux (surveillance de l'exposition des écosystèmes et de la population en milieu rural à la pollution atmosphérique « de fond », notamment photochimique, à l'échelle régionale) et enfin les sites industriels (fourniture d'informations sur les concentrations mesurées

dans les zones représentatives du niveau maximum auquel la population riveraine d'une source fixe est susceptible d'être exposée par des phénomènes de panache ou d'accumulation).

D'autres outils viennent compléter la mesure directe des polluants en stations en prédisant la qualité de l'air comme c'est le cas en météorologie. Il s'agit des modèles de chimie transport. À partir des flux d'émissions et de données météorologiques, ces modèles permettent de prédire dans le temps (réactivité chimique) et dans l'espace (transport), l'évolution d'un panache de polluants. L'utilité de ces modèles réside en la capacité à estimer, en tout point d'une zone géographique donnée, les concentrations de polluants pour des périodes passées, présentes ou futures.

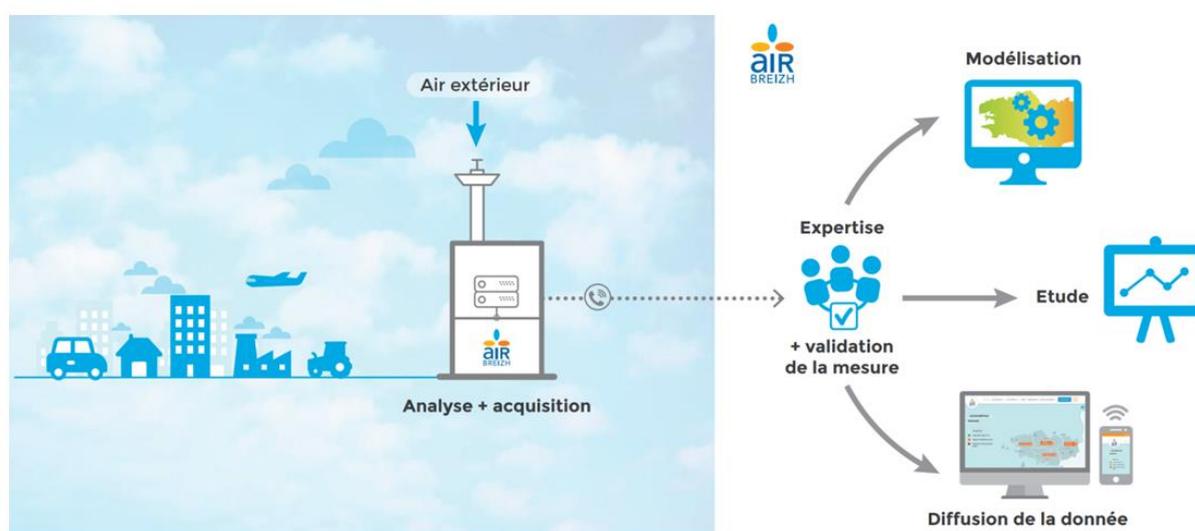


Figure 10 Production et diffusion des données de Qualité de l’Air : l’air ambiant est capté par les stations afin d’être analysé par du matériel de mesure spécifique, étalonné et vérifié systématiquement. Les données acquises par les appareils de mesure sont transmises à un serveur central, afin d’y être consolidées et validées par une équipe de spécialistes, experts dans l’analyse de ces mesures. Une fois validées, ces données servent à alimenter trois grands axes de travail : 1/ la modélisation qui en associant les mesures de terrain avec les données d’inventaires des émissions et les données météorologiques permet d’obtenir des prévisions de qualité de l’air à $j+1$, $j+2$, ... 2/ la diffusion des données pour informer le citoyen sur la qualité de l’air qu’il respire 3/ dans certains cas (selon les pays) une centralisation des données au niveau national voire un rapportage à plus haut niveau (européen...) (*Adapté de <https://www.airbreizh.asso.fr/mesure/>*).

2.1.5 Réglementation de la qualité de l’air

Les mesures de concentration en polluants effectuées en stations ou modélisées par les modèles de chimie transport sont à interpréter en connaissance de la réglementation en vigueur propre à chaque pays. En France, ce sont les normes européennes de la directive de 2008 qui

sont appliquées. Le Tableau 1 présente les valeurs limites ou valeurs seuils à ne pas dépasser afin d'éviter, de prévenir ou de réduire les effets nocifs du polluant correspondant sur la santé. A l'échelle mondiale, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) émet des recommandations relatives à la qualité de l'air. Celles-ci traduisent l'état actuel des connaissances scientifiques sur les effets de la pollution de l'air sur la santé mais ne constituent pas une réglementation à respecter. Il est à noter qu'en 2021, l'OMS a révisé ses lignes directrices mondiales sur la qualité de l'air devenues plus exigeantes que les précédentes au regard des effets néfastes sur la santé de la pollution atmosphérique, ceci à des concentrations encore plus faibles que celles considérées auparavant (Tableau 1) (213,214). Ces recommandations sont complétées par des valeurs cibles intermédiaires qui constituent des objectifs de qualité intermédiaires (Tableau 1). Ceux-ci visent à guider les efforts de réduction de pollution en vue d'atteindre les niveaux des lignes directrices dans les pays où les niveaux de polluants sont très largement dépassés.

Tableau 1 Valeurs limites européennes et recommandations de l'OMS relatives à la qualité de l'air.

Polluant	Durée d'exposition	Normes UE 2008	Recommandations de l'OMS		Cibles intermédiaires			
			2005	2021	1	2	3	4
PM_{2,5} ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	Annuel	25	10	5	35	25	15	10
	24h	-	25	15	75	50	37,5	25
PM₁₀ ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	Annuel	40	20	15	70	50	30	20
	24h	50	50	45	150	100	75	50
NO₂ ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	Annuel	40	40	10	40	30	20	-
	24h	-	-	25	120	50	-	-
	1h	200	200	-	-	-	-	-
O₃ ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	Saison de pointe *	-	-	60	100	70	-	-
	8h **	120	100	100	160	120	-	-
SO₂ ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	24h	125	20	40	125	50	-	-
	1h	350	-	-	-	-	-	-
	10 min	-	500	500	-	-	-	-

	24h	-	-	4	7	-	-	-
CO (mg/m ³)	8h	10	10	10	-	-	-	-
	1h	-	35	35	-	-	-	-
	15 min	-	100	100	-	-	-	-

Les valeurs présentées dans ce tableau sont des concentrations moyennes sur la durée d'exposition indiquée.

* Moyenne de la valeur maximale d'O₃ sur 6 mois consécutifs avec la plus forte concentration en O₃ des moyennes glissantes sur 6 mois

** Moyenne de la valeur maximale d'O₃ sur 8h

Avec près de 85% de notre temps passé dans des lieux clos, la qualité de l'air intérieur est elle aussi surveillée. Une mauvaise aération et une mauvaise ventilation peuvent en effet entraîner une pollution 5 fois plus grande en milieu intérieur par rapport au milieu extérieur. Les recommandations concernant les polluants présentés dans le Tableau 1 restent valables en milieu intérieur. Des recommandations supplémentaires et spécifiques à certains COV évoqués plus haut et particulièrement abondants en environnement intérieur ont été émises par l'OMS en 2009 (215).

2.1.6 Niveaux de pollution mondiaux actuels

Dès les années 1770, la révolution industrielle marque le début d'une époque de transition d'une société agricole vers une société industrialisée tournée vers la mécanisation des procédés grâce à la combustion d'énergies fossiles. Cette combustion d'énergies fossiles, qui produit énormément de gaz à effet de serre, a conduit à accroître la pollution atmosphérique mondiale. Si depuis les années 1990-2000 on note une baisse progressive des émissions de polluants et de leurs concentrations dans l'air dans les pays développés d'Amérique du Nord et d'Europe (216–218), les niveaux de pollution restent toutefois à des niveaux très élevés. En effet en 2019, 99% de la population mondiale respiraient un air pollué ne respectant pas les limites recommandées par l'OMS, tous polluants confondus (219). Ainsi, 99% de la population est donc exposée à des concentrations de polluants pour lesquelles des effets sur la santé sont observés. La Figure 11 montre, pour 6 polluants pris en exemple, la proportion de la population européenne exposée à des concentrations moyennes annuelles de polluants supérieures aux normes UE et aux recommandations de l'OMS. Si la part de dépassement des normes UE apparaît faible en comparaison avec celui des recommandations OMS, cela s'explique par des valeurs seuils beaucoup moins exigeantes en Europe que celles établies par l'OMS (Tableau 1). Pour autant, les niveaux sont suffisamment élevés pour provoquer des effets sur la santé.

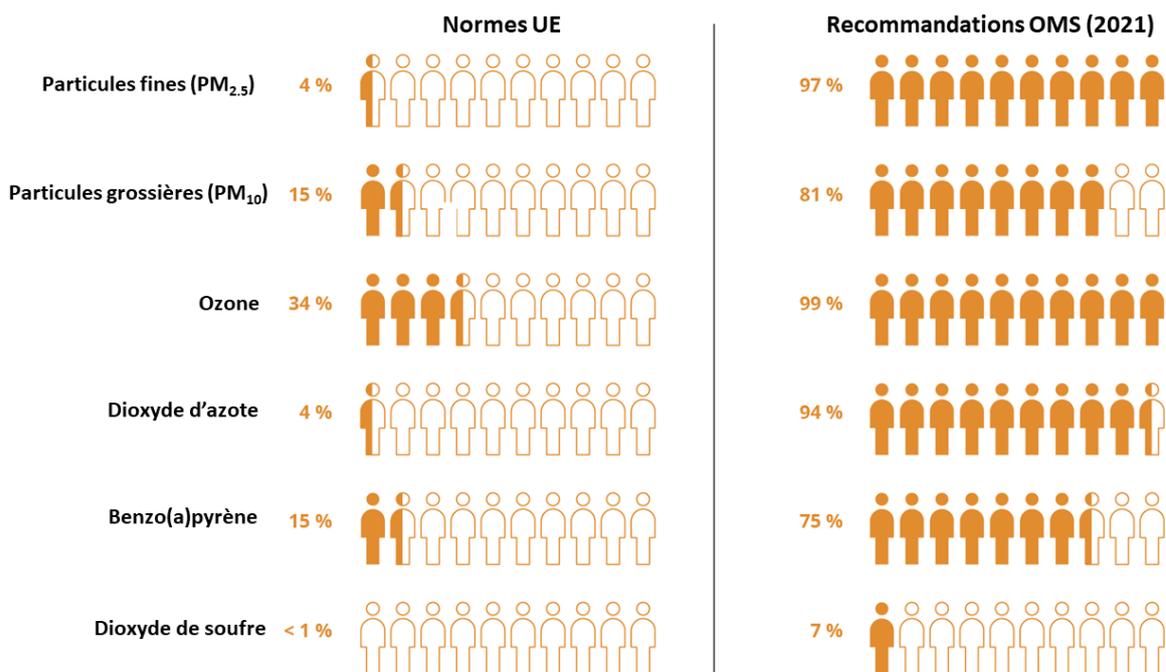


Figure 11 Part de la population européenne vivant dans des lieux excédant les normes UE et les recommandations OMS relatives à la qualité de l'air (*Adapté de l'Agence Européenne de l'Environnement*).

A titre d'exemple pour la pollution aux particules fines, on constate que la moitié de la population mondiale vit dans des régions où la valeur cible intermédiaire la moins exigeante, égale à $35 \mu\text{g}/\text{m}^3$, est dépassée (Figure 12). De plus, 65%, 81% et 92% de la population vivent, respectivement, dans des régions où les valeurs cibles intermédiaires 2, 3 et 4 des $\text{PM}_{2,5}$ sont également dépassées (220) (Tableau 1). On observe par ailleurs une forte disparité dans les niveaux d'exposition en fonction de l'index sociodémographique des régions. Ainsi, les régions les plus polluées aux $\text{PM}_{2,5}$ correspondent aux pays les plus pauvres et à ceux en voie de développement situés en Afrique, en Asie et au Moyen-Orient dépassant plus de 10 fois la limite fixée par l'OMS (Figure 12) (220). Ces pays ont vu leur exposition aux $\text{PM}_{2,5}$ augmenter depuis 2010 en raison d'une urbanisation à grande échelle et un développement économique basé sur l'utilisation de combustibles fossiles (biomasse, charbon, pétrole). L'utilisation dans un cadre domestique de ces derniers pour la cuisson et le chauffage engendre des fumées riches en $\text{PM}_{2,5}$ à l'origine d'une pollution de l'air intérieur (Figure 12). Les pays d'Afrique subsaharienne, d'Asie du Sud et d'Asie de l'Est combinent de ce fait une forte pollution de l'air extérieur et de l'air intérieur.

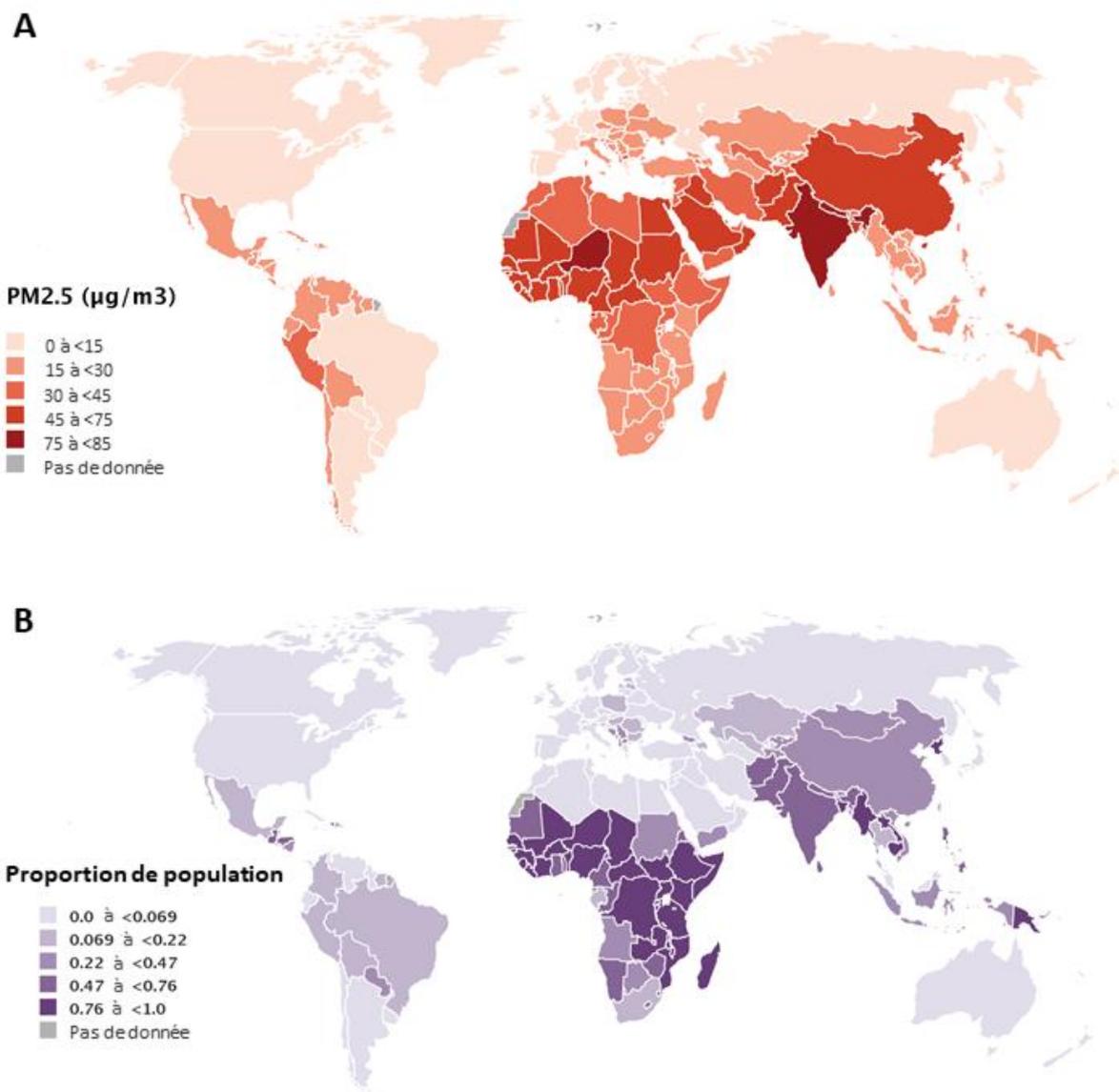


Figure 12 Cartes des concentrations moyennes annuelles de $PM_{2.5}$ en 2019 (A) et de la proportion de la population utilisant des combustibles fossiles à domicile (B) (Adapté de *Health Effects Institute, State of Global Air Rapport 2020*).

2.2 Effets sur la santé

2.2.1 Mortalité

La pollution atmosphérique n'est pas sans effet sur la santé humaine. Avec près de 7 millions de décès prématurés par an à l'échelle mondiale, la pollution de l'air se classe à la 4^{ème} place des facteurs de risque de mortalité au monde derrière l'hypertension artérielle, le tabac et le régime alimentaire (220). Elle constitue aujourd'hui le plus grand risque environnemental pour la santé. De nombreuses études épidémiologiques ont en effet montré que la pollution atmosphérique était associée à une augmentation de la mortalité, toutes causes de décès

confondues (maladies respiratoires chroniques comme l'asthme et la bronchopneumopathie chronique obstructive – BPCO, pneumonies, accident vasculaire cérébral, cardiopathie ischémique, diabète, ou encore cancer pulmonaire) aussi bien pour des expositions à court terme que pour des expositions sur le long terme (221–225). La charge de mortalité associée à la pollution atmosphérique va en augmentant et est inégale entre les pays à haut revenu et les pays à revenu faible ou intermédiaire. Cette inégalité est à mettre en relation avec les différences d'exposition évoquées précédemment (Figure 12). Les pays les plus touchés présentent les plus forts taux de mortalité attribuables à la pollution atmosphérique, à la fois chez les adultes et les nouveau-nés, et sont notamment situés en Afrique, en Asie et au Moyen-Orient (Figure 13). Dans ces régions, la pollution atmosphérique fait chaque année 1 à 2 millions de morts. En comparaison, en Europe, la pollution de l'air est responsable de près de 370 000 décès prématurés par an (226) et 250 000 en Amérique (227). En France, on estime à 48 000 le nombre de décès prématurés causés par la pollution de l'air (228). Ces effets ont été montrés pour des concentrations excédant les seuils réglementaires soit considérés comme des niveaux de pollution dangereux pour la santé. Cependant, 3 études récentes ont montré que ces effets de la pollution sur la mortalité étaient également observés à des niveaux faibles définis comme des concentrations étant inférieures aux limites recommandées (229–231). Si la charge de mortalité est disparate en fonction des régions il est à noter qu'elle est également inégale en fonction de l'âge et du statut physiopathologique des individus. Les adultes de plus de 55 ans et les nouveau-nés de moins d'un mois ainsi que les individus atteints de maladies chroniques constituent les populations les plus à risque face à la pollution atmosphérique (220,232).

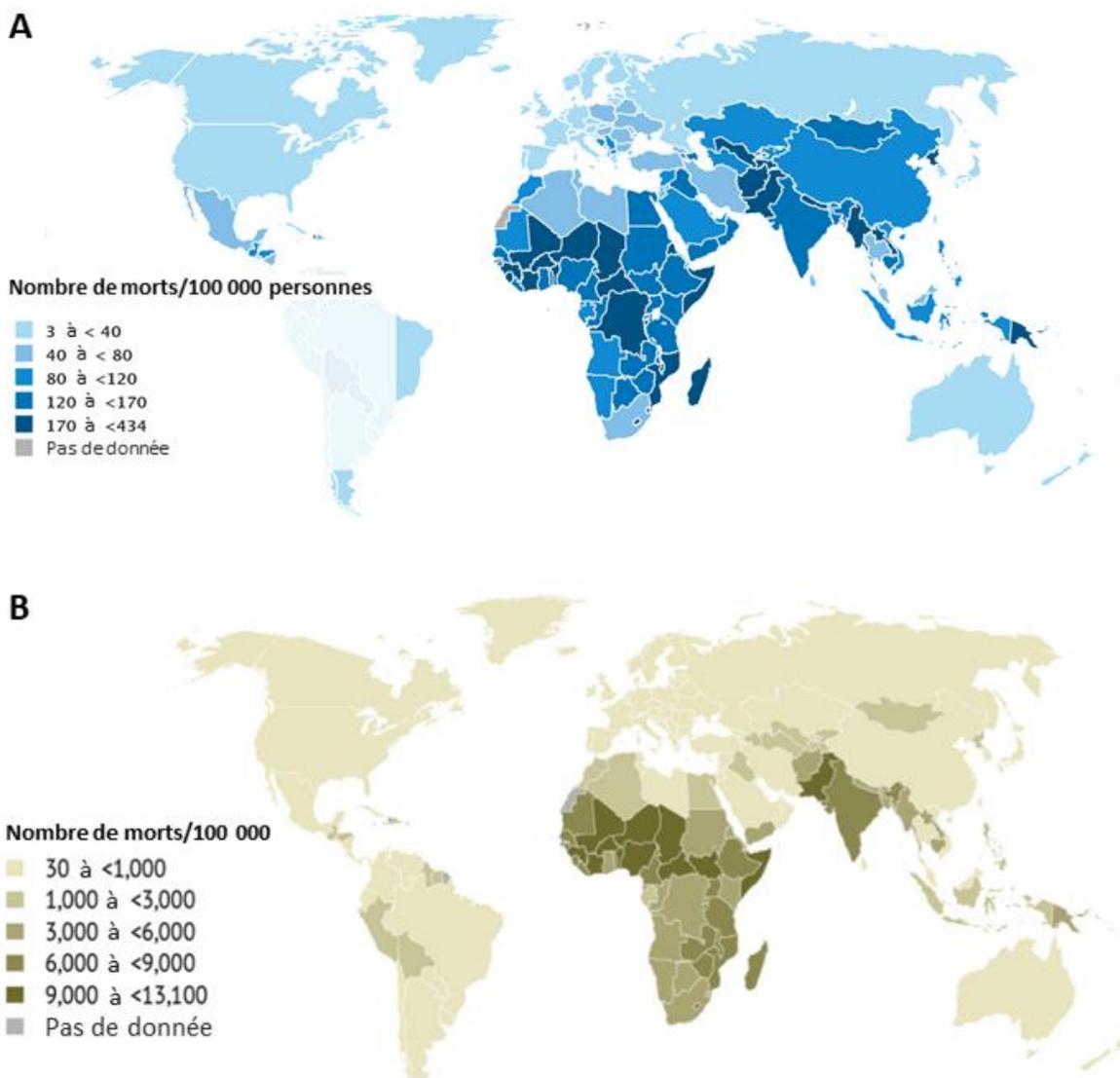


Figure 13 Taux de mortalité attribuables à la pollution atmosphérique totale chez les adultes (**A**) et chez les nouveau-nés (**B**) (*Adapté de Health Effects Institute, State of Global Air Rapport 2020*).

L'augmentation de morbidité et les décès prématurés causés par la pollution atmosphérique sont associés à une diminution de l'espérance de vie. La perte moyenne d'espérance de vie liée à la pollution atmosphérique totale est estimée entre 1 an et demi et 3 ans, celle-ci étant maximale en Afrique et en Asie (233,234). Le nombre total d'années en bonne perdues se situe autour de 233 millions par an dans le monde entier (234). Les $PM_{2.5}$ constituent les principaux déterminants de morbidité et de mortalité : à l'échelle mondiale, 60% des décès prématurés liés à la pollution atmosphérique sont dus aux $PM_{2.5}$ (220). Cette part monte jusqu'à 90% en Europe (226). Toujours à l'échelle mondiale, les particules fines sont responsables à elles seules d'une diminution de 1 an de l'espérance de vie (233,235). Néanmoins ces statistiques ne sont pas immuables, des effets bénéfiques sur la santé d'une réduction de la

pollution atmosphérique demeurant en effet possibles. Les projections sur le gain d'espérance de vie potentielle dans le cas où la concentration en $PM_{2.5}$ serait inférieure à $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$ est d'environ 7 mois (233,235). Avec un nombre de décès évitables de près de 5,5 millions, ce gain s'élèverait à presque 2 ans si toutes les émissions anthropiques étaient supprimées (234). D'autre part, de premières études portant sur la période de pandémie du COVID-19 ont montré, en Europe, en Asie (Chine, Inde) et au Mexique, une diminution du nombre de décès associée à la réduction de la pollution atmosphérique pendant le confinement (236–241).

2.2.2 Impacts sur la morbidité

a. Effets respiratoires chez l'adulte

Avec 12 00 litres d'air inhalés en moyenne par jour, les poumons constituent la cible privilégiée des polluants atmosphériques. Les effets nocifs de la pollution atmosphérique sur le système respiratoire ont été documentés dans de nombreuses études avec des effets observés aussi bien après des expositions aiguës que chroniques.

À court terme, les particules, les NO_x , l' O_3 et le SO_2 sont de puissants irritants pour les voies aériennes supérieures (nez et gorge) et provoquent de la toux et des difficultés à respirer (sifflements à l'inspiration, essoufflement). Ces effets à court terme surviennent dans les minutes qui suivent l'exposition et peuvent se faire ressentir jusqu'à 1 à 2 jours plus tard. Chez des individus sains, une diminution de la fonction respiratoire est observée dans les 24 à 48 heures suivant une exposition aux $PM_{2.5}$, au NO_2 et à l' O_3 (242). Une exposition à la pollution atmosphérique est associée, à court terme, à une augmentation des admissions hospitalières pour cause d'infections respiratoires, aggravation de pathologies respiratoires telles que l'asthme et la BPCO et augmentation des symptômes de maladie cardiovasculaire (221,243,244). Chez les patients atteints d'asthme ou de BPCO, les hospitalisations sont associées à une augmentation des épisodes d'exacerbation caractérisés par une poussée aiguë des symptômes (toux, sifflement, essoufflement, oppression thoracique, hypersécrétion de mucus) et une diminution de la fonction respiratoire. (221,245,246).

Sur le long terme, outre une augmentation de la mortalité évoquée précédemment (247), la pollution atmosphérique ($PM_{2.5}$, NO_2 , O_3) a pour effet majeur de diminuer la fonction respiratoire (248–250). D'autre part, dans ce contexte d'exposition à long terme, les études réalisées sur le lien entre pollution et infection respiratoire et entre pollution et exacerbation de pathologies préexistantes (asthme et BPCO) ont été jusqu'à présent peu concluantes

(243,244,251). Certaines études ont en revanche montré une augmentation du risque d'asthme avec une exposition aux COV en milieu intérieur. Ces résultats restent à confirmer car les études sont contradictoires (252–254). Pour autant, la pollution pourrait jouer un autre rôle puisqu'elle participerait à la pathogénèse de ces maladies. En effet, la contribution de la pollution atmosphérique dans le développement de l'asthme est avancée avec un niveau de confiance élevé (251,255) et sa participation dans le développement de la BPCO est de plus en plus suggérée (255–260). Cette contribution est observée même à des faibles niveaux de pollution (261,262). La pollution atmosphérique pourrait finalement également jouer un rôle dans l'interaction de ces 2 maladies. En effet, s'il a été montré que les patients asthmatiques étaient prédisposés à développer une BPCO (263), il semblerait que la pollution aux particules fines puisse constituer un facteur de risque à la progression de l'asthme vers la BPCO (264). Ces résultats restent à confirmer.

Enfin, la pollution atmosphérique totale, c'est-à-dire considérée en tant que mélange, a été classée en 2013 dans le groupe 1 du Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC) et appartient ainsi à la classe des cancérigènes avérés pour l'Homme (265). Elle est en particulier associée à une augmentation de l'incidence des cancers pulmonaires (266). De même depuis 2010, la combustion de charbon à usage domestique est classée dans le groupe 1 du CIRC tandis que la combustion de biomasse est elle considérée comme agent probablement cancérigène pour l'Homme -groupe 2A) (267).

b. Effets respiratoires chez l'enfant

La gestation constitue une fenêtre d'exposition critique car le fœtus est en cours de développement (268). Chez des femmes enceintes exposées à la pollution, un retard de la croissance fœtale a majoritairement été décrit. Il a été montré qu'une exposition aux PM_{2.5} et PM₁₀, au NO₂ et au CO pendant toute la durée de la grossesse augmentait le risque de petit poids du bébé à la naissance (251,269–272). Ce risque reste significatif si l'exposition est considérée seulement sur le 3^{ème} trimestre de grossesse (269). Pour les particules, la petite taille du bébé n'est pas seulement observée à la naissance mais également à tout âge gestationnel considéré (251,273). D'autres études ont montré une augmentation de la prématurité associée à une exposition aux particules (PM_{2.5} et PM₁₀), au NO₂ et à l'O₃ (273–277). Une association entre une exposition à la pollution en milieu intérieur due à l'utilisation de combustibles fossiles et le risque de mortinaissance, décès du bébé après 28 semaines de grossesse ou à l'accouchement, a également été rapportée (278). Un retard de croissance du fœtus à la

naissance constitue un facteur de risque de mortalité précoce. Ainsi, ce retard de croissance participe à la charge de morbidité néonatale attribuable à la pollution de l'air (274).

Après la naissance, les enfants constituent une population particulièrement à risque car leurs poumons ne sont pas totalement développés. En effet, 80% des alvéoles se forment après la naissance et le développement pulmonaire continue jusqu'à l'adolescence (268,279). À cette vulnérabilité s'ajoute une exposition potentiellement plus élevée ; les enfants ont une fréquence respiratoire et ventilation minute plus élevées et sont souvent plus actifs que les adultes. Ils inhalent ainsi plus de polluants qui pourraient, de surcroît, rester plus longtemps dans leurs poumons car leur système immunitaire est encore immature (280). Une exposition courte aux particules, à l'O₃ ou encore au NO₂ provoque chez les enfants comme chez les adultes une irritation des voies respiratoires et des difficultés à respirer (276,281). Une diminution de la croissance pulmonaire, estimée par une réduction de l'augmentation du VEMS sur une période de 8 ans, a été observée chez des enfants exposés à des niveaux élevés de NO₂, particules, suies, vapeurs acides (acide formique, acide acétique, acide nitrique et hydrochlorique) et chez ceux vivant à proximité d'axes routiers (282–285). À cette diminution de la croissance pulmonaire est associée une diminution de la fonction respiratoire qui serait par ailleurs persistante au début de l'âge adulte (276,284–287). D'autre part, une exposition à la plupart des indicateurs de pollution intérieure et extérieure (PM, suies, NO₂, O₃, SO₂, COV) augmente les symptômes et les hospitalisations pour complications respiratoires de pathologies de type asthme et allergies ainsi que le risque de développer ces pathologies (251,276,281,288–292). Enfin, une exposition à la pollution atmosphérique et notamment aux particules est associée à un risque augmenté de développer des infections respiratoires (276,293,294).

c. Autres effets systémiques

Outre les effets respiratoires qui viennent d'être décrits, la pollution est également reconnue comme un élément contributeur dans le développement d'affections extra-pulmonaires. En effet, si les poumons constituent la porte d'entrée des polluants dans l'organisme, leurs effets ne se limitent toutefois pas qu'à l'appareil respiratoire (295). Parmi les effets décrits, une exposition aux particules est associée à des maladies cardiovasculaires ischémiques et augmentent le risque de survenue d'infarctus du myocarde, d'accident vasculaire cérébral et d'insuffisance cardiaque (296,297). Ces effets pourraient être promus par une dérégulation des mécanismes de thrombose et d'athérosclérose (298,299). Les effets du CO sont aussi bien connus. Celui-ci provoque une fatigue et une confusion générale. L'affinité du

CO pour l'hémoglobine est 200 fois supérieure à celle de l'oxygène (300). En présence de CO, la biodisponibilité de l'oxygène diminue ce qui affecte significativement le fonctionnement du cœur et du cerveau. Au niveau du système nerveux, une exposition aux particules est associée à une diminution des fonctions cognitives et une augmentation de la démence (301,302). Chez les enfants la pollution pèse particulièrement sur le développement psychomoteur, l'apparition de troubles de l'attention et du spectre autistique ainsi que sur des altérations structurelles et morphologiques cérébrales (303–306). Au niveau métabolique, on observe une augmentation du risque de diabète de type II en lien avec une exposition aux PM_{2.5} et au NO₂ qui s'accompagne d'une augmentation de la morbidité et de la mortalité pour cause de diabète (307,308). La pollution atmosphérique liée au trafic routier pourrait également favoriser l'obésité chez l'enfant (309). Enfin, la composante particulaire fine et plus rarement les NO_x, pourraient contribuer à la survenue de cancers autres que le cancer des poumons. On peut citer en exemple le cancer de la vessie (310–314), le cancer du sein (315), le cancer des ovaires et du col de l'utérus (310,316,317), le cancer du cerveau (316,318,319) ou encore les cancers gastrointestinaux et des voies aérodigestives supérieures (317,320–323).

Ces effets systémiques sont dus en majeure partie aux particules. En effet, les particules ont la capacité de pénétrer profondément dans les poumons. Le dépôt des particules dans l'arbre respiratoire dépend de leur taille. Les particules les plus grosses, autour de 10 µm, restent dans les voies respiratoires supérieures. Les particules de taille inférieure au micromètre se déposent en partie dans les voies respiratoires supérieures mais pénètrent également jusqu'aux bronches et même jusqu'aux alvéoles où le dépôt est maximum pour les particules d'une dizaine de nanomètres (Figure 14) (324). Cette considération est fondamentale car ces PUF peuvent ensuite franchir la membrane alvéolo-capillaire et rejoindre la circulation sanguine (325). Une fois dans le compartiment sanguin, les PUF peuvent se disperser dans tout l'organisme et ainsi exercer des effets sur des organes loin de leur point d'entrée. Parmi ces organes, le cerveau tient une place particulière car les PUF peuvent en plus y être transloquées directement via le nerf olfactif ou par les jonctions endothéliales de la barrière hématoencéphalique (326–330). Les effets observés chez les jeunes enfants pourraient eux être expliqués par la translocation placentaire des PUF (331).

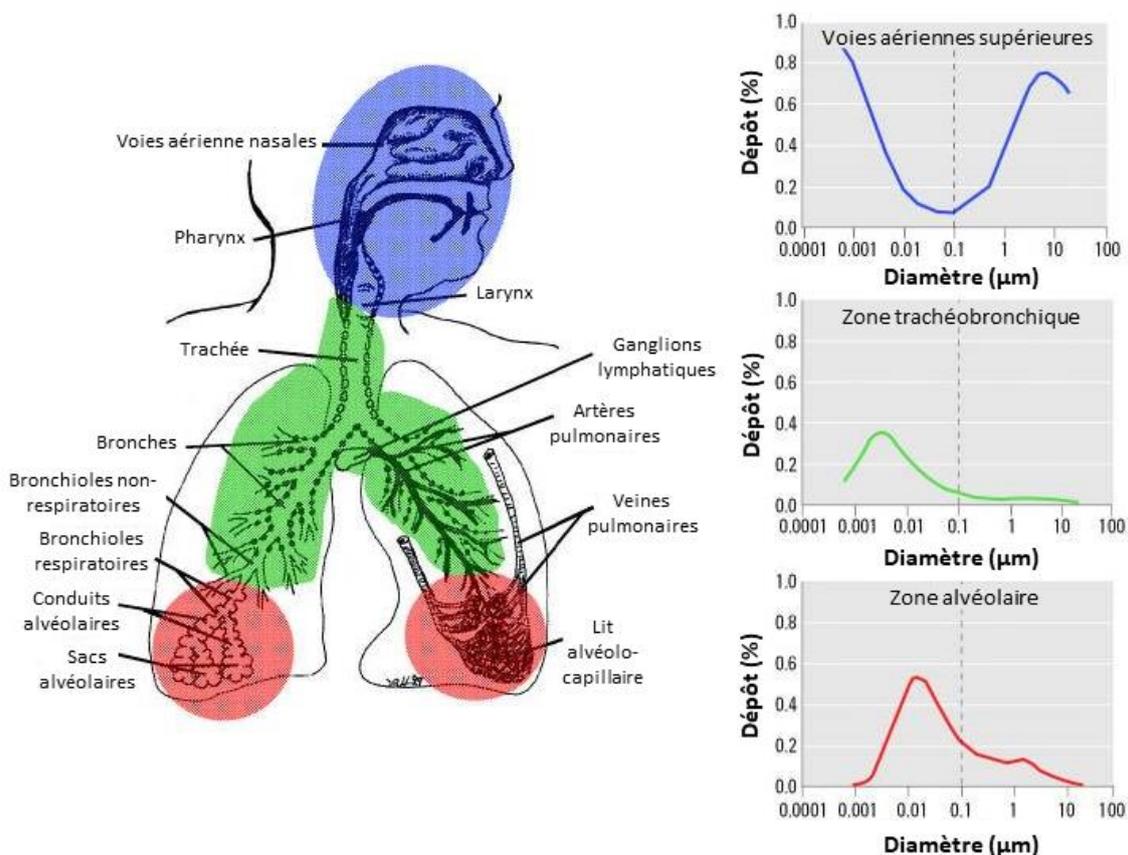


Figure 14 Dépôt des particules dans l'appareil respiratoire en fonction de leur taille (*Adapté d'Oberdörster et al., 2005*).

2.2.3 Mécanismes biologiques impliqués

Les études réalisées jusqu'à présent ont permis de mettre en évidence 3 grands mécanismes cellulaires communs aux effets induits par les polluants atmosphériques. Ainsi il a été montré que les particules sont responsables d'une réponse inflammatoire et cytotoxique, parfois dose-dépendante, caractérisée par la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et une diminution de la viabilité cellulaire (332,333). Les particules contiennent également des composés de type métaux de transition et quinones capables de déclencher des réactions d'oxydo-réduction aboutissant à la production d'ERO. Ces ERO (radicaux superoxyde O_2^{\bullet} et peroxyde d'hydrogène H_2O_2) entrent dans le fonctionnement de cycles redox permettant la formation de radicaux hydroxyle OH^{\bullet} , oxydants les plus puissants dans les systèmes biologiques qui conduisent à des dommages cellulaires et tissulaires (334). L' O_3 participe également à la génération d'un stress oxydant par déplétion des molécules antioxydantes et formation d'espèces oxydantes secondaires.

Ces mécanismes seront davantage détaillés dans le chapitre suivant dans un contexte spécifique de mucoviscidose.

En conclusion, la pollution atmosphérique correspond à un mélange complexe de centaines de composés gazeux et particulaires qui évolue à la fois dans le temps et dans l'espace. Cette pollution atmosphérique provient essentiellement d'émissions anthropiques par le trafic routier, les activités industrielles et l'agriculture. A l'échelle mondiale, la pollution atmosphérique atteint des niveaux excédant largement les seuils recommandés par l'OMS. Ces seuils, destinés à protéger la santé des individus, correspondent aux concentrations de polluants à partir desquelles des effets néfastes sont observés sur la santé. Ces effets correspondent entre autres à une diminution de la fonction respiratoire à la fois chez l'adulte et chez l'enfant, une augmentation de la morbidité des patients atteints de pathologies respiratoires, une augmentation de la mortalité et une augmentation du risque de développer un cancer pulmonaire. Toutefois, si l'appareil respiratoire est la cible privilégiée de la pollution atmosphérique, les autres organes ne sont pour autant pas épargnés : maladies cardiovasculaires, troubles cognitifs, maladies métaboliques, cancers autres que celui des poumons ... D'un point de vue mécanistique ces effets impliquent de manière commune le déclenchement de phénomènes inflammatoires et oxydatifs.

3 Impacts de la pollution atmosphérique sur le cours de la mucoviscidose

Comme présenté en première partie, l'expression de la mucoviscidose est déterminée par le génotype de *CFTR* mais dépend également d'autres facteurs modulateurs, d'origine génétique ou environnementale. Parmi les facteurs environnementaux évoqués plus haut et celui constituant le cœur de mon travail, on peut citer la pollution atmosphérique. Bien que celle-ci constitue une préoccupation plutôt contemporaine, ses effets sur la santé chez des sujets vulnérables mais également chez des individus sains ne sont plus à démontrer. Dans un contexte où la pollution de l'air atteint des niveaux critiques et où les patients atteints de mucoviscidose, qui constitue une population particulièrement à haut risque, vivent de plus en plus vieux tout en étant diagnostiqués de plus en plus tôt, il est d'un intérêt particulier de prendre en considération les effets éventuels nocifs de la pollution atmosphérique sur le cours de la maladie. L'objectif de cette dernière partie introductive est de présenter une synthèse des études menées jusqu'à présent sur l'implication de la pollution atmosphérique dans la physiopathologie de la mucoviscidose ainsi que d'explorer les mécanismes biologiques sous-jacents. Cette synthèse bibliographique a par ailleurs donné lieu à la publication d'une revue (190) (Annexe 1).

3.1 Études épidémiologiques

À ce jour, seules 7 études épidémiologiques se sont intéressées aux effets de la pollution atmosphérique chez des individus atteints de mucoviscidose : 5 concernent les effets d'une exposition chronique ; les 2 autres concernent les effets d'une exposition aiguë (Tableau 2).

Tableau 2 Résumé des associations significatives trouvées dans les études épidémiologiques

Étude Auteur/Année (Référence)	Nombre de participants	Polluants	Paramètre clinique		
			Nombre d'exacerbations	Fonction pulmonaire	Infection primaire
<i>Études chroniques</i>					
Goss, 2004 (335)	11 484	PM _{2.5} , PM ₁₀ , O ₃	↗	↘	N.A
Jassal, 2013 (336)	145	Distance Domicile- Route principale	↗	N.A	N.A
Psoter, 2015 (337)	3 575	PM _{2.5}	N.A	N.A	↗ <i>P.aeruginosa</i>
Psoter, 2017 (338)	3 012 – 4 255	PM _{2.5}	N.A	N.A	↗ MRSA
Carson, 2022 (339)	765 – 1 432	Tabagisme passif, chauffage à air pulsé	Pas d'effet sur les exacerbations mais ↗ taux d'hospitalisation	↘	N.A
<i>Études aigües</i>					
Goeminne, 2013 (340)	215	PM ₁₀ , O ₃ , NO ₂	↗	N.A	N.A
Farhat, 2013 (341)	103	O ₃	↗	N.A	N.A

N.A = Non applicable

3.1.1 Études chroniques

La première étude chronique date de 2004 (335). Goss et al. ont cherché à relier plusieurs données d'exposition de pollution atmosphérique (moyennes annuelles de PM_{2.5}, PM₁₀, O₃, NO₂, SO₂, CO) aux données d'exacerbations, de fonction pulmonaire et de mortalité de patients enfants et adultes atteints de mucoviscidose. Les auteurs ont ainsi montré qu'une augmentation de la concentration en PM_{2.5}, en PM₁₀ et en O₃ était associée à un risque accru de survenue d'exacerbations. De plus, une association négative a pu être mise en évidence entre une exposition aux particules et le VEMS témoignant d'une diminution de la fonction pulmonaire.

Dans une seconde étude, Jassal et al. ont été les premiers à décrire l'influence de la proximité du trafic routier sur l'état clinique des patients atteints de mucoviscidose par opposition aux mesures classiques quantitatives des concentrations en polluants (336). Ils ont en effet utilisé la distance entre le domicile du patient et l'axe routier le plus proche comme proxy de l'exposition à la pollution particulaire due au trafic sur le long terme. Les résultats suggèrent que plus un patient vit proche d'une route à grande circulation, plus il est susceptible de connaître des phénomènes d'exacerbation.

Le rôle de la pollution atmosphérique dans la susceptibilité des patients à développer des infections respiratoires n'est pas bien décrit. Psoter et al. ont émis l'hypothèse qu'une exposition à la pollution atmosphérique pourrait augmenter le risque d'infection précoce à certains pathogènes respiratoires chez les jeunes enfants mucoviscidosiques. Les auteurs ont ainsi montré que le risque de primo-infection par *P.aeruginosa* et MRSA (forme résistante de *S.Aureus* à la méticilline – Methicillin Resistant *Staphylococcus Aureus*) était plus élevé chez les enfants exposés à de plus fortes concentrations de PM_{2,5} (337,338).

Enfin, Carson et al. ont récemment publié la seule étude s'intéressant à ce jour aux effets de la pollution de l'air intérieur chez des patients atteints de mucoviscidose (339). Dans cette étude, une exposition à la fumée de cigarette et au chauffage à air pulsé a pu être significativement reliée à une augmentation du déclin de la fonction pulmonaire dans la population pédiatrique. Chez les adultes, seule l'exposition à la fumée de cigarette entraîne une augmentation du taux d'hospitalisation, toutes causes confondues. Néanmoins, aucun effet sur les exacerbations pulmonaires n'a été relevé.

3.1.2 Études aiguës

En 2013, Goeminne et al. (340) ont exploré le lien entre l'augmentation à court terme de la concentration en PM₁₀, en O₃ et en NO₂ et la survenue d'exacerbations. L'analyse des données a montré une augmentation du risque d'exacerbations chez les patients mucoviscidosiques les jours de forte pollution de l'air. De la même manière, Farhat et al. ont comparé la survenue d'exacerbations respiratoires aux concentrations journalières moyennes des mêmes polluants dans la métropole de Sao Paulo. Ils ont ainsi rapporté un risque accru d'exacerbations lorsque la concentration en O₃ augmentait (341).

En complément de ces 2 études, Roca-Barcelo et al. se sont intéressés aux bioaérosols d'*Aspergillus Fumigatus* émanant d'usines de compostage en Angleterre (342). Aucune des

données recueillies dans cette étude n'a permis de mettre en évidence une association entre l'émission de ces bioaérosols et le risque d'admission hospitalière pour cause respiratoire chez des patients atteints de mucoviscidose.

3.2 Etudes expérimentales

Si les études épidémiologiques montrent que la pollution atmosphérique contribue à augmenter la morbidité de la mucoviscidose, les mécanismes cellulaires impliqués restent mal connus. Ces derniers ont été étudiés à l'aide de modèles animaux et cellulaires.

3.2.1 Études *in vivo*

Un certain nombre d'études se sont intéressées aux effets de la pollution chez des modèles *in vivo* de maladies obstructives telles que l'asthme et la BPCO. Pour autant, les données concernant la mucoviscidose restent pauvres. Les études *in vivo* sur modèles animaux CF sont en effet au nombre de 2.

Une instillation de nanoparticules d'or chez un modèle de souris *Scnn1b-Tg* a permis de montrer une augmentation du dépôt de ces nanoparticules à la surface de l'épithélium et de leur internalisation par les cellules épithéliales alvéolaires par rapport aux souris sauvages (343). Ce résultat suggère une efficacité moindre des macrophages alvéolaires dans la clairance de ces nanoparticules. Cette altération de l'internalisation des nanoparticules a été retrouvée chez le modèle de souris *Cftr^{tm1HGU}* – souris présentant une expression nettement diminuée mais résiduelle de CFTR (344,345) – où la clairance de nanoparticules de dioxyde de titane s'est retrouvée diminuée chez les souris mutées par rapport aux souris sauvages (346). Ces résultats sont en outre corroborés par la diminution de la phagocytose de particules carbonées par des macrophages provenant d'enfants atteints de mucoviscidose (347). L'instillation de nanoparticules de carbone, nanoparticules particulièrement abondantes en milieu urbain, a par ailleurs provoqué chez le modèle *Cftr^{tm1HGU}* une réponse inflammatoire aiguë et transitoire à dominance neutrophilique et pour laquelle la phase de résolution a été moins efficace chez les souris mutées (346). Ces résultats mettent ainsi en lumière une susceptibilité pulmonaire potentiellement accrue chez les personnes atteintes de mucoviscidose qui pourrait s'avérer problématique lors d'expositions répétées à des stimuli inflammatoires telle que la pollution atmosphérique. Dans ces conditions, une résolution insuffisante de l'inflammation associée à

une interaction privilégiée et prolongée des nanoparticules avec les cellules épithéliales faciliterait l'installation d'une condition inflammatoire chronique et la progression de la maladie.

D'autre part, il a été montré qu'une exposition à l'O₃ et aux particules diesel diminuait l'expression de CFTR chez le rat et la souris respectivement (348,349). Une augmentation de l'expression des mucines, une métaplasie des cellules à mucus et une altération de la clairance muco-ciliaire en réponse à l'O₃, au SO₂ et aux particules ont également été observées (349–354). Ces résultats, bien qu'obtenus chez des modèles non-CF, montrent le potentiel rôle aggravant de la pollution dans un contexte de mucoviscidose où l'expression de CFTR et la clairance muco-ciliaire sont diminuées.

3.2.2 Études *in vitro*

D'un point de vue mécanistique, les processus cellulaires impliqués sont l'inflammation, la mort cellulaire et le stress oxydant. Ces mécanismes sont résumés en Figure 15 dans un contexte spécifique d'épithélium CF.

Par le relargage de lactate déshydrogénase (LDH), les particules – PM_{2.5} et PM₁₀ (355), particules issues de la combustion de bois (356), particules vieilles de gaz d'échappement (357) – et les nanoparticules – d'argent et de carbone (358) – sont directement cytotoxiques pour les cellules épithéliales bronchiques CF et induisent la nécrose de ces dernières. L'O₃ altère quant à lui l'intégrité de l'épithélium respiratoire en perturbant directement les jonctions serrées (359) et pourrait potentialiser par ailleurs l'effet des nanoparticules en permettant leur translocation dans le noyau (360). En plus de la nécrose, la mort cellulaire peut aussi se produire par apoptose dans les cellules exposées aux PM_{2.5} (355,361) et à l'ozone (359). L'apoptose est entraînée par l'activation des caspases 3/7 et 9, elles-mêmes activées suite à une dysfonction mitochondriale (190).

Les PM_{2.5} et l'O₃ entraînent la génération d'ERO dans les cellules épithéliales bronchiques de type CF (359,361). Ces ERO renforcent la dysfonction mitochondriale qui participe en retour au maintien d'un niveau de stress oxydatif élevé et au déclenchement de nouveaux évènements apoptotiques dans les cellules CF. Une exposition de ces cellules aux particules induit en outre une augmentation de l'expression de gènes impliqués dans la réponse oxydante (355,356). Cette balance oxydative, déséquilibrée en faveur des espèces pro-oxydantes, pourrait entraîner une cascade inflammatoire. En effet, la sécrétion de cytokines pro-

inflammatoires telles que l'IL-8, l'IL-6, le G-CSF ou encore le GM-CSF est stimulée en réponse à une exposition aux PM_{2.5} et aux PM₁₀ (355), à des nanoparticules d'argent et de carbone (358) ainsi qu'à l'O₃ (359). Dans le cas d'une exposition à l'O₃, cette inflammation est médiée par la voie NF-κB (359).

Comme pour les modèles animaux, l'expression de CFTR et des mucines a été étudiée *in vitro* dans des modèles de cellules pulmonaires non CF. Il a ainsi été montré une diminution de l'expression protéique et de l'activité fonctionnelle de CFTR en réponse à une exposition à l'O₃ (348) et à des particules diesel (349,362). Dans le cas d'une exposition à l'O₃, la diminution de l'expression de CFTR semble être dépendante de la voie JAK2/STAT1, elle-même activée par les ERO (190,348). Cette modification de l'expression de CFTR consécutivement à l'exposition aux polluants atmosphériques est importante à considérer car l'expression de CFTR, déjà réduite chez les patients mucoviscidosiques, pourrait être davantage diminuée. Chez des patients présentant des mutations des classes IV à VI avec une fonction résiduelle de CFTR, cela pourrait conduire à une perte totale de fonction, empirant ainsi l'état physiopathologique des patients. L'induction d'un tel phénotype « CF-like » est renforcée par une altération des sécrétions mucosales dans des cellules pulmonaires exposées à des particules. Il a en effet été montré dans ces cellules qu'une exposition à des particules diesel diminuait l'expression des aquaporines 1 et 5 (AQP1 et AQP5 – protéines permettant le passage de l'eau de part et d'autre de la membrane), favorisant ainsi une potentielle déshydratation de la surface des voies respiratoires, et qu'une exposition aux particules diesel ainsi qu'aux PM_{2.5} était associée à une hypersécrétion de mucus et une diminution de la fréquence de battement des cils (363–365).

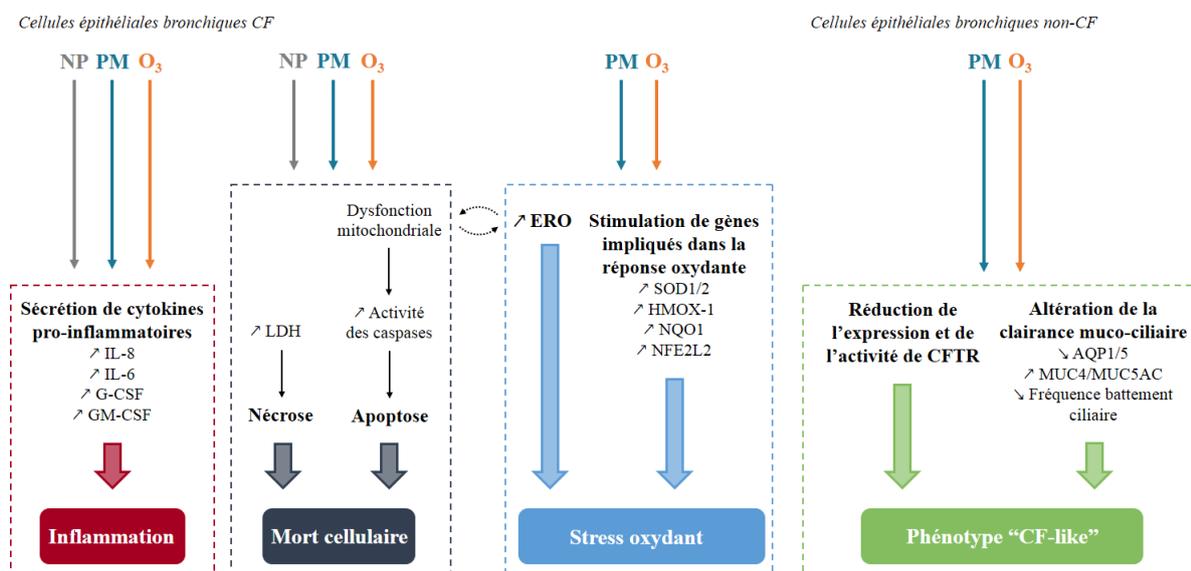


Figure 15 Effets biologiques des polluants dans des cellules épithéliales bronchiques humaines CF et non-CF. NP : Nanoparticules ; PM : Particulate Matter ; O₃ : Ozone (*Adapté de Blayac et al., 2022*).

3.3 Limites des études présentées

Même si l'impact de facteurs environnementaux sur le cours des maladies suscite beaucoup d'engouement, à peine une dizaine d'études épidémiologiques ont pour l'instant été publiées sur les effets de la pollution atmosphérique sur le cours de la mucoviscidose. Les effets de la pollution de l'air extérieur sont par ailleurs beaucoup plus documentés que ceux de la pollution de l'air intérieur. Un regard critique de ces études a ainsi permis de mettre en évidence certaines limites en lien avec l'estimation de l'exposition des individus. Outre de possibles erreurs de classification de l'exposition, les résultats des études épidémiologiques n'ont été ajustés que sur le statut socio-économique des individus. Cet ajustement n'a pas permis de prendre en compte d'éventuels autres biais de confusion comme une exposition à la fumée de cigarette. Également, aucun ajustement n'a été réalisé sur les valeurs d'exposition des autres polluants considérés dans les études. Cela ne permet pas non plus de prendre en compte la multiplicité des polluants auxquels sont exposés les individus et leurs potentiels effets cumulés.

Les études réalisées dans des modèles animaux et cellulaires sont également en nombre restreint. De plus, dans ces études *in vivo* et *in vitro*, les modèles ne sont exposés qu'à un seul polluant à la fois. Ceci représente une version extrêmement simplifiée de la réalité : d'une part car ce n'est pas représentatif de la complexité de la composition de la pollution atmosphérique (un individu n'est jamais exposé à un seul polluant mais à un mélange de polluants) et d'autre part car un polluant n'aura pas nécessairement les mêmes effets seul ou en présence d'autres

polluants (effet cocktail). À ma connaissance, une seule étude s'est intéressée à ce jour aux effets d'une co-exposition à l'O₃ et aux NP sur des cultures de cellules épithéliales dans un contexte de mucoviscidose (360). Par ailleurs, les polluants primaires réagissent entre eux pour former des polluants secondaires qui constituent une grande partie des composants du mélange atmosphérique. Pourtant, seules quelques études ont été réalisées sur les effets d'aérosols secondaires ou vieillis (356,357,366–370). À ces considérations s'ajoute des doses d'exposition bien au-dessus des doses auxquelles l'Homme est exposé. Il subsiste ainsi un manque de connaissances sur les effets « réels » de mélanges réalistes de polluants.

II. Hypothèse et objectifs de l'étude

La variabilité phénotypique observée chez les patients atteints de mucoviscidose reste à ce jour mal comprise. Parmi les pistes émergentes figure la pollution atmosphérique. Les études épidémiologiques réalisées jusqu'à présent suggèrent une association entre une exposition à la pollution, que celle-ci soit de nature aigüe ou chronique, et une augmentation de la sévérité et de la morbidité de la maladie chez l'adulte et chez l'enfant. Ces résultats semblent être corroborés par plusieurs études *in vivo* et *in vitro*.

Les études citées précédemment présentent toutefois une limite importante. Celle-ci réside dans le fait qu'elles ne s'intéressent qu'à un faible nombre de polluants étudiés de manière individuelle et donc non représentatifs de la réalité de la complexité du mélange atmosphérique. La réactivité entre les polluants et la synergie de leurs effets ne sont ainsi pas prises en considération limitant finalement les conclusions pouvant être tirées de ces études. C'est dans ce contexte que la plateforme innovante PolluRisk, fruit de la collaboration entre l'IMRB (Institut Mondor de Recherche Biomédicale) et le LISA (Laboratoire Interuniversitaire des Systèmes Atmosphériques), a été développée. Celle-ci permet d'exposer des organismes vivants à des atmosphères réalistes complexes simulées au laboratoire.

Dans le cadre de mon projet de thèse, qui s'inscrit plus largement dans le cadre du projet Européen REMEDIA Horizon 2020 - Impact de l'exposome sur le cours des maladies pulmonaires, 2 modèles de souris de mucoviscidose ont été exposés à différents niveaux de pollution atmosphérique grâce à la plateforme PolluRisk. Partant des constats précédents, nous avons émis l'hypothèse que la pollution atmosphérique devrait avoir un rôle aggravant sur le cours de la mucoviscidose et qu'elle pourrait contribuer à la physiopathologie de la maladie. L'étude s'est ainsi articulée autour des 3 grands objectifs suivants :

- 1) Déterminer les effets biologiques d'une exposition à différents niveaux de pollution sur la morbidité pulmonaire de modèles murins de mucoviscidose

À cet égard, nous disposons de 2 modèles murins permettant de répondre chacun à une question biologique différente :

- La pollution atmosphérique participe-t-elle à la mise en place d'un phénotype pulmonaire dans le modèle *Cfr*^{tm1EUR} ?
- La pollution atmosphérique aggrave-t-elle un phénotype pulmonaire déjà existant dans le modèle *Scnn1b*-Tg ?

- 2) Hiérarchiser les différents niveaux de pollution en termes d'effets biologiques induits
- 3) Identifier les polluants qui pourraient être responsables des effets biologiques mis en évidence

CHAPITRE III

III. Matériels et méthodes

1 PolluRisk : plateforme d'exposition d'organismes vivants à des atmosphères réalistes complexes

La plateforme PolluRisk est née de la collaboration transdisciplinaire entre une unité de recherche biomédicale (IMRB INSERM U955) et une unité de recherche en sciences atmosphériques (LISA CNRS UMR7583). Cette plateforme repose sur le couplage d'une chambre de simulation atmosphérique multiphasique (CESAM) à des isolateurs permettant l'hébergement d'organismes vivants (Figure 16).



Figure 16 Vue globale de la plateforme PolluRisk. En arrière-plan, on voit la chambre CESAM surmontée d'une bâche kaki permettant d'occulter la lumière du système d'irradiation de CESAM placé à son sommet. Au premier plan, deux isolateurs dos à dos (rouges avec 3 interfaces gants claires). Passant au-dessus d'eux, les conduites de climatisation des enceintes (pour maintenir la température de l'environnement des souris constante). A droite au premier plan, une plus petite chambre opérant comme un réservoir de suies.

1.1 Chambre CESAM : simulation d'atmosphères réalistes

La chambre expérimentale CESAM (LISA) est une chambre de simulation atmosphérique multiphasique (www.cesam.cnrs.fr). Il s'agit d'une chambre rigide, évacuable, en acier inoxydable, d'un volume de 4.3 m³ (Figure 17).

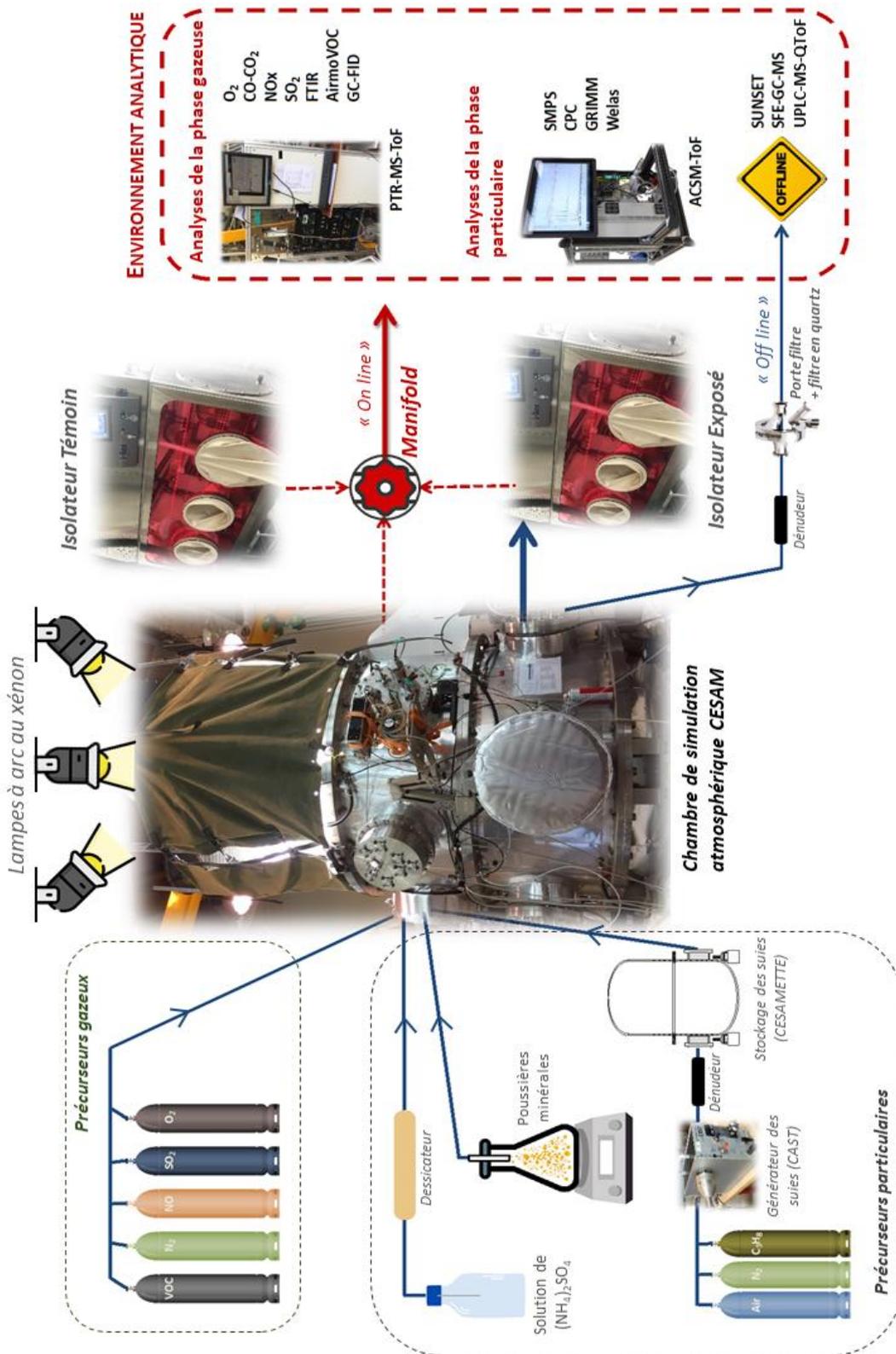


Figure 17 Schéma expérimental de la plateforme PolluRisk dédiée à l'exposition d'organismes vivants à des atmosphères réalistes.

Cette chambre permet de simuler de manière réaliste des atmosphères urbaines. Pour cela, un mélange de composés gazeux (O_2 , N_2 , NO , COV , voire SO_2) et de particules (sels de sulfate d'ammonium $(NH_4)_2SO_4$, suies, voire poussières désertiques) est injecté de manière continue dans la chambre (Figure 17). Les composés gazeux sont introduits directement depuis des cylindres de gaz. Les sels de $(NH_4)_2SO_4$ servent de précurseurs à la formation de toutes les particules ($PM_{0.1}$, $PM_{2.5}$ et PM_{10}). Les suies sont générées en grandes quantités par combustion de propane grâce à un générateur de suies (miniCAST). Ces suies sont ensuite acheminées et stockées dans une plus petite chambre qui alimente la chambre CESAM en continu. Le mélange ainsi formé dans la chambre CESAM est ensuite soumis à une irradiation artificielle (3 lampes à arc au xénon) qui simulent le rayonnement solaire au niveau de la troposphère. Cette irradiation est à l'origine d'un ensemble de réactions photochimiques complexes aboutissant à la formation de polluants secondaires tels que l' O_3 , le NO_2 , le CO , des composés organiques volatils oxydés ainsi que des aérosols organiques secondaires (AOS). L'équilibre photo-stationnaire dans la chambre est atteint 8 à 9 heures après l'allumage des lampes, durée après laquelle l'atmosphère générée est considérée comme stable en terme de composition et utilisée pour alimenter les dispositifs d'exposition des organismes vivants. Cette plateforme PolluRisk est à ce jour dotée de protocoles expérimentaux permettant de reproduire des atmosphères stables sur une durée de 7 jours consécutifs.

1.2 Atmosphères simulées

Dans ce projet, j'ai fait le choix de simuler 5 atmosphères différentes. Celles-ci sont représentatives de la pollution de 2 grandes villes : la ville de Pékin en tant qu'atmosphère représentative d'une mégapole fortement polluée et la ville de Paris en tant qu'atmosphère représentative d'une ville urbaine européenne. Comme évoqué dans l'introduction, la composition chimique des atmosphères varie en fonction des saisons selon l'intensité des différentes sources émettrices. Ainsi, pour une même ville, les atmosphères simulées diffèrent également sur la base d'un critère de saisonnalité où les variations entre conditions estivales et conditions hivernales ont été prises en compte. Les atmosphères modèles d'intérêt dans notre étude sont : une atmosphère de type « Pékin Été », une atmosphère de type « Pékin Hiver », une atmosphère de type « Paris Été » et une atmosphère de type « Paris Hiver ». Afin de simuler ces atmosphères de façon la plus réaliste possible, une étude bibliographique de leur composition chimique, en gaz et en particules, a été menée (Tableau 3). Après cette première phase d'étude bibliographique, une seconde phase de simulation numérique à l'aide du logiciel

FACSIMILE a permis de déterminer les concentrations de polluants primaires gazeux et particulaires à injecter dans la chambre CESAM et de prendre en compte leur réactivité chimique, ceci afin de reproduire la composition cible des atmosphères définie sur la base de l'étude bibliographique. La troisième et dernière phase correspond à la phase pratique de simulation des atmosphères par CESAM selon le principe de fonctionnement décrit dans le paragraphe précédent. L'ensemble de ces trois phases (étude bibliographique, simulation logicielle et génération des atmosphères) a été réalisée par les équipes du LISA. Il est à noter que dans les cas des simulations de l'atmosphère de type Pékin, du SO₂, traceur de la combustion d'énergies fossiles, a été injecté. De même, des poussières minérales ont été injectées une fois par jour et ce, afin de reproduire les tempêtes de sable auxquelles la ville de Pékin est régulièrement soumise (Figure 17). Pour cela, du sable de désert de Gobi a été soumis à un protocole expérimental de saltation, afin de produire un panache représentatif de particules minérales (371). Après mise en suspension des particules, l'aérosol généré a été introduit dans la chambre.

Tableau 3 Composition chimique et concentrations cibles des polluants des atmosphères simulées.

Atmosphère simulée	Polluants				Episode de pollution considéré (Références)
	NO ₂	SO ₂	Particules	Suies	
Paris Été	5-20 ppb	-	15-25 µg/m ³	0.5-1.5 µg/m ³	Moyenne du mois de juillet 2009 (372–374)
Paris Hiver	15-30 ppb	0.5-3 ppb	20-25 µg/m ³	1.5 µg/m ³	Moyenne des mois janvier/février 2010 (373)
Pékin Été (Type 1)	10-50 ppb	1-5 ppb	30-60 µg/m ³	3-5 µg/m ³	Moyenne des mois mai/juin 2017 (375–378)
Pékin Été (Type 2)	8-20 ppb	2-10 ppb	50-150 µg/m ³	3-5 µg/m ³	Pollution particulaire de mai 2017 (377)
Pékin Hiver	25-50 ppb	20-30 ppb	150-500 µg/m ³	10-15 µg/m ³	Pollution particulaire de janvier 2013 (379–381)

1.3 Dispositifs d'exposition des souris

Les animaux exposés ont été hébergés dans deux isolateurs, un isolateur « exposé » et un isolateur « témoin » (i-Box, Noroit). La température y est régulée entre 22 et 25°C à l'aide d'un système de climatisation/chauffage et un cycle jour/nuit de 12 heures est imposé. Afin de préserver la stérilité des isolateurs, décontaminés chimiquement au peroxyde d'hydrogène avant chaque campagne, l'introduction et la sortie des souris ont été réalisées sous un poste de sécurité microbiologique (PSM classe II, Anilis) connecté à l'isolateur (Figure 18).



Figure 18 Introduction des souris dans les isolateurs sous PSM.

La capacité d'accueil maximale d'un isolateur est de 19 cages de 5 souris réparties sur 3 étages permettant ainsi d'exposer au maximum 190 souris en une campagne (95 souris témoins et 95 souris exposées). De l'eau et de la nourriture sont ajoutées en quantité suffisante dans les cages afin de permettre aux souris de s'alimenter pendant toute la durée de l'exposition. L'isolateur exposé est directement relié à la chambre CESAM et est alimenté en continu par l'atmosphère provenant de la chambre à un débit de 12 L/min (Figure 19). Le facteur de dilution de l'air entre CESAM et l'isolateur exposé est égal à 20. Le renouvellement de l'air dans l'isolateur est assuré par une entrée d'air ambiant qui se fait au niveau de la face supérieure de l'isolateur. L'isolateur témoin est quant à lui découplé de CESAM et alimenté uniquement par l'air de la pièce, filtré. Cette filtration de l'air ambiant entrant dans les isolateurs est assurée par un système de filtres HEPA (High Efficiency Particulate Air) permettant l'élimination des particules de plus de 0.3 μm de diamètre et de filtres à charbon actif piégeant les composés gazeux (Figure 20).



Figure 19 Ligne de transfert de l'atmosphère entre CESAM et l'isolateur exposé.

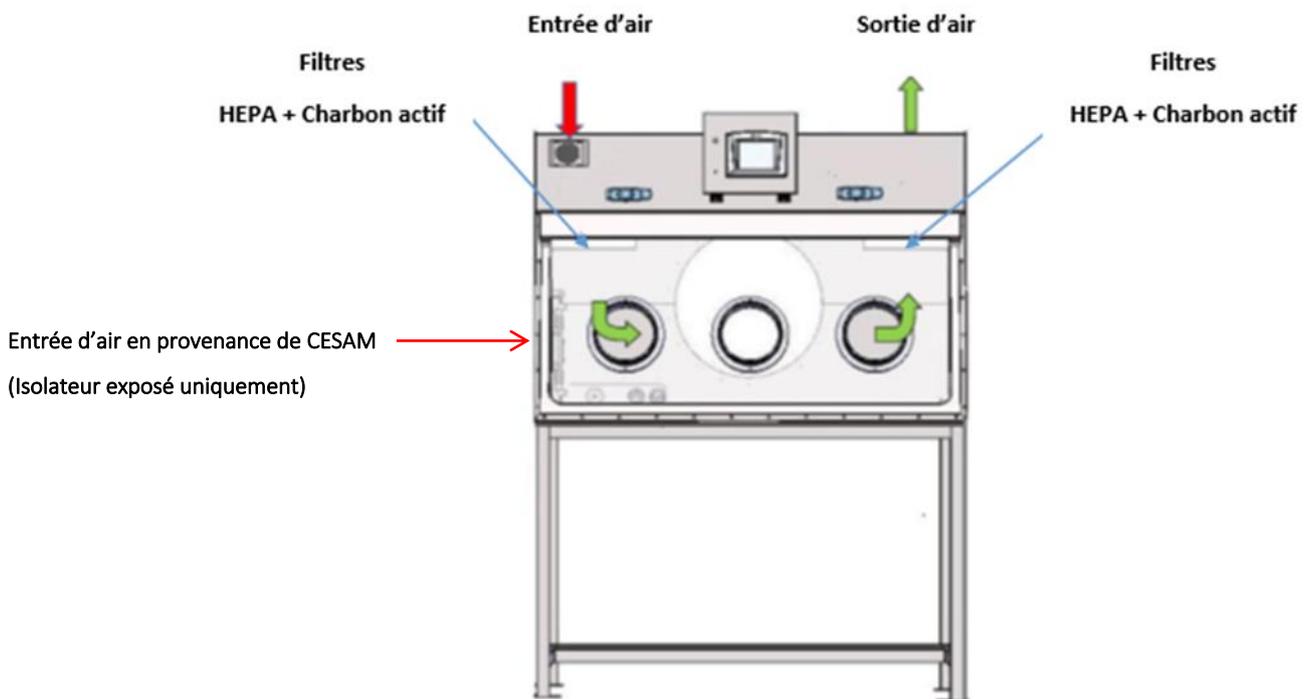


Figure 20 Circulation d'air dans les isolateurs.

1.4 Contrôle qualité de la simulation et qualification des atmosphères

Les atmosphères générées ont été analysées afin de les caractériser tant d'un point de vue physique que chimique. La chambre est en effet équipée d'un parc d'instruments analytiques assurant l'acquisition en temps réel de données physico-chimiques relatives aux phases gazeuse et particulaire (Figure 17) (Tableau 4). Pour cela, un système de manifold connecté d'une part à CESAM et aux deux isolateurs et relié d'autre part aux instruments analytiques permet d'échantillonner l'atmosphère de chacun des trois compartiments (Figure 21). Les mesures ne peuvent être réalisées que dans un compartiment à la fois. Ainsi, des mesures alternées ont mises en œuvre afin de changer de compartiment de mesure de la manière suivante : 1 à 2 heures de mesures dans CESAM, 5 à 6 heures de mesures dans l'isolateur exposé et 2 à 3 heures de mesures dans l'isolateur témoin. L'analyse en temps réel des phases gazeuse et particulaire permet ainsi de vérifier l'adéquation des concentrations de polluants mesurées dans l'isolateur exposé aux concentrations ciblées de l'atmosphère simulée. Dans le cas où les gammes cibles ne seraient pas respectées, un ajustement en conséquence des débits de gaz et/ou des quantités de particules injectées est réalisé en direct afin de reproduire le plus fidèlement possible les concentrations cibles. La gestion de la métrologie (mesures alternées notamment), combiné à la surveillance de la plateforme à des fins de qualité de la simulation, a nécessité une présence d'opérateurs 24h/24 pendant toute la durée des campagnes. Par ailleurs, des analyses « off-line » réalisées en différé après les campagnes ont été menées. Un dispositif de filtres en fibres de quartz placé en sortie de CESAM a permis de collecter des échantillons des aérosols générés (Figure 17). Ces filtres ont été analysés dans le but de connaître la composition en matière organique de ces aérosols. La qualification des atmosphères et l'analyse fine de leur composition chimique ont été faites par le LISA.

Tableau 4 Parc analytique de la plateforme PolluRisk pour la caractérisation physico-chimique des atmosphères générées.

Espèces ou composés chimiques mesurés	Instrument/Technique analytique - Référence
<i>Caractérisation de la phase gazeuse</i>	
Ozone (O ₃)	Analyseur d'O ₃ - Horiba® APOA 370®
Oxydes d'azote (NO et NO ₂)	Analyseur de NO _x - Horiba® APNA 370®
Dioxyde de soufre (SO ₂)	Analyseur de SO ₂ - Horiba® APSA 370®
Composés organiques volatiles (COV) et composés organiques volatiles oxygénés (COVO)	PTR-ToF-MS - Série II - KORE Technology LTD
Hydrocarbures à chaîne carbonée C ₂ -C ₆	AirmoVOC
Hydrocarbures à chaîne carbonée C ₂ -C ₁₀	GC-FID - Perkin Elmer Clarus 680
Composés qui absorbent les rayonnements IR (COV, COVO, O ₃ , NO _x , NO)	IRTF - Bruker Tensor®
<i>Caractérisation de la phase particulaire</i>	
<i>Analyses en ligne</i>	
Distribution granulométrique des particules et nombre de particules	SMPS (DMA - TSI 3080, CPC - TSI 3025) Compteur optique de particules - GRIMM
Composition chimique des particules - Espèces non réfractaires (Sulfate SO ₄ , Ammonium NH ₄ , Nitrate NO ₃ , Organiques, Chlorure Cl)	ACSM - Aerodyne
<i>Analyses hors ligne réalisées sur filtres prélevés</i>	
Analyse de la fraction carbonée - Concentrations massiques en carbone organique (OC) et carbone élémentaire (EC)	Analyse OC/EC - Sunset Laboratory Inc.
Analyse moléculaire de la fraction organique - Espèces de faible volatilité à faible poids moléculaire	SFE-GC-MS
Analyse moléculaire de la fraction organique - Espèces de faible volatilité à haut poids moléculaire	UPLC-QToF-MS

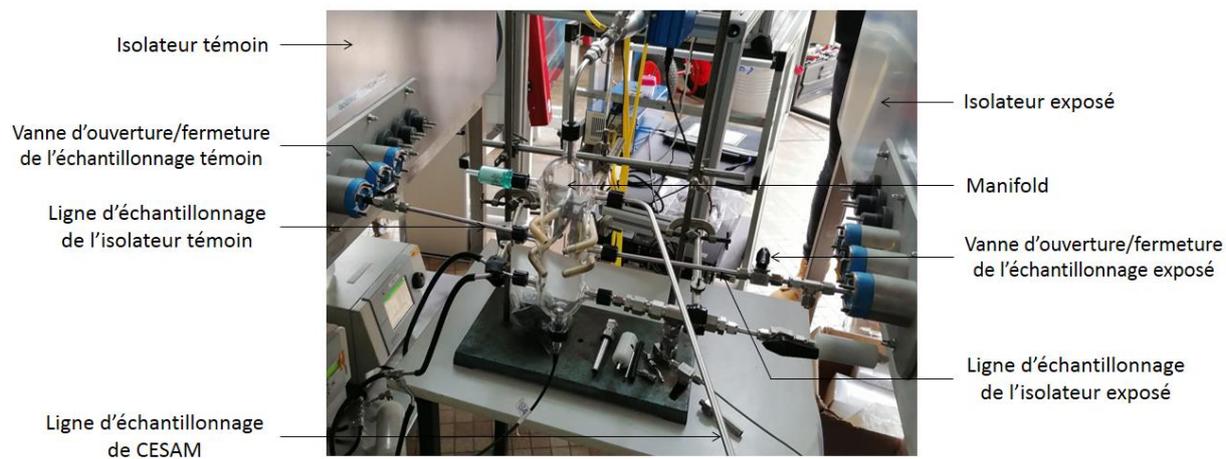


Figure 21 Collecteur (manifold) pour l'échantillonnage de l'atmosphère dans les compartiments CESAM, isolateur exposé et isolateur témoin.

2 Étude *in vivo*

2.1 Modèles animaux

2.1.1 Lignée *Cftr*^{tm1EUR}

Les animaux de la lignée *Cftr*^{tm1EUR} (fond génétique 129/FVB) proviennent de la plateforme Typage et Archivage d'Animaux modèles (TAAM, CNRS, Orléans). Ils ont ensuite été hébergés à l'animalerie de l'IMRB (plateforme Expérimentation Physiologique et Physiopathologique, EP3) jusqu'à leur exposition aux atmosphères complexes. Conformément aux indications du centre d'élevage, les animaux ont été placés sous un régime alimentaire spécifique. Les souris *Cftr*^{tm1EUR} présentant une faible assimilation des nutriments liée à leur phénotype intestinal, des granulés enrichis en protéines et en graisses ont été donnés aux souris (2018 Teklad global 18% protein rodent diet, ENVIGO). De plus, afin d'éviter les occlusions intestinales associées à ce modèle, du movicol, un médicament laxatif, a été dilué dans l'eau de boisson (1 sachet par biberon de 250 mL - Macrogol 3350, Norgine) (382).

2.1.2 Lignée *Scnn1b*-Tg

Nous avons établi notre propre colonie d'animaux *Scnn1b*-Tg. Deux trios fondateurs chacun constitué d'un mâle transgénique hémizygote (souche N°030949, B6N.Cg-Tg (Scgbl1a1-Scnn1b)6608Bouc/J) et de 2 femelles sauvages (souche N°005304, C57BL/6NJ) tous âgés de 6 semaines ont été importés depuis les États-Unis (The Jackson Laboratory). Ces animaux ont été hébergés dans la zone d'élevage de l'EP3 et mis en reproduction dès leur arrivée. Contrairement aux animaux de la lignée *Cftr*^{tm1EUR}, les animaux de la lignée *Scnn1b*-Tg ont été placés sous un régime alimentaire classique (S9343-S403 Ssniff Rat/Mouse VRF1). La lignée *Scnn1b*-Tg utilisée ici est une lignée congénique rétrocroisée sur fond génétique homogène C57BL/6NJ et qui présente une survie néonatale augmentée (80-90% de survie au 20^{ème} jour post-natal) comparée à la lignée originale développée sur un fond génétique mixte C3H/HeN:C57BL/6N (50% de survie au 20^{ème} jour post-natal) (383). Malgré cette survie augmentée, cette lignée congénique possède bien un phénotype pulmonaire caractéristique de celui de la mucoviscidose et semblable à celui présenté par la lignée originale. Les cages d'accouplements ont été renouvelées tous les 6 mois environ pour le maintien de la lignée. En fonction des besoins en animaux de chaque campagne, de nouveaux accouplements ont été lancés en conséquence.

2.1.3 Génotypage

Une biopsie de queue a été réalisée chez les animaux *Scnn1b*-Tg après sevrage. Le morceau de queue a été conservé à -20°C jusqu'à réalisation du génotypage. L'ADN a été extrait du morceau de queue à l'aide du KAPA Mouse Genotyping Kit dont le protocole a été suivi (Kapa Biosystems, CliniSciences). Une PCR sur 1 µL d'ADN extrait a ensuite été réalisée comme suit dans un volume total de 25 µL : 95 °C – 3 minutes, 35 cycles 95°C – 15 secondes/60°C – 15 secondes /72°C – 30 secondes, 72°C – 5 minutes puis maintien à 10°C. Un contrôle négatif a été fait avec 1 µL d'eau. Les amorces utilisées sont indiquées dans le Tableau 5. Les échantillons ont ensuite migré par électrophorèse sur gel d'agarose 1.5% pendant 1h30 à 150 V. Les animaux wild-type (WT) ont été identifiés par la présence d'un fragment à 320 bp tandis que les animaux transgéniques présentent un fragment supplémentaire à 250 bp correspondant au transgène (Figure 22). Les animaux de la lignée *Cftr*^{tm1EUR} ont quant à eux été génotypés directement par le TAAM. Après exposition et au moment de l'analyse des résultats, un génotypage de vérification a toutefois été réalisé en cas de doute sur le génotype des animaux. Pour cela, un morceau de queue a été systématiquement prélevé au moment du sacrifice. Ce morceau de queue a été conservé à -20°C. Le même protocole que celui utilisé pour le génotypage des animaux de la lignée *Scnn1b*-Tg a été suivi. Après la PCR, une étape supplémentaire de digestion avec l'enzyme de restriction *SspI* (New England Biolabs) a été réalisée pendant 3 heures à 37°C. Le dépôt et la migration des échantillons digérés ont été réalisés comme indiqué précédemment. Les individus WT ont été identifiés par la présence d'un seul fragment à 249 bp tandis que les individus mutés F508del ont été identifiés par la présence de deux fragments de 122 et 127 bp respectivement (Figure 22).

Tableau 5 Séquence des amorces utilisées pour le génotypage des deux lignées

Amorces	Séquence (5'→3')
Lignée <i>Scnn1b</i>-Tg	
Transgène Sens	CTTCCAAGAGTTCAACTACCG
Transgène Anti-sens	TCTACCAGCTCAGCCACAGTG
Contrôle interne positif Sens	CTAGGCCACAGAATTGAAAGATCT
Contrôle interne positif Anti-sens	GTAGGTGGAAATTCTAGCATCATC C
Lignée <i>Cftr</i>^{tm1EUR}	
Sens	GACATCACTCCTGATGTTGA
Anti-sens	CACAACACTGACACAAGTAGC

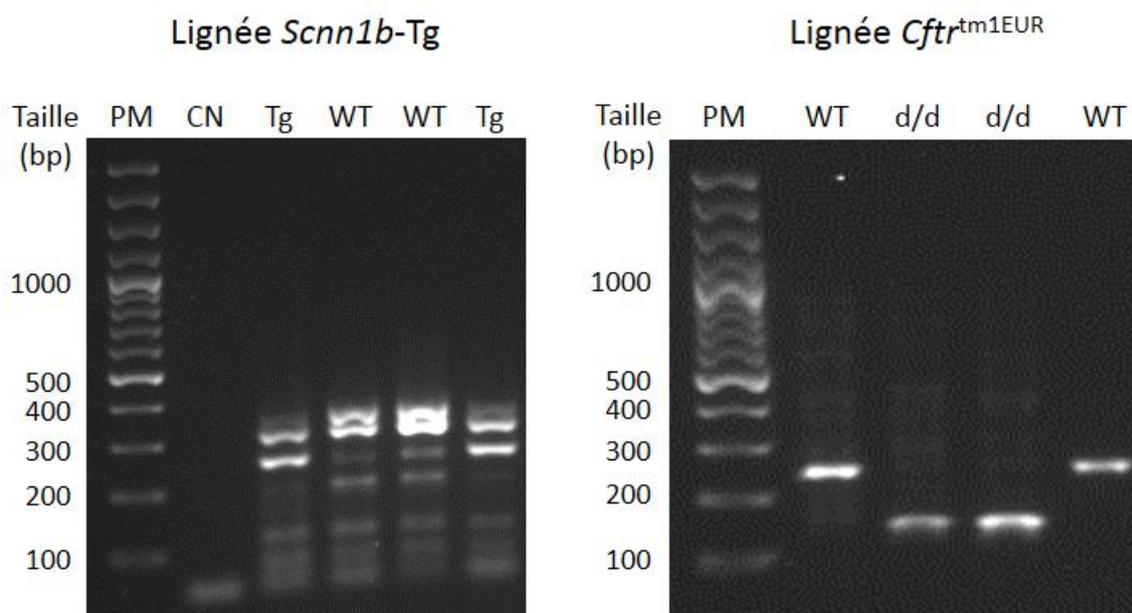


Figure 22 Résultats de génotypage. PM = Poids Moléculaire, CN = Contrôle Négatif, WT = Wild-Type, Tg = Transgénique, d/d = homozygote F508del.

2.2 Campagnes d'exposition

Les souris ont été exposées aux différentes atmosphères simulées grâce à la plateforme PolluRisk décrite plus haut. L'exposition a été conduite pendant 18H ou 72H consécutives sur des souris adultes. Au total, 7 campagnes d'exposition pour 5 atmosphères urbaines différentes ont été réalisées de novembre 2020 à mars 2022. Les atmosphères simulées, les dates des campagnes ainsi que le nombre et l'âge des animaux exposés sont accessibles dans le Tableau 6. Les animaux ont ensuite été sacrifiés directement en sortie d'exposition, après transport à l'IMRB. Des prélèvements de poumons ont été effectués et les réponses des souris en termes de structure et de fonction pulmonaire, d'inflammation, de stress oxydant et d'expression de marqueurs de la mucoviscidose (CFTR, mucines) ont été caractérisées.

Tableau 6 Récapitulatif des campagnes d'exposition PolluRisk réalisées.

Nom de la campagne	Date	Atmosphère simulée	Durée	Nombre d'animaux exposés		Age des animaux
				<i>Scnn1b-Tg</i>	<i>Cftr</i> ^{tm1EUR}	
PolluRisk#6	Nov-20	Paris Hiver	72 H	30	0	8 à 18 semaines
PolluRisk#7	Fév-21	Pékin Été (Type 1)	72 H	0	46	10 à 14 semaines
PolluRisk#8	Avr-21	Pékin Été (Type 1)	72 H	36	54	13 à 22 semaines
PolluRisk#9	Juin-21	Paris Été	72 H	40	40	12 à 20 semaines
PolluRisk#10	Sept-21	Pékin Été (Type 2)	72 H	19	32	15 à 20 semaines
PolluRisk#11	Déc-21	Pékin Hiver	18 H	16	21	10 à 16 semaines
PolluRisk#11	Déc-21	Pékin Hiver	72 H	14	21	10 à 16 semaines
PolluRisk#12	Mars-22	Pékin Hiver	72 H	20	19	20 à 36 semaines

2.3 Sacrifice

2.3.1 Préparation de l'animal et prélèvement du sang

Au moment du sacrifice, les animaux ont été pesés et anesthésiés par injection de 10 µL/g de poids corporel d'un mélange Buprénorphine (1 mg/kg) – Zoletil (160 mg/kg) – Xylazine (10mg/kg) par voie intrapéritonéale. Une fois l'animal complètement endormi, une laparotomie a été réalisée, un pneumothorax a été effectué et la cage thoracique a été ouverte. Le sang a ensuite été prélevé en intracardiaque avec de l'héparine comme anti-coagulant.

2.3.2 Réalisations des lavages bronchoalvéolaires

Une fois les animaux installés et le sang prélevé, l'animal a été ouvert au niveau du cou afin de pouvoir réaliser une trachéotomie. Un cathéter (22 G, BD Insite) a été inséré dans la trachée et maintenu en place par la pose d'un fil de couture noué autour de la trachée (Figure

23). La bronche souche gauche a été dégagée et clampée permettant ainsi de réaliser le lavage bronchoalvéolaire (LBA) uniquement sur le poumon droit. Une seringue contenant 200 μL de sérum physiologique stérile (NaCl 0,9%, Physiodoses Gilbert) a été branchée sur le cathéter et un premier rinçage du poumon a été réalisé avec ce volume. Ce volume de rinçage a été récupéré par réaspiration de la solution à l'aide de la seringue avant d'être éliminé. Trois instillations successives de 500 μL de sérum physiologique ont ensuite été réalisées pour un volume d'injection total de 1 500 μL . A chaque instillation et une fois tout le volume de sérum physiologique contenu dans la seringue injecté, un temps d'attente de 10 à 15 secondes a été respecté permettant au poumon de s'équilibrer et de récupérer un maximum de cellules. Le sérum physiologique a ensuite été réaspiré délicatement et placé dans un tube Eppendorf 1,5 mL. A la fin des trois injections, la seringue a été retirée du cathéter, le volume final de lavage récupéré a été consigné et le LBA placé sur glace en attendant le comptage cellulaire.

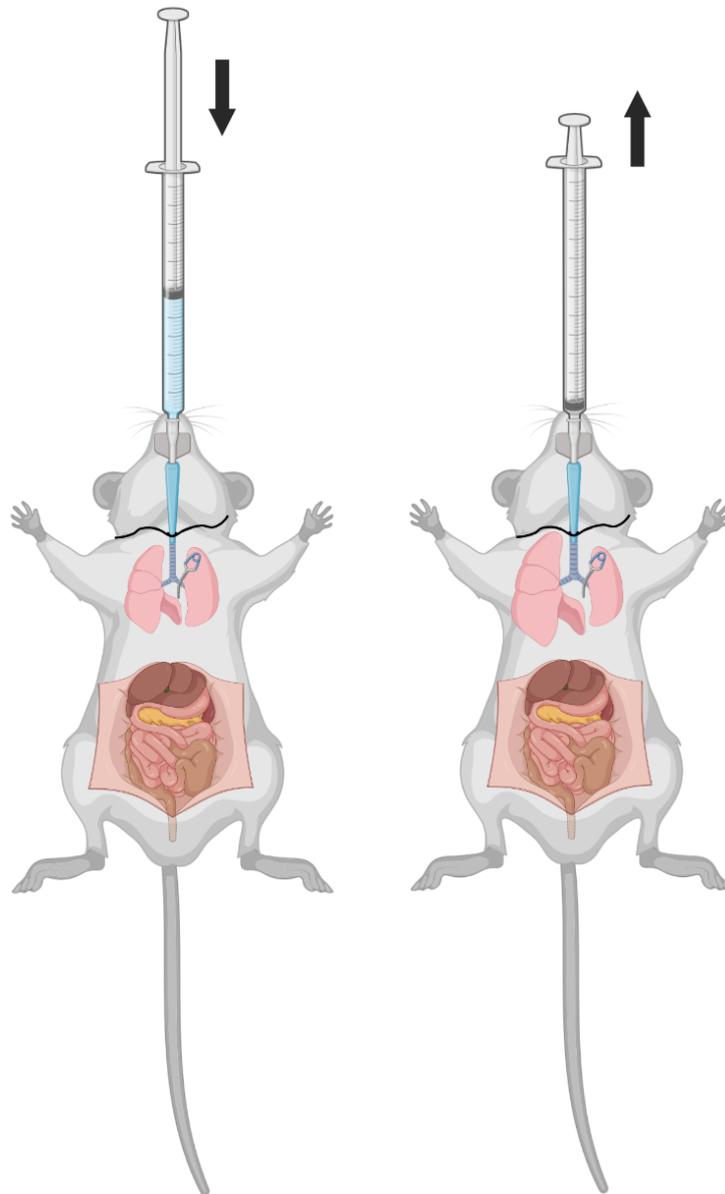


Figure 23 Réalisation du LBA chez la souris. Le sérum physiologique est injecté dans le poumon par poussée du piston (A). La bronche souche gauche étant clampée, seul le poumon droit est lavé. Le piston est ensuite tiré pour réaspirer le sérum physiologique injecté (B). L'opération est répétée 3 fois de suite.

2.3.3 Prélèvement des poumons

Après réalisation du LBA, la bronche souche droite a été ligaturée puis la bronche souche gauche déclampée (Figure 24). Le poumon droit a été prélevé et utilisé pour les études de biologie moléculaire. Le lobe supérieur droit, destiné à l'étude de l'expression des gènes, a été immergé dans 500 μ L de RNAlater Tissue Reagent (Qiagen) à 4°C pendant toute une nuit afin de stabiliser les ARN des échantillons de poumons avant que ceux-ci ne soient stockés à sec à -80°C. Les lobes inférieur, moyen et post-caval, destinés à l'étude de l'expression des

protéines, ont été prélevés dans des cryotubes et plongés directement dans l'azote liquide pour une conservation à sec à -80°C . Le poumon gauche a quant à lui été utilisé pour l'étude histologique et morphologique. À cet effet, le bloc cœur-poumon gauche a été retiré en prenant soin de laisser le cathéter en place dans la trachée. Le poumon a ensuite été fixé et gonflé *ex situ* sur colonne à une pression de 14 cmH₂O par injection d'une solution de formaldéhyde 4% (DiaPath) via le cathéter.

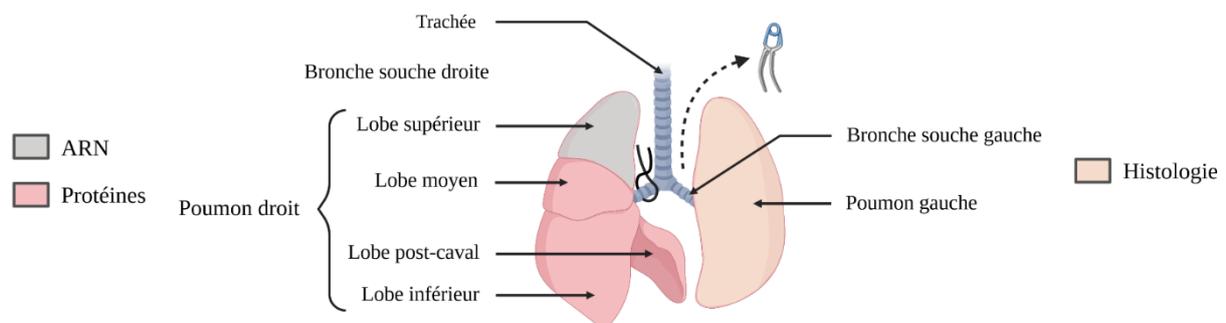


Figure 24 Prélèvement des poumons et devenir des différents lobes.

3 Analyses histologiques pulmonaires

3.1 Détermination de la cellularité dans les lavages bronchoalvéolaires

Le comptage des cellules dans les échantillons de LBA a été effectué immédiatement après réalisation des lavages sur une lame de comptage KOVA sous un microscope optique à lumière blanche. Un mélange de 10 µL de LBA avec 10 µL de bleu trypan a été déposé sur la lame KOVA. Le bleu trypan permet l'identification des cellules mortes qui prennent une coloration bleue. Les cellules ont été comptées sur l'ensemble de la grille KOVA qui contient un volume de 1 µL. Les cellules épithéliales bronchiques et les hématies n'ont pas été comptées. Le nombre total de cellules vivantes a ensuite été calculé par la formule suivante :

Nombre total de cellules vivantes dans l'échantillon de LBA = Nombre de cellules vivantes comptées x Volume total de LBA x Facteur de dilution. Le facteur de dilution est égal à 2 dans notre cas.

De même, on a :

Nombre total de cellules mortes dans l'échantillon de LBA = Nombre de cellules mortes comptées x Volume total de LBA x Facteur de dilution.

Après comptage, une cyto centrifugation de 10 minutes à 800 rpm a été effectuée avec 100 µL de LBA. Les lames ont été fixées dans un bain d'acétone pendant 20 minutes, séchées toute la nuit puis colorées le lendemain par une coloration May-Grünwald Giemsa (MGG). La coloration MGG permet de différencier les populations cellulaires. Les populations de macrophages, lymphocytes et neutrophiles ont été comptées sans prendre en compte les cellules épithéliales. Pour cela et afin d'être représentatif de l'échantillon, 20 photos par lame ont été prises à l'objectif 20X (Acroplan x20/0.45, ZEISS) sur un microscope Axio Imager M2 (ZEISS) en lumière blanche et un minimum de 300 cellules ont été identifiées et comptées afin d'établir le pourcentage représenté par chaque population (Figure 25). Le nombre absolu de chaque type cellulaire a ensuite été calculé de la manière suivante :

Nombre de Macrophages/Lymphocytes/Neutrophiles = Proportion de la population cellulaire (%) x Nombre total de cellules vivantes

Le reste des échantillons de LBA a finalement été centrifugé à 400 g pendant 10 minutes à 4°C. Le surnageant a été récupéré et conservé à -80°C pour analyse ultérieure des protéines. Le culot a été conservé à -80°C.

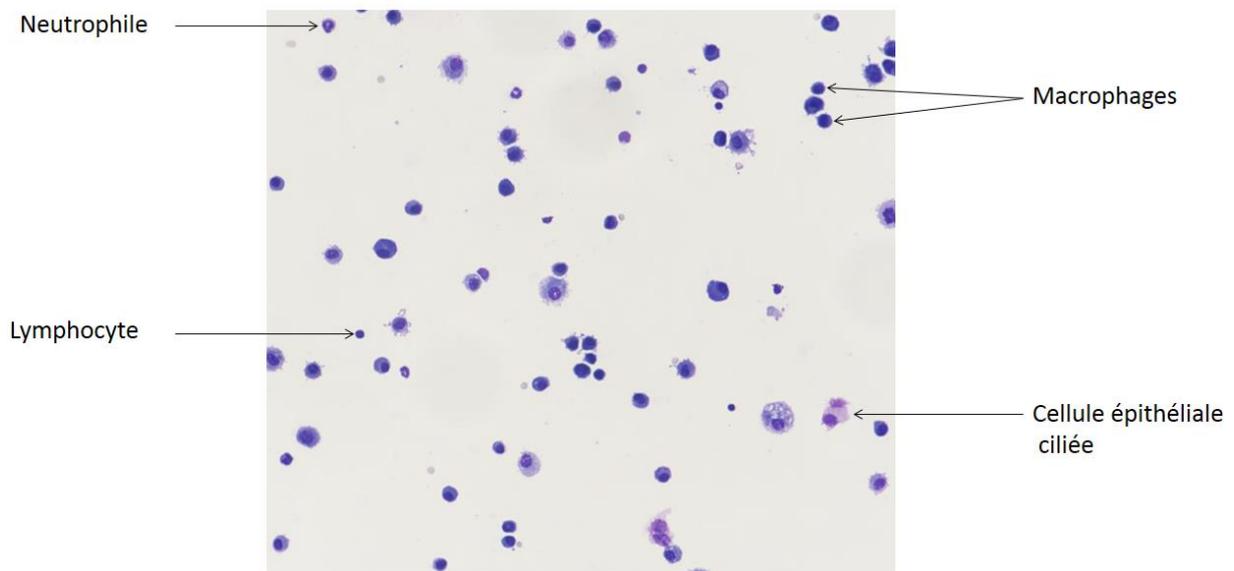


Figure 25 Photographie de LBA et identification des différentes populations cellulaires.

3.2 Mesures histologiques

3.2.1 Préparation des échantillons de poumons

Les échantillons de poumons ont été laissés dans la solution de formaldéhyde 4% pendant 24 à 48 H. Les poumons ont été nettoyés avant leur mise cassette : le cœur, la trachée, l'œsophage et tout autre tissu éventuellement prélevé ont été retirés. Les poumons ont ensuite été inclus en paraffine, coupés à 4 μm d'épaisseur selon une orientation médio-frontale et ont été colorés à l'hématoxyline-éosine (HE) à la plateforme histologie-imagerie de l'IMRB. Les lames ont ensuite été scannées au scanner Axioscan 7 (ZEISS) afin d'avoir une vue globale de la structure du poumon.

3.2.2 Étude morphométrique

L'analyse morphométrique qui a été conduite a permis de déterminer l'intercept linéaire moyen ou *mean linear intercept* (MLI). Celui-ci correspond à la distance moyenne entre 2 septa alvéolaires. Il renseigne ainsi sur le niveau d'alvéolisation du poumon et constitue un indice de l'intégrité des structures pulmonaires. La méthode utilisée a consisté à tracer des lignes

horizontales régulièrement espacées sur une photo de coupe de poumons et à en mesurer la longueur uniquement dans les espaces alvéolaires (Figure 26). Cette méthode, pensée par Xavier Decrouy (responsable technique et scientifique de la plateforme imagerie) et Zhuyi Lu (doctorante au sein de l'équipe) a été adaptée de celle décrite par Weibel (384) puis par Crowley (385). Pour l'évaluation du MLI, 20 photos réparties aléatoirement sur la coupe de poumon ont été prises par individu. Ainsi pour chaque individu, la mesure du MLI correspond à l'ensemble des espaces alvéolaires mesurés et moyennés sur 20 photos. L'acquisition des images a été réalisée à l'objectif 20X (Acroplan x20/0.45, ZEISS) sur un microscope Axio Imager M2 (ZEISS) équipé d'une caméra monochrome AxioCam MRm (ZEISS). Les analyses de MLI ont été effectuées à l'aide du logiciel Fiji (ImageJ) sur lequel une macro développée par Xavier Decrouy a été développée afin d'automatiser les mesures.

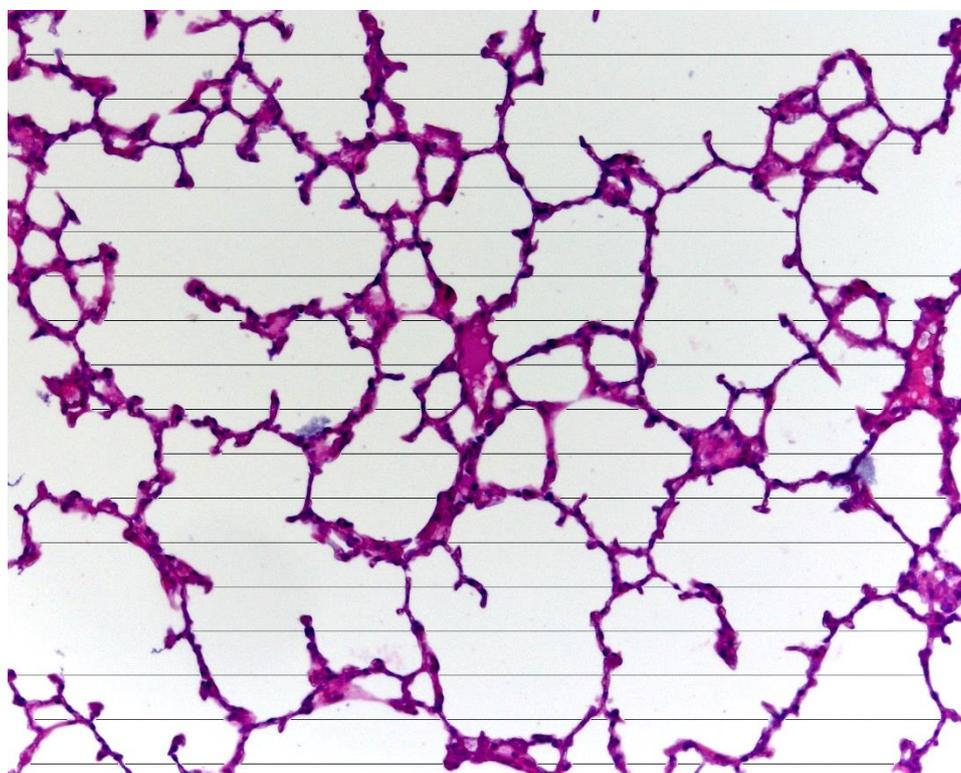


Figure 26 Méthode de détermination du MLI. Image représentant les lignes horizontales tracées dans les espaces alvéolaires.

3.2.3 Quantification du mucus sécrété

Le mucus sécrété dans les voies respiratoires a été mis en évidence par coloration Periodic Acid Schiff (PAS). Cette coloration est spécifique des polysaccharides et colore ainsi le mucus constitué en grande partie de glycoprotéines en rose-violet. La coloration PAS a été réalisée à la fois sur cytospin de LBA et sur coupe de poumons à l'aide du Periodic Acid-Schiff

stain kit en suivant le protocole du fournisseur (Epredia 87007, Thermo Scientific). Pour la coloration PAS, les poumons ont été spécifiquement coupés au niveau du hile, point d'insertion des bronches dans le poumon. En effet chez la souris, on ne retrouve pas de glande sous-muqueuse et les cellules caliciformes et le mucus produit se concentrent principalement au niveau des grosses bronches. Les lames de LBA ont été scannées au microscope Axio Imager M2 (ZEISS) tandis que les coupes de poumon ont été scannées au scanner Axioscan 7 (ZEISS). Les scans ont été réalisés à l'objectif 10X. Par la suite, la quantification du mucus a été réalisée sur Fiji (ImageJ). Il est à noter qu'aucune contre-coloration n'a été réalisée afin de faciliter la quantification. Pour quantifier le marquage PAS sur scan de LBA, une première étape consistant à éliminer le bruit de fond a été suivie. Pour chaque campagne, un échantillon de référence avec une coloration PAS bien marquée a été choisi afin de déterminer les paramètres d'analyse. Le plugin Colour Deconvolution d'ImageJ a été utilisé afin d'isoler la couleur correspondant au marquage PAS. Celle-ci a été échantillonnée dans une zone homogène directement sur l'image. Enfin, une étape de seuillage a permis de mettre en évidence les zones présentant cette coloration. L'aire de la zone ainsi mise en évidence a ensuite été mesurée. Les mêmes paramètres RGB de la couleur PAS et la même valeur seuil ont été appliqués pour

l'analyse de toutes les autres images de la même campagne. Un exemple de quantification du marquage PAS sur LBA est présenté en Figure 27.

La même stratégie a été suivie afin de quantifier le marquage PAS sur coupe de poumon en faisant toutefois face à 2 complexités supplémentaires. La première est que le marquage PAS est limité aux bronches. La seconde est que la quantité de bronches n'est pas égale d'une coupe à l'autre ce qui a nécessité une normalisation des résultats. Ainsi, une étape additionnelle visant à détecter et à détourner les bronches présentes sur la coupe a été ajoutée afin de restreindre la

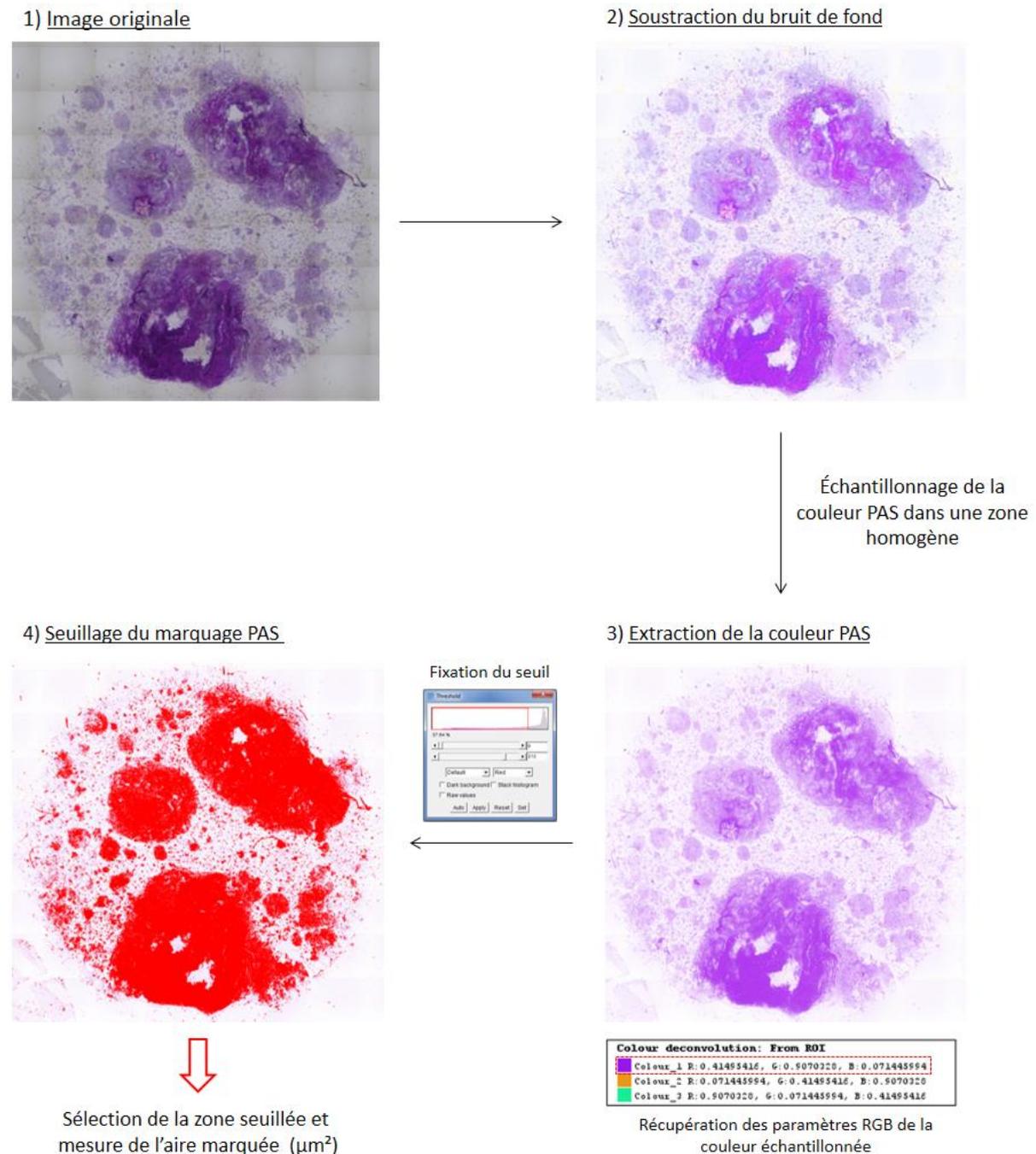
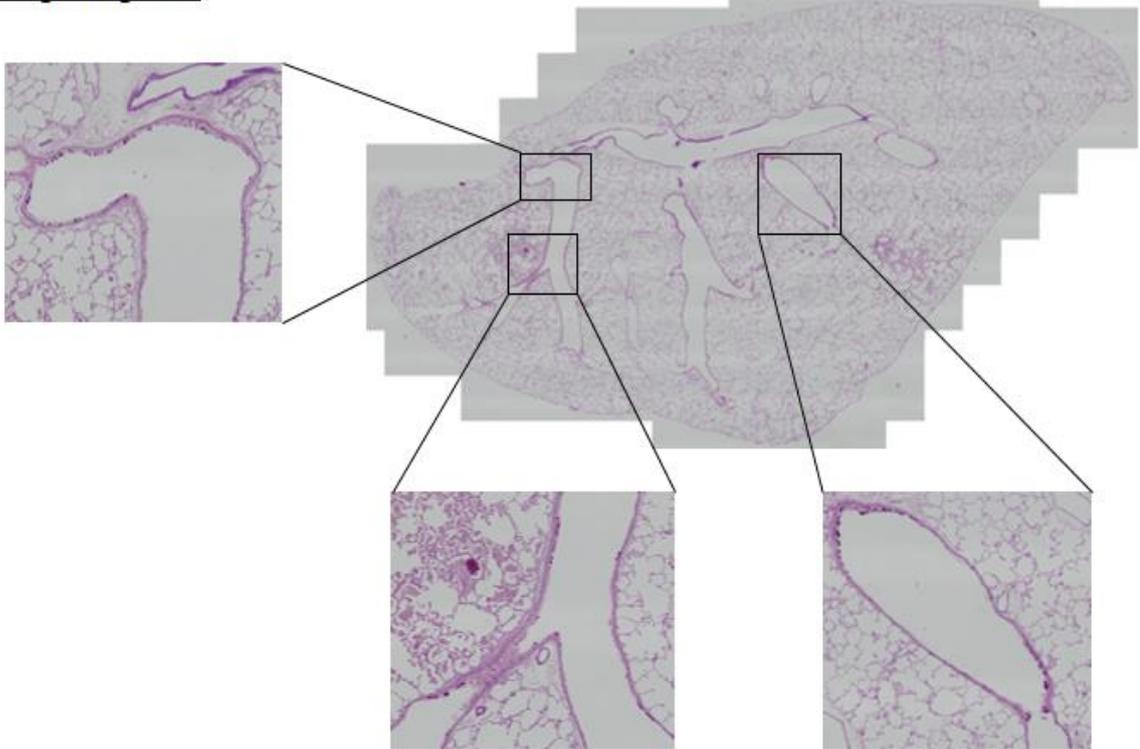


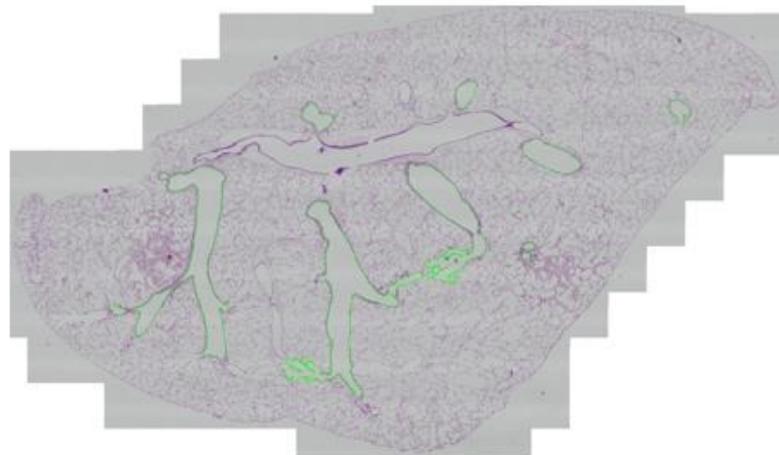
Figure 27 Quantification du marquage PAS sur scan de LBA.

quantification du marquage uniquement aux bronches (Figure 28). Le périmètre des bronches ainsi détournées a été mesuré. Après cette étape de détournement, la coloration PAS a été extraite avec le plugin Colour Deconvolution et le seuillage effectué de la même façon que décrite précédemment. La surface du marquage PAS a été mesurée. La coloration PAS a finalement été normalisée en rapportant la surface marquée au PAS au périmètre total de bronches présentes sur la coupe.

1) Image originale



2) Détection et détourage des bronches



Extraction des bronches



Mesure du périmètre des bronches détournées (μm)



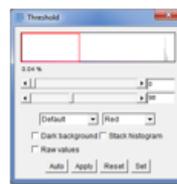
3) Extraction de la couleur PAS



Couleur deconvolution: From ROI		
Couleur_1	R: 0.2942914, G: 0.9202095, B: 0.2275101	
Couleur_2	R: 0.2275101, G: 0.2942914, B: 0.9202095	
Couleur_3	R: 0.9202095, G: 0.2275101, B: 0.2942914	

Récupération des paramètres RGB de la couleur échantillonnée

Fixation du seuil



4) Seuillage du marquage PAS



Sélection de la zone seuillée et mesure de l'aire marquée (μm^2)

5) Normalisation des résultats

$$\text{Quantification du PAS } (\mu\text{m}^2 \text{ de PAS}/\mu\text{m de bronches}) = \frac{\text{Surface marquée au PAS } (\mu\text{m}^2)}{\text{Périmètre des bronches } (\mu\text{m})}$$

Figure 28 Quantification du marquage PAS sur coupe entière de poumon. Pour illustrer la quantification, un zoom a été fait sur des zones concentrées en cellules à mucus.

J'ai pu développer une macro permettant l'automatisation complète de la quantification du marquage PAS sur LBA. J'ai également développé une macro semi-automatique permettant la quantification du marquage sur coupe entière de poumon. Pour cette seconde macro, la

quantification est dite semi-automatique car une étape manuelle de vérification des bronches sélectionnées avec possibilité de supprimer des zones de non-intérêt ou d'ajouter des zones qui auraient été non détectées a été incrémentée.

3.3 Immunofluorescence

La recherche de NETs sur coupes de poumons a été effectuée par immunofluorescence. Les NETs correspondent à des structures extracellulaires fibreuses composées d'ADN et de protéines ayant pour but de piéger les micro-organismes. Le protocole suivi a été celui proposé par Radermecker et al. (386). Ce protocole propose d'identifier les NETs comme les zones présentant un double marquage positif à 2 composants des NETs. Il s'agit de la myéloperoxydase (MPO), une enzyme présente dans les granulations des neutrophiles, et d'ADN extracellulaire associé à une forme particulière de l'histone 3 où l'arginine a été remplacée par la citrulline, l'histone 3 citrulliné (Cit-H3). Les coupes de poumons ont été déparaffinées au xylène et réhydratées dans des bains d'éthanol de concentration décroissante puis rincées à l'eau courante. Les épitopes ont été démasqués avec du tampon Tris-EDTA pH 9 (10 mM Tris-base, 1 mM EDTA) à 99°C pendant 20 minutes. Les coupes ont été perméabilisées avec du Triton 0.5% pendant 2 minutes puis rincées au tampon phosphate salin (PBS, pour Phosphate Buffered Saline). Le blocage des sites non spécifiques a été réalisé par une incubation de 1 heure à température ambiante dans un tampon de blocage constitué de PBS et d'albumine de sérum bovin à 2% (BSA, pour Bovine Serum Albumin). Les coupes ont ensuite été incubées pendant toute une nuit à 4°C avec le mélange d'anticorps primaires MPO (AF3667, R&D Systems) concentré à 5 µg/mL et Cit-H3 (ab5103, Abcam) concentré à 10 µg/mL ou le mélange d'IgG isotypes contrôles pour le contrôle négatif. Le lendemain, le mélange d'anticorps secondaires (Invitrogen, Alexa Fluor 488 A-11055 et Alexa Fluor 594 A-11012, 1/200 dilués dans le tampon de blocage) a été incubé pendant 2 heures à température ambiante. Les lames ont été montées au ProLong Gold DAPI (Invitrogen) puis observées sur un microscope Axio Imager M2 (ZEISS).

4 Étude de la fonction pulmonaire

La fonction pulmonaire a été étudiée à l'aide du flexiVent™ (SCIREQ). Cet appareil est dédié à l'étude de la fonction respiratoire *in vivo* chez le petit animal et permet une analyse quantitative des propriétés élastiques du poumon. La fonction respiratoire a été quantifiée immédiatement en sortie d'exposition. Pour cela, au moment du sacrifice, les animaux ont été pesés et anesthésiés comme décrit précédemment. Une intubation trachéale a été réalisée et l'animal a été relié au flexiVent™ qui comporte un respirateur artificiel (Figure 29). Le flexiVent™ assure une ventilation en volume de l'animal : ce sont le volume et le débit d'air qui sont fixés par l'expérimentateur et c'est la pression qui est mesurée en sortie. La machine est également calibrée en fonction du poids de l'animal et permet ainsi une ventilation adaptée à chaque animal. Une fois l'animal branché sous respirateur, une solution de curare a été injectée à l'animal par voie intrapéritonéale à une dose de 0.5 mg/kg (Rocuronim 10 mg/mL, Hospira). Le curare est un myorelaxant utilisé ici pour s'affranchir des mouvements respiratoires réflexes de l'animal et avoir une ventilation uniquement due à la machine. Différentes perturbations calibrées du système et pilotées par le logiciel permettent ensuite d'avoir accès à plusieurs paramètres respiratoires tels que la capacité inspiratoire, la compliance, l'élastance, la résistance ou encore le volume expiratoire maximal seconde (VEMS). Pour des raisons techniques, la mesure de la fonction pulmonaire n'a pu être réalisée que sur les campagnes PolluRisk#8, #9, #10 et #12. De même, le module permettant la mesure du VEMS n'a été utilisé que lors de la campagne PolluRisk#12. Par ailleurs, à cause des éventuelles altérations pulmonaires structurales induites par cette ventilation forcée, aucun prélèvement destiné à l'histologie n'a été effectué sur les animaux testés au flexiVent. Toutefois, des prélèvements de sang, de LBA et de poumons destinés à l'étude de l'expression des gènes et des protéines ont été réalisés comme décrit plus haut dans la partie sacrifice.

5 Analyses biologiques

5.1 Numération sanguine et prélèvement du plasma

Une fois le prélèvement de sang réalisé, les échantillons ont été conservés à température ambiante jusqu'à réalisation de la numération de la formule sanguine le jour même. Celle-ci a été réalisée par l'analyseur hématologique VetScanHM5 (Abaxis) permettant de quantifier les différents types cellulaires : globules blancs (lymphocytes, monocytes, neutrophiles, éosinophiles, basophiles), globules rouges et plaquettes. Après réalisation de la numération cellulaire, le plasma a été prélevé. Celui-ci a été isolé par 2 centrifugations successives à température ambiante. Une première centrifugation pendant 10 minutes à 400 g a permis d'éliminer les globules rouges tout en limitant l'hémolyse. Le surnageant a été récupéré et soumis à une seconde centrifugation pendant 10 minutes à 3500 g afin d'éliminer les éventuelles cellules restantes. Le plasma a ensuite été conservé à -80°C.

5.2 Étude de l'expression des gènes

5.2.1 Extraction et dosage des ARN totaux

Les ARN totaux ont été extraits à partir du lobe pulmonaire supérieur droit stocké à sec à -80°C. L'extraction des ARN a ensuite été réalisée à l'aide du RNeasy Mini Kit (Qiagen). Les tissus pulmonaires ont été broyés au TissueLyserII (Qiagen) 2 minutes à 30 Hz dans du tampon de lyse (tampon RLT fourni par le kit contenant 1% de β -mercaptoéthanol). Le protocole du

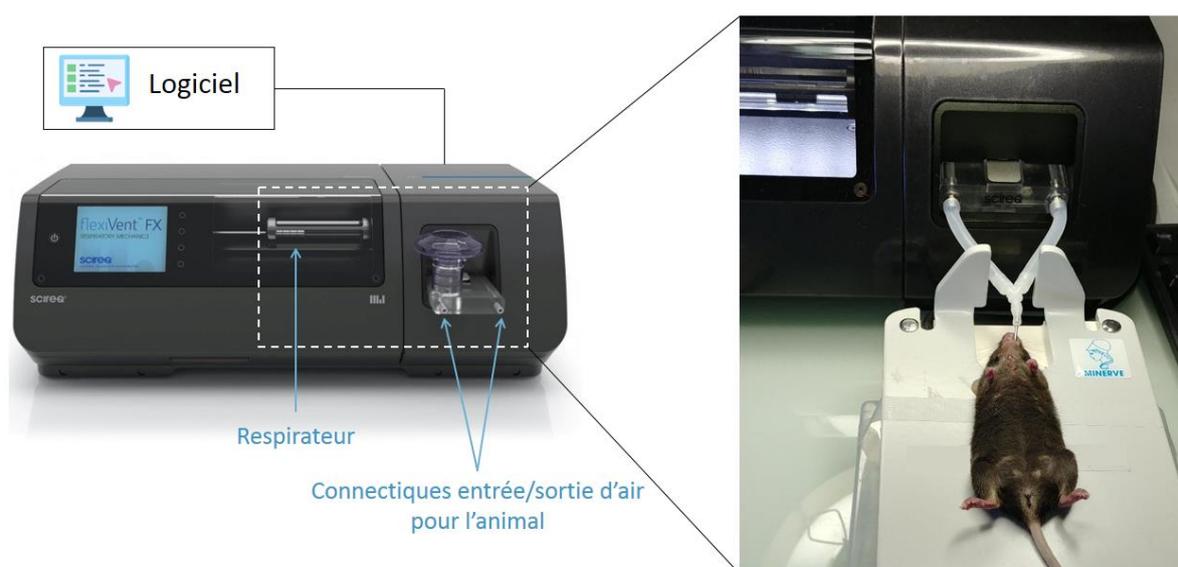


Figure 29 Machine flexiVent™ et branchement de la souris sous respirateur.

fournisseur a été suivi. Une fois extraits, les ARN ont été dosés au NanoDrop (DeNovix DS-11 Spectrophotometer) et conservés à -80°C.

5.2.2 Étude de la transcription par RT-qPCR

Une rétrotranscription de 1 µg d'ARN dans un volume total de 40 µL a été effectuée à l'aide de l'enzyme Superscript III (Invitrogen). Les ADNc obtenus ont été dilués à 1,25 ng/µL afin de réaliser la qPCR. Celle-ci a été effectuée dans un mélange contenant 5 µL de SYBR™ Select Master Mix (Applied Biosystems™), 0,4 µM de chaque primer, 4 µL d'ADNc et de l'eau pour un volume réactionnel total de 10 µL. La réaction a été réalisée sur l'appareil de PCR quantitative QuantStudio™ 6 Flex (Applied Biosystems™) selon le protocole suivant : 50 °C – 2 minutes, 95°C – 2 minutes, 40 cycles 95°C – 1 seconde/60°C – 30 secondes suivi d'un programme de dissociation. Pour chacun des échantillons et chacun des gènes étudiés, la qPCR a été faite en duplicat ou triplicat. La liste des gènes étudiés ainsi que la séquence des amorces utilisées est précisée dans le Tableau 7. Celles-ci ont été conçues avec l'outil en ligne Primer-BLAST (National Center for Biotechnology Information). L'expression des gènes a été quantifiée avec la méthode du $\Delta\Delta CT$ en utilisant le gène *Hprt* (codant pour l'hypoxanthine guanine phosphoribosyltransférase) comme gène de référence.

Tableau 7 Séquences des amorces des gènes étudiés par RT-qPCR

Symbole du gène – Nom du gène	Séquence des amorces (5' → 3')	
	Amorces sens	Amorces anti-sens
Gène de référence		
<i>Hprt</i> - hypoxanthine guanine phosphoribosyltransférase	AGCAGTACAGCCCCAAA ATG	GTCTGGCCTGTATCCAA CACT
CFTR		
<i>Cftr</i> - cystic fibrosis transmembrane conductance regulator	GAAGCGATGTTGGATTGC CAG	CTCAGAAGTGCCTGAA GGGAG
Mucines		
<i>Muc5b</i> - mucin 5, subtype B, tracheobronchial	TGTTACGGACAACGGTGT GG	TAGACCATAGGCGCCTG ACA
<i>Muc5ac</i> - mucin 5, subtypes A and C, tracheobronchial/gastric	TCACCCTCAAGGGCATGT TG	GCCTGGTATGTCCTGGG TTG

Inflammation

<i>Ccl2</i> - chemokine (C-C motif) ligand 2	GCTGGAGCATCCACGTGT T	GAGTGGGGCGTAACT GCAT
<i>Cxcl1</i> - chemokine (C-X-C motif) ligand 1	TCAAGAATGGTCGCGAG GCT	CTTTCTCCGTTACTTGG GGACA
<i>Cxcl15</i> - chemokine (C-X-C motif) ligand 15	TGGGTGAAGGCTACTGTT GG	CAGAAGCTTCATTGCCG GTG
<i>Cxcl2</i> - chemokine (C-X-C motif) ligand 2	CCCCTGGTTCAGAAAATC ATCCA	TTCTCTTTGGTTCTTCCG TTGAGG
<i>Il1b</i> - interleukin 1 beta	TTGAAGTTGACGGACCCC AAA	AAGCTGGATGCTCTCAT CAGG
<i>Il6</i> - interleukin 6	TGATGGATGCTACCAAAC TGGA	GGTACTCCAGAAGACC AGAGRG
<i>Rela</i> - v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A (avian)	GATGGCTACTATGAGGCT GACC	CAGGTCTCGCTTCTTCA CAC
<i>Tgfb1</i> - transforming growth factor, beta 1	GCTAATGGTGGACCGCA AC	ACTGTGTGAGATGTCTT TGGTTTTC
<i>Tnf</i> - tumor necrosis factor	TGTCTACTGAACTTCGGG GTG	GCCATAGAACTGATGA GAGGGA

Stress oxydant

<i>Cat</i> - catalase	TTCTGGAGTCTTCGTCCC GA	CCATAGCCATTCATGTG CCG
<i>Gpx1</i> - glutathione peroxidase 1	CCTGTGAGCGCTAGTACG G	GAGAAGGCATACACGG TGGAC
<i>Gstm1</i> - glutathione S-transferase, mu 1	ATGCTCTGTTACAACCCT GACT	CCTGCAAACCATGGCCT CTT
<i>Hmox1</i> - heme oxygenase 1	CACAGATGGCGTCACTTC GT	GCTAGTGCTGATCTGGG GTT
<i>Nfe2l2</i> - nuclear factor, erythroid derived 2, like 2	CTGTATGCAGCTTTTGGC AGA	GAGGGGCAGTGAAGAC TGAAC
<i>Nqo1</i> - NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1	TGGTTTGAGAGAGTGCTC GT	CCCCAGTGGTGATAGA AAGCA
<i>Sod1</i> - superoxide dismutase 1, soluble	ACGTCCATCAGTATGGGG ACA	CAGGTCTCCAACATGCC TCTC
<i>Sod2</i> - superoxide dismutase 2, mitochondrial	TCGCTTACAGATTGCTGC CT	GGTAGTAAGCGTGCTCC CAC

Remodelage pulmonaire

<i>Elane</i> - elastase, neutrophil expressed	ACCCAGTGTGCTACAAGA GC	GTGCATACG TTCACACG ACG
<i>Mmp9</i> - matrix metallopeptidase 9	CGACATAGACGGCATCC AGTA	GTCGGCTGTGGTTCAGT TGT
<i>Mmp12</i> - matrix metallopeptidase 12	GGCTGCTCCCATGAATGA CA	GTCATTGGAATTCTGTC CTTTCCA
<i>Slpi</i> - secretory leukocyte peptidase inhibitor	TGCGGCCTTTTACCTTTC AC	GGGCAGGCTCCGATTTT GAT
<i>Timp1</i> - tissue inhibitor of metalloproteinase 1	CAGCCTTCTGCAACTCGG AC	AACGCTGGTATAAGGT GGTCTC
<i>Timp2</i> - tissue inhibitor of metalloproteinase 2	GCAACAGGCGTTTTGCAA TG	CGGAATCCACCTCCTTC TCG
<i>Timp3</i> - tissue inhibitor of metalloproteinase 3	CCTTTGGCACTCTGGTCT ACA	CTTTCAGAGGCTTCCGT GTGA
<i>Timp4</i> - tissue inhibitor of metalloproteinase 4	GACTCTTCCCTCTGTGGT GTG	CCAGGGCTCAATGTAGT TGC

5.3 Étude de l'expression des protéines

5.3.1 Extraction et dosage des protéines

Les protéines ont été extraites à partir du lobe pulmonaire inférieur droit conservé à sec à -80°C. Les échantillons de poumons ont été broyés au TissueLyserII (Qiagen) 2 minutes à 30 Hz dans 600 µL de tampon de lyse RIPA (Sigma-Aldrich), 10% d'anti-protéase (Sigma-Aldrich) et 10% d'anti-phosphatase (Sigma-Aldrich). Les protéines totales ont été diluées au 1/500^{ème} afin d'être dosées par la méthode de Bradford. Une gamme étalon comprenant 8 points de standards de 0 à 25 µg/mL a été constituée à partir d'une solution de BSA concentrée à 1 mg/mL. La gamme a été déposée en duplicats et les échantillons ont été déposés en triplicats sur plaque 96 puits. Après ajout du réactif de Bradford, la densité optique de la gamme ainsi que celle des échantillons a été mesurée à 595 nm par spectrophotométrie par un lecteur de plaque (Infinite 200 Pro, TECAN).

5.3.2 Western Blot

L'expression des protéines extraites des poumons a été étudiée par la technique du western blot. Les protéines ont été séparées en conditions dénaturantes par électrophorèse (1h à 60 V puis 1h30 à 120 V) sur un gel à 12.5% d'acrylamide surmonté d'un gel de concentration à 4% d'acrylamide contenant chacun du dodécylsulfate de sodium (SDS). Pour aider à la dénaturation des protéines, les échantillons ont été incubés à 95°C pendant 5 minutes dans du tampon Laemmli 1X (Sigma-Aldrich) avant leur dépôt sur le gel. Une quantité de 20 µg de protéines a été déposée dans chaque puits. Une fois la séparation terminée, les protéines ont été transférées à sec en 7 minutes sur une membrane polyfluorure de vinyle (PVDF - IB24001, Life Technologies) à l'aide du système iBlot2 (Life Technologies). Les membranes ont été immergées dans du rouge ponceau afin de vérifier la présence de protéines et ainsi s'assurer que le transfert a bien fonctionné. Les membranes ont ensuite été rincées à l'eau distillée afin d'éliminer le rouge Ponceau puis saturées 2 x 30 minutes dans une solution de lait 5% dilué dans du tampon 1X tris-buffered saline 0.1% Tween (TBST). Après cette étape de blocage des sites non spécifiques, les membranes ont été lavées au TBST 3 fois 10 minutes puis incubées pendant toute une nuit à 4°C sous agitation lente avec les solutions d'anticorps primaire correspondant aux différentes protéines étudiées (Tableau 8). La β -actine a été utilisée comme protéine de ménage afin de normaliser l'expression des protéines d'intérêt. Le lendemain et après lavages des membranes dans du TBST comme indiqué précédemment, la solution d'anticorps secondaire a été ajoutée et laissée 1 heure à température ambiante sous agitation lente. Toutes les dilutions d'anticorps primaires et secondaires ont été réalisées dans une solution de lait 5% TBST. A la fin de l'incubation de l'anticorps secondaire, les membranes ont été lavées de nouveau au TBST comme précédemment puis incubées pendant 5 minutes avec le substrat spécifique de l'enzyme conjuguée à l'anticorps secondaire. Pour les anticorps couplés à la peroxydase de raifort (HRP, pour Horseradish Peroxidase), le substrat ajouté correspond à un mélange en volume 1:1 d'une solution de peroxyde et d'une solution de luminol (SuperSignal West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate, Thermo Scientific). Pour l'anticorps secondaire de la β -actine couplé à la phosphatase alcaline (AP, pour Alkaline Phosphatase), le substrat ajouté est l'Immun-Star AP Substrate (Biorad). Les membranes ont finalement été révélées en chimiluminescence grâce au système G:BOX (Syngene). Les bandes de protéines ont été quantifiées à l'aide du logiciel GeneTools (Syngene).

Tableau 8 Liste des protéines étudiées en western blot et anticorps utilisés

Protéine	Poids moléculaire	Anticorps primaire	Anticorps secondaire
GPX1	22 kDa	ab22604 (Abcam) 1/500	NA934 (Amersham ECL) Conjugué HRP 1/5 000
MMP12	40 kDa	MA532011 (ThermoFisher) 1/1 000	7074 (Cell Signaling) Conjugué HRP 1/5 000
MMP9	92 kDa	ab228402 (Abcam) 1/1 000	NA934 (Amersham ECL) Conjugué HRP 1/5 000
β -actine	40 kDa	A5316 (Sigma-Aldrich) 1/10 000	1706520 (Biorad) Conjugué AP 1/10 000

5.3.3 ELISA

Le dosage d'ELANE, de la MPO et des mucines MUC5AC et MUC5B a été réalisé par la technique ELISA à l'aide des kits DY4517-05 (R&D Systems), DY3667 (R&D Systems), SEA756Mu-96 (Cloud-Clone Corp, CliniSciences) et SEA684Mu-96 (Cloud-Cone Corp, CliniSciences) respectivement. Les dosages d'ELANE et de MPO ont été réalisés sur surnageant de LBA non dilué tandis que les dosages des mucines MUC5AC et MUC5B ont été réalisés sur broyats de poumons. Le protocole du fournisseur a été suivi. Les plaques 96 puits ont été coatées pendant toute une nuit à température ambiante avec l'anticorps de capture anti-ELANE et anti-MPO. Les plaques MUC5AC et MUC5B étaient déjà pré-coatées. Une gamme étalon constituée de 8 concentrations de standards déposés en duplicat a été réalisée. Les échantillons ont été déposés en simplicité. Après une première incubation des échantillons et des standards pendant 2 heures sur la plaque, un anticorps de détection biotinylé a été ajouté. Une seconde incubation de 2 heures a été effectuée. Une solution de streptavidine-HRP a ensuite été ajoutée et laissée 20 minutes à l'abri de la lumière. La solution de substrat a été ajoutée et la plaque a été incubée pendant 20 minutes toujours à l'abri de la lumière. A l'issue de cette dernière incubation, la réaction a été stoppée par ajout d'acide sulfurique. La densité optique a été mesurée immédiatement à 450 nm par un lecteur de plaque (Infinite 200 Pro,

TECAN). Il est à noter que pour les mucines MUC5AC et MUC5B, l'ensemble des incubations a été réalisé à 37°C. Pour les dosages d'ELANE et de MPO, une correction a été appliquée par une seconde lecture à 540 nm. Enfin, les concentrations d'ELANE, de MPO et des mucines MUC5AC et MUC5B ont été calculées à l'aide de la courbe étalon après déduction du blanc.

5.3.4 Luminex

Le dosage de cytokines pro et anti-inflammatoires a été réalisé par la technique du Luminex sur surnageant de LBA à l'aide du kit Milliplex MAP Mouse Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel (MCYTOMAG-70K, Merck Millipore). Ce kit permet le dosage d'un panel de 32 cytokines et chimiokines : G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-10, IL-12 (p40), IL-12 (p70), IL-13, IL-15, IL-17, IP-10, KC, LIF, LIX, MCP-1, M-CSF, MIG, MIP-1 α , MIP-1 β , MIP-2, RANTES, TNF- α , VEGF et Eotaxin/CCL11. Le dosage par Luminex de ces cytokines a été réalisé par la plateforme dosage biomarqueurs de l'IMRB.

5.4 Étude de l'activité de CFTR

Chez l'Homme, le test de la sueur constitue le test de référence pour le diagnostic de la mucoviscidose par l'évaluation de l'activité du canal CFTR. Celle-ci est réalisée par le dosage des ions chlorure et sodium dans la sueur. La souris, et plus largement tous les rongeurs, ne possèdent pas de glandes sudoripares. Une approche alternative résidant en la réalisation d'un test de sécrétion salivaire, considéré comme l'équivalent murin du test de la sueur, a été développée (387,388). Sur la base de différents protocoles (388–390), j'ai pu adapter ce test de sécrétion salivaire au laboratoire et en mettre au point une version sans intervention chirurgicale. Les animaux ont été anesthésiés par voie intrapéritonéale par injection de 10 μ L/g de poids corporel d'un mélange de Kétamine (80 mg/kg) et Xylazine (10 mg/kg). Cette sédation légère permet l'immobilisation des animaux le temps de la récolte de la salive tout en conservant une déglutition consciente afin d'éviter l'asphyxie des animaux avec leur salive. Une fois endormis, les animaux ont reçu une injection de pilocarpine (Pilocarpine Faure 2% diluée au 1/100 dans du sérum physiologique) par voie intrapéritonéale à une dose de 0.5 mg/kg afin de stimuler la sécrétion salivaire. Les animaux ont été placés sur un support incliné à 35°, fixés par la queue, la mâchoire reposant sur une boîte de Pétri et la bouche reposant sur un

tampon coton Salivette® (Sarstedt) (Figure 30). Dès l'apparition de la première goutte de salive dans la bouche (soit environ 5 minutes après injection de la pilocarpine), un chronomètre a été déclenché et la récolte de salive a été réalisée pendant 15 minutes. Le prélèvement d'un volume de 200 à 300 μL de salive a été réalisé de manière non invasive par simple absorption de celle-ci sur le coton Salivette®. Une fois la récolte terminée, les animaux ont été placés dans une cage de réveil dans laquelle a été placé un tapis chauffant pour éviter l'hypothermie des animaux. Dans les conditions d'anesthésie utilisées, le réveil des animaux est intervenu environ 30 minutes suivant l'injection de l'anesthésiant. Les animaux ont été surveillés jusqu'à leur réveil complet et de l'hydrogel a été placé dans la cage afin d'éviter la déshydratation. Ce protocole offre la possibilité de réaliser le test de salivation plusieurs fois sur le même animal et ainsi de suivre dans le temps l'activité du canal CFTR, chaque animal étant son propre contrôle. Dans ce contexte, les animaux de la lignée *Cfr*^{tm1EUR} ont été soumis une première fois au test de salivation avant leur exposition puis soumis une seconde fois à ce même test immédiatement à la fin de l'exposition. A la fin du deuxième test et au moment du sacrifice terminal, une dose de rappel d'anesthésiant (Buprénorphine – Zoletil - Xylazine) a été injectée par voie intrapéritonéale avant de procéder aux prélèvements des glandes salivaires ainsi qu'aux prélèvements sanguins et pulmonaires comme décrit précédemment.



Figure 30 Test de sécrétion salivaire chez la souris.

Après récolte, la salive a été extraite du coton Salivette® par centrifugation à 1 000 g pendant 2 minutes et récupérée dans un tube Eppendorf 1,5 mL préalablement pesé. Le tube a été pesé une seconde fois après centrifugation de la salive permettant ainsi de calculer le volume de salive récolter. Le pH a été mesuré dans l'échantillon de salive à l'aide d'une microélectrode (Orion, Fisher Scientific). Les échantillons de salive ont été conservés à 4°C avant d'être

envoyés à la plateforme biochimie de l'hôpital Henri Mondor où ont été dosés les ions chlorure, sodium, bicarbonates et potassium (analyseur Cobas 8000, Roche).

6 Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel Graphpad Prism 9.0. La présence d'outliers, ou valeurs aberrantes, a été testée avec la méthode ROUT. La normalité des données a ensuite été testée grâce au test de Shapiro-Wilk. Dans le cas d'une distribution normale des données, les groupes d'animaux ont été comparés entre eux par un test ANOVA suivi, en cas de positivité, de comparaisons 2 à 2 par test t de Student. Dans le cas d'une distribution ne satisfaisant pas l'hypothèse de normalité, les groupes ont été comparés par un test de Kruskal-Wallis puis, en cas de positivité, de comparaisons 2 à 2 par test U de Mann-Whitney. Le seuil de significativité a été fixé à 0.5 % ($p \leq 0.05$). Sauf indication contraire, les barres d'erreur des représentations graphiques correspondent à la Moyenne \pm Erreur type.

Afin d'intercomparer les effets induits par les différentes atmosphères, des graphiques en radar ont été réalisés à l'aide d'Excel. Pour cela, l'ensemble des marqueurs étudiés a été regroupé en 5 grandes catégories : sécrétion du mucus/expression des mucines, destruction des tissus pulmonaires, stress oxydant, marqueurs pro-inflammatoires et marqueur(s) anti-inflammatoire(s). Le détail des marqueurs considérés dans chacun des groupes est donné dans le Tableau 9. Pour chacun des marqueurs listés, chaque atmosphère d'étude, chaque modèle et chaque génotype, un fold-change traduisant la variation entre la moyenne du marqueur dans le groupe exposé et la moyenne dans le groupe témoin non exposé a été calculé. Pour chaque groupe de marqueurs, un fold-change moyen a ensuite été calculé à partir des fold-change de tous les marqueurs composant le groupe. Pour des préoccupations d'échelle, les graphiques radar ont finalement été tracés à partir des transformations Log_{10} de ces fold-change moyens.

Tableau 9 Liste des paramètres considérés dans chaque groupe biologique étudié.

Groupe de marqueurs	Nombre de marqueurs	Liste des marqueurs
Sécrétion du mucus / Expression des mucines	2-4	(Marquage PAS sur LBA)
		(Marquage PAS sur tissus) Expression protéique de : MUC5AC et MUC5B
Destruction des tissus pulmonaires	4	MLI
		Expression protéique de : ELANE, MMP9 et MMP12

Stress oxydant	2	Expression protéique de : MPO et GPX1 Calcul du rapport MPO/GPX1
Marqueurs pro-inflammatoires	18-22	Expression protéique de : G-CSF, IFN- γ , IL-1 α , IL-2, (IL-5), IL-6, IL-9, IL-12(p40), IL- 13, IL-15, (IL-17), CXCL10, CXCL1, (CXCL5), MIP-1 α , (MIP-1 β), MIP-2, CCL5, TNF- α , VEGF, NE Cellularité différentielle du LBA : nombre de macrophages, nombre de lymphocytes et nombre de neutrophiles
Marqueurs anti-inflammatoires	1-2	Expression protéique de : IL-10 et (LIF)

N.B : Les marqueurs listés entre parenthèses n'ont été considérés que pour un des 2 modèles.

CHAPITRE IV

IV. Résultats

Ce chapitre est consacré à la présentation des résultats obtenus au cours de la thèse. Ces résultats permettent de comprendre quels sont les effets associés à une exposition aigüe à la pollution atmosphérique et plus spécifiquement à des atmosphères de type urbain sur le phénotype pulmonaire de la mucoviscidose chez deux modèles précliniques de la maladie. La présentation de ces résultats est articulée en trois parties.

Partie 1 Dans cette première partie, nous présenterons les résultats observés chez le modèle *Scnn1b*-Tg dans le but de comprendre comment une exposition à des atmosphères urbaines réalistes peut moduler un phénotype pulmonaire de mucoviscidose déjà installé.

Partie 2 Dans cette seconde partie, nous présenterons les résultats concernant le modèle *Cftr^{tm1EUR}* permettant de comprendre les effets d'une exposition à des atmosphères urbaines réalistes sur la mise en place d'un phénotype pulmonaire de mucoviscidose.

Partie 3 Dans cette troisième et dernière partie seront présentés les résultats préliminaires du test de salivation permettant d'évaluer, chez le modèle *Cftr^{tm1EUR}*, les effets d'une exposition à la pollution atmosphérique sur l'activité de la protéine CFTR

1 Partie 1 : Effets d'une exposition à des atmosphères urbaines réalistes sur le modèle *Scnn1b*-Tg

Les résultats présentés dans cette première partie concernent les effets d'une exposition du modèle *Scnn1b*-Tg à différentes atmosphères urbaines réalistes. Ces résultats font l'objet d'un article en cours de finalisation. Celui-ci est présenté dans les pages suivantes.

Title: Acute exposure to realistic simulated urban atmospheres exacerbate pulmonary phenotype in Cystic Fibrosis mice

Authors: Marion Blayac¹, Céline-Hivda Yegen¹, Elie Al Marj², Camilo Macias Rodriguez², Mathieu Cazaunau³, Antonin Bergé², Ralph Epaud^{1,4}, Patrice Coll², Sophie Lanone^{1*}

¹ Univ Paris Est Creteil, INSERM, IMRB, F-94010 Creteil, France

² Université de Paris Cité and Univ Paris Est Créteil, CNRS, LISA, F-75013 Paris, France

³ Univ Paris Est Creteil and Université de Paris, CNRS, LISA, F-94010 Créteil, France

⁴ Centre Hospitalier Intercommunal, Centre des Maladies Respiratoires Rares (RespiRare®)-CRCM -94010 Creteil, France

*Corresponding author: Sophie Lanone sophie.lanone@inserm.fr

Keywords: Cystic Fibrosis, Air pollution, Atmospheric simulation chamber

Abstract

Background: Cystic Fibrosis (CF) is a lethal genetic disorder caused by pathogenic mutations of the *CFTR* gene. CF is characterized by a progressive loss of respiratory function that drives the high morbidity and earlier mortality of the disease. CF patients show a high phenotypic variability even for identical mutations. This suggests the involvement of factors other than *CFTR* mutations. Air pollution is one environmental factor suspected to modulate the disease severity but its effects in the specific context of CF are not well documented.

Objective: The objective of this study was to evaluate the impacts of air pollution on the pulmonary morbidity of CF in a mice model.

Methods: Using an atmospheric simulation chamber, we propose a disruptive and innovative approach by realistically simulating complex and multiphasic urban atmospheres to consider air pollution as a whole. “Paris-like” and “Beijing-like” atmospheres were simulated. Control WT and CF *Scnn1b*-Tg mice were exposed to such atmospheres up to 18H and 72H for the determination of urban air pollution effects on established CF lung disease regarding inflammation, oxidative stress, mucus secretion, lung remodeling and lung function.

Results: Exposure to urban atmospheres stimulated mucus secretion and increased inflammatory biomarkers levels, oxidative stress as well as expression of lung remodeling actors in both WT and CF mice. The latter were more susceptible to develop such a response. Though we could not establish direct mechanistic link between biological responses and specific components, the type of immune response generated appear to effectively depend on the chemical composition of the atmospheres.

Conclusions: Based on a multi-pollutant approach, this study is the first to characterize effects of realistic urban atmospheres on CF mice. Exposure to urban atmospheres exacerbated lung phenotype in CF mice. The type of response induced depended on the chemical composition of the atmospheres. These results show that air pollution could contribute to CF physiopathology by increasing the severity of the disease.

Introduction

Cystic Fibrosis (CF) is an autosomal recessive disease caused by a mutation of the *Cystic Fibrosis conductance Transmembrane Regulator* gene (*CFTR*). This disease affects approximately 80,000 people worldwide. It is the most frequent genetic disease among Caucasian population. *CFTR* gene encodes an anion channel responsible for chloride and bicarbonate ion transport across epithelial cells and also regulates other ion channel activity. As an example, *CFTR* has been reported to inhibit the Epithelial Na⁺ Channel (ENaC) in the airways. *CFTR* mutations result in *CFTR* protein abnormality and defect in chloride and bicarbonate transport resulting in the dehydration of the intestine lining fluid and the airway surface liquid (ASL) and thickening of mucosal secretions¹. CF is characterized by a primary intestinal disease with intestinal obstruction and pancreatic insufficiency developing from birth and by a secondary and progressive pulmonary disease with impaired mucociliary clearance, persistent bacterial infections by *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*, and sustained inflammation². The progression of CF disease mainly depends on pulmonary exacerbations defined as acute worsening of respiratory symptoms associated with deterioration of quality of life^{3,4}. Respiratory symptoms include increased cough, increased sputum production and irreversible lung function decline. These pulmonary exacerbations episodes, most frequently caused by bacterial infections, eventually lead to obstructive lung disease and structural damage causing respiratory failure that is responsible for most of the morbidity and mortality of CF patients⁵⁻⁸.

To date, more than 2,000 mutations of the *CFTR* gene have been identified⁹. These mutations are classified into six classes according to their effect on *CFTR* protein synthesis and function². Classically, class I-III mutations, characterized by a total suppression of *CFTR* function, tend to be associated with a more severe phenotype and disease prognosis. On the contrary, class IV-VI mutations are associated with milder severity due to *CFTR* residual function². Interestingly, *CFTR* genotypic variability is associated with an important phenotypic diversity even between patients bearing the same mutations. This suggests the implication of other factors, either genetic or environmental. The contribution of such factors is particularly seen in the determination of CF pulmonary traits¹⁰. Indeed, if *CFTR* genotype tends to correlate well with pancreatic sufficiency, it fails to correctly predict pulmonary disease severity¹⁰⁻¹⁵. Different twin and siblings' studies have shown that genetic (other than *CFTR* itself) and environmental factors could contribute equally to CF lung disease¹⁶⁻¹⁸. Several genes such as *MUC4/MUC20*, *SLC9A3*, human leukocyte antigen complex II (HLA II), *AGTR2/SLC6A14*

and *EHF/APIP* have been identified as CF disease modifiers^{19,20}. These genes have pleiotropic levels of action and some variants have been associated with decreased lung function and earlier *P.aeruginosa* infection. On the other hand, environmental factors such as tobacco smoke²¹, air pollution²², climate/seasonal changes²³⁻²⁵ and socio-economic status²⁶ have also been identified as relevant modifying contributors to CF physiopathology. Accounting for 7 million premature deaths worldwide in 2019, air pollution currently constitutes the major environmental threat for human health and ranks at the fourth place of all death risk factors²⁷. With well documented effects on reducing lung function in healthy adults and children²⁸⁻³², increasing lung cancer incidence³³, and worsening respiratory condition of patients with pre-existing pulmonary diseases³⁴⁻³⁶, the study of air pollution is of particular interest for public health concerns. Furthermore, there is growing evidence indicating that air pollution could participate to the new onset of airway diseases such as asthma and Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD)³⁷⁻⁴¹.

Thus, with known effects on healthy people as well as on people with pre-existing condition(s), exposure to air pollution could constitute an important contributing factor for CF disease. Indeed, in a context where air pollution exceeds World Health Organization (WHO) air quality guidelines in 99% of the world⁴² and where CF patients live older, it is of particular interest to look at the impact of air pollution on the course of the disease. Yet, air pollution effects in the specific context of CF are not well documented²². Less than ten epidemiological studies have been conducted so far. They have shown that air pollution, and more specifically exposure to particulate matter (PM₁₀ and PM_{2.5}, particles with a mean diameter less than 10 µm and 2.5 µm respectively), nitrogen dioxide (NO₂) or ozone (O₃) is associated with increased number of exacerbations and decreased lung function in CF adults and children⁴³⁻⁴⁶ as well as increased risk of initial acquisition of *P.aeruginosa* and Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in CF children^{47,48}. Experimental studies trying to elucidate the molecular mechanisms that mediate such effects have shown the involvement of inflammation, oxidative stress, cellular death and decreased expression and activity of CFTR²². However, *in vivo* studies remain sparse with only 2 published studies in CF mice models^{49,50}. Moreover, these epidemiological and experimental studies have focused only on the effects of individual components of air pollution but there remains a lack of knowledge regarding the synergistic health effects of realistic atmospheric pollutants mixtures.

Therefore, the present study aimed to investigate the effects of short exposure to realistic complex urban atmospheres on the pulmonary morbidity of a CF mice model. Assessment of

biological effects was based on screening common stress responses including quantification of inflammation, oxidative stress as well as mucus secretion, lung remodeling and lung function.

Materials and methods

Ethical approval and animals

Animal experimental protocols were approved by the French Government (Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation, ethic committee in animal experiment ComEth ANSES/ENVA/UPEC APAFIS #27046-2020090317505897v5) and followed according to French laws for animal care.

The mice model used in this study is a congenic strain of *Scnn1b*-Tg mice described by Livraghi-Butrico et al.⁵¹ and adapted from the original strain proposed by Mall et al.⁵². Two C57BL/6N *Scnn1b* transgenic males (Jackson Mouse strain #030949) and four C57BL/6N non-carrier females (Jackson Mouse strain #005304) were purchased from Charles River Laboratories (Les Oncins, France). After one week of acclimatization, mice were bred into our animal facility to create our own colony. Mice were supplied with food (S9343-S403 Ssniff Rat/Mouse VRF1, Germany) and tap sterilized water *ad libitum* and housed in standard conditions, at 20-22°C with a 12 h light/dark cycle. Tail biopsy was performed on newborn mice just after weaning for genotyping. Genotyping was done following the Jackson Laboratory protocol using the KAPA Mouse Genotyping Kit (Kapa Biosystems, CliniSciences).

A total of 175 C57BL/6N *Scnn1b* transgenic (*Scnn1b*-Tg) and C57BL/6N non-carrier (WT) mice (8 to 36 weeks old) were exposed to the above-described atmospheres or control ambient air for up to 72 hours.

Simulation of complex realistic urban atmospheres

We chose to simulate atmospheres representative of 2 urban environments: Paris – as an example of a European urban city, and Beijing – as an example of a highly polluted megacity. A total of 6 different atmospheres of gradual pollutant levels were simulated. Atmospheres will next be referred as Paris-S for “Paris-like Summer-type” atmosphere, Paris-W for “Paris-like Winter-type” atmosphere, Beijing-S₁ and Beijing-S₂ for “Beijing-like Summer-type” atmospheres, first and second simulation respectively, and Beijing-W₁ and Beijing-W₂ for “Beijing-like Winter-type” atmospheres, first and second simulation respectively.

Urban atmospheres were simulated with the CESAM chamber (Chamber for Experimental Multiphase Atmospheric Simulation; <https://www.cesam.cnrs.fr/>). This chamber – a 4.2 m³ stainless steel atmospheric simulation chamber – allows to realistically simulate complex and multiphase atmospheres at the lab. Air pollution generation protocol is based on continuous injection of primary gaseous pollutants into the CESAM chamber, mainly nitrogen oxides – NO and NO₂, sulphur dioxide - SO₂ and volatile organic compounds – VOCs, as well as particulate precursors. VOCs mixture was composed of isopentane (alkane), propene (alkene), acetylene (alkyne), acetaldehyde (aldehyde) as well as benzene, toluene, and xylene (polycyclic aromatic hydrocarbons). Particulate precursors comprised ammonium sulfate seeds, soot particles and mineral dust (only for the “Beijing-like” atmospheres). These primary pollutants are then subjected to an artificial solar irradiation for photochemistry processes to occur. These processes result in secondary pollutants production (O₃, oxidized VOCs and secondary organic aerosols - SOA) that reach their steady state in about 8 to 9 hours after the ignition of the lamps. In both “Paris-like” and “Beijing-like” atmospheres, soots were generated by propane combustion using a soot generator (miniCAST Jing 6204C). These soots were generated once to twice a day, stored in a small chamber (CESAMETTE), and then continuously injected into CESAM to have stable concentrations throughout the entire simulation. To be noted, “Beijing-like” atmospheres simulations are characterized by the presence of SO₂ (produced in large quantities in China by fossil fuel combustion) and mineral dust due to sandstorms. Such sandstorms were simulated once a day by shaking mineral samples coming from the Gobi Desert and injecting the resulting particles into the chamber.

Atmospheres’ composition was monitored in real time for the whole duration of the simulation. Monitoring instruments for gaseous pollutants included NO_x (Horiba APNA370), O₃ (Horiba APOA370) and SO₂ (Horiba APSA370) analyzers as well as in-situ FTIR (Bruker Tensor), AirmoVOC (Chromatotec GC866), PTR-ToF mass spectrometer (KORE Technology LTD) and FID gas chromatograph (Perkin Elmer Clarus 680) for VOCs analysis. Particulate phase was characterized with a Scanning Mobility Particle Sizer (SMPS - TSI 3080 + TSI 3025) and an Aerosol Chemical Speciation Monitor (ACSM - Aerodyne). In addition, quartz filters allowed to collect particles for offline analysis of particulate carbon (organic and elemental) and organic content by Sunset analysis, SFE-GC-MS and UPLC-QToF-MS.

Experimental design and air pollution exposure

To document the effects of air pollution on CF, *Scnn1b* adult mice were exposed to simulated complex and realistic urban atmospheres for up to 72 hours to mimic acute exposure to an air pollution episode.

Mice were housed in isolators (I-Box, Noroit) and settled in cages with a maximum of 5 animals per cage. Each cage contained bedding, nesting and enrichment material as well as *ad libitum* access to food (S9343-S403 Ssniff Rat/Mouse VRF1, Germany) and water. Mice exposed to urban atmospheres were placed in an isolator directly connected to the CESAM chamber and receiving constant flow of 12 L/min of polluted air. Our control mice were placed in an isolator not connected to the CESAM chamber receiving only ambient filtered air from the room. In both isolators, temperature was controlled between 22 and 25°C with a relative humidity of 30 to 50% and a 12 h light/dark cycle. For the whole duration of exposure, mice status and behavior could be directly checked thanks to a transparent glass on the front of the isolators. The CESAM chamber can simulate only one atmosphere at a time. Thereby, each simulated atmosphere had its own corresponding control air.

Lung and bronchoalveolar lavages collection

Mice were sacrificed immediately at the end of exposure. Mice were deeply anesthetized with an intra-peritoneal injection of a mix of buprenorphine, zolazepam and xylazine (1 mg/kg, 160 mg/kg and 10 mg/kg respectively) and were sacrificed by section of the abdominal aorta. In order to access the lungs, a thoracotomy was performed, and trachea was cannulated with a 22 G catheter (BD Insite). The left main bronchus was clamped to perform the bronchoalveolar lavage (BAL) only on the right lung. First, lung was rinsed with an injection of 200 µL of saline (NaCl 0.9%) that was then discarded. Three subsequent washes of 500 µL each were successively injected into the lung and aspirated to collect a maximum of 1 500 µL of BAL. Live and dead cells were immediately counted on KOVA slide under the microscope with Trypan blue staining. After BAL collection, the right main bronchus was ligated and the right pulmonary lobes were collected and stored at -80°C for later gene and protein expression study. Finally, the clamp was removed from the left main bronchus and left pulmonary lobe was inflated *ex situ* with a 4% buffered formaldehyde solution (DiaPath).

Lung function

In vivo lung function monitoring was performed immediately after air pollution exposure using flexiVent™ system (SCIREQ, Montreal, Canada). Mice were anesthetized, intubated, and connected to the flexiVent™ for mechanical ventilation at a rate of 150 breaths/min and a tidal volume of 300 μ L. Once mice were ventilated, a dose of 0.5 mg/kg of curare (rocuronium 10 mg/mL, Hospira) was injected intra-peritoneally for paralysis and elimination of innate respiratory movements and reflexes of the animal. Using the flexiVent™ software, we recorded airflow and airway pressure to assess lung mechanics including measurement of inspiratory capacity, static lung compliance, tissue elastance, pressure-volume curves and negative pressure forced expirations. Measurements were repeated twice on each animal.

BAL analyses

Cytocentrifugation of 100 μ L of BAL (800 rpm, 10 minutes) was performed for May-Grünwald Giemsa (MGG) and Periodic Acid Schiff (PAS) staining for differential cellularity determination and mucus staining respectively. Briefly, for differential cellularity determination 20 photos were taken on each slide at a magnification of x20. Each cell type was then manually counted. Mucus secretion was assessed by measuring the stained PAS surface area on entire BAL slides with ImageJ. Finally, the rest of the BAL was centrifuged at 400 g for 10 minutes (4°C). Supernatants were collected and stored at -80°C to study protein expression.

Lung histology and morphometry

The left inflated pulmonary lobe was fixed in 4% formaldehyde for 24 hours and then paraffin embedded. Sections of 4 μ m thickness were cut and stained with Hematoxylin and Eosin (H&E) and PAS for histological observations and mucus staining respectively. Lung sections were cut at the hilum to facilitate mucus visualization. Morphometry was assessed based on the Mean Linear Intercept (MLI) method^{53,54}. Briefly, 20 photos were taken for each slide at a magnification of x20. Using ImageJ, calibrated test lines were overlaid on each image and MLI was measured as the mean length of each test line between two alveolar septa. To assess mucus production in the lung, PAS surface area was measured on entire tissue sections using

ImageJ as for BAL samples but was here normalized to the total perimeter of bronchus present on the slide.

Gene expression

Total mRNA was extracted from the right superior pulmonary lobe. Lung samples were homogenized using the TissueLyserII (Qiagen) and mRNAs' extraction was done using the RNeasy Mini Kit (Qiagen) according to manufacturer's instructions. Gene expression was studied by Reverse Transcription quantitative Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR). Briefly, a reverse transcription of 1 µg of RNA was performed in a total volume of 40 µL using the Superscript III enzyme (18080, Invitrogen). Resulting cDNA were diluted 1:20 and 5 ng were amplified by qPCR in SYBR Select Master Mix (44729, Applied Biosystems™) on the QuantStudio™ 6 Flex system (Applied Biosystems™) according to the following program: 50°C – 2 minutes, 95°C – 2 minutes, 40 cycles 95°C – 1 second/60°C – 30 seconds followed by melting curve analysis. Relative expression of each target gene was quantified based on the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method and was reported to a calibrator sample. Relative expression of each target gene was then normalized to *Hprt* used as a housekeeping gene. A summary of target genes and primers used for the RT-qPCR analysis is given in Table S1. Primers sequences were designed using Primer-BLAST tool (NCBI).

Lung protein extraction and protein expression

Total proteins were extracted from the right inferior pulmonary lobe. Tissue samples were homogenized using the TissueLyserII (Qiagen) in RIPA protein extraction buffer (R0278, Sigma-Aldrich) supplemented with 10% of protease inhibitor cocktail (P8340, Sigma-Aldrich) and 10% phosphatase inhibitor cocktail (P5726, Sigma-Aldrich). After extraction, proteins were dosed based on the Bradford method.

Expression of proteins isolated from lungs was studied by western blot. Briefly, 20 µg of proteins were separated by electrophoresis (1h at 60V followed with 1h30 at 120V) in denaturing conditions (SDS-PAGE) on a 12.5% acrylamide separation gel topped with a 4% concentration gel. Samples were pre-incubated in Laemmli 1X buffer (Sigma-Aldrich) at 95°C for 5 minutes to help denaturing. Proteins were then transferred on PVDF membranes and blocked for 2x30 minutes in a 0.1% TBS-Tween solution supplemented with 5% milk. Primary

antibodies were incubated overnight at 4°C followed by a 1-hour incubation of the secondary antibodies at room temperature (Table 1). Protein expression was normalized to that of β -actin, used as an internal loading control.

Luminex assay

Pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines dosage was performed with Luminex. A panel of 32 cytokines was assessed in BAL fluid : G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-10, IL-12 (p40), IL-12 (p70), IL-13, IL-15, IL-17, IP-10, KC, LIF, LIX, MCP-1, M-CSF, MIG, MIP-1 α , MIP-1 β , MIP-2, RANTES, TNF- α , VEGF et Eotaxin/CCL11 (Milliplex MAP Mouse Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel MCYTOMAG-70K, Merck Millipore). Dosage was done according to manufacturer's instructions.

ELISA

Neutrophil Elastase (NE), myeloperoxidase (MPO), mucin 5AC (MUC5AC) and mucin 5B (MUC5B) were quantified with the ELISA kits DY4517-05 (R&D Systems), DY3667 (R&D Systems), SEA756Mu-96 (Cloud-Clone Corp, CliniSciences) and SEA684Mu-96 (Cloud-Cone Corp, CliniSciences) respectively following manufacturer's instructions. NE and MPO were quantified in BAL fluid whereas both mucins MUC5AC and MUC5B were quantified in lung homogenates.

Immunofluorescence

Neutrophil Extracellular Traps (NETs) were visualized by immunofluorescence according to Radermecker et al. protocol⁵⁵ where NETs are identified by colocalization of MPO, a protein secreted by neutrophils, and citrullinated histone H3 (Cit-H3), a protein found in extracellular DNA. Briefly, lung sections were dewaxed and rehydrated with successive baths in xylene and ethanol. Antigens were retrieved with a Tris-EDTA buffer (pH = 9) for 20 minutes at 99°C. Lung sections were permeabilized using Triton 0.5% for 2 minutes and rinsed with PBS. Sections were blocked for 1 hour with BSA 2% at room temperature and incubated overnight at 4°C with the mix of primary antibodies or isotype controls (Table 2). Mix of secondary

antibodies was then added and incubated for 2 hours at room temperature. ProLong DAPI was used to stain nuclei.

Statistical analysis

All statistical analyses were performed using GraphPad Prism 9.0 (GraphPad Software, Inc.). Identification of outliers was performed with the ROUT method. Normality of the data was tested with the Shapiro-Wilk normality test. If normality was achieved, groups were compared with ANOVA followed by Student's *t*-test for double comparison. If not, groups were compared with Kruskal-Wallis followed by Mann-Whitney *U* test. A *p*-value < 0.05 was considered statistically significant.

Results

Mice were exposed to complex atmospheres representative of urban situations

A total of six atmospheres were simulated. These atmospheres are representative of pollutant levels observed during different air pollution situations in Paris and Beijing – *i.e.* mean levels of air pollution during summer and winter months⁵⁶⁻⁵⁸, levels measured during specific haze events⁵⁹⁻⁶¹. Chemical composition of the six atmospheres is depicted in Fig1. To favor clarity, only figures concerning Paris-S atmosphere exposure will be presented in the core of this manuscript. For figures referring to the other simulated atmospheres, please see supplementary material (FigS1-S7). Table 3 specifically details pollutant concentrations of the Paris-S atmosphere and the corresponding control air atmosphere.

Beijing-like atmospheres alter lung histology of Scnn1b-Tg mice

As a first assessment of pulmonary structure, HE-stained lung sections were analyzed (Fig2A). No major lung damage could be observed after exposure to a Paris-S atmosphere for 72H in both WT and *Scnn1b*-Tg mice. However, presence of alveolar macrophages could be observed only in *Scnn1b*-Tg mice, both in control air and Paris-S exposed mice, though these infiltrates were not homogenous across all individuals of the same group (Fig2B-E). The frequency of such infiltrates did not seem to be modified after air pollution exposure except for the Beijing-W₁ group for which all mice presented alveolar macrophages infiltrates (FigS1).

Exposure to summer-like atmospheres induces mucus accumulation in Scnn1b-Tg lungs

We performed PAS staining on BAL slides and lung tissue sections to determine whether air pollution had an impact on mucus production. PAS staining revealed a significantly higher mucus amount in BAL (Fig3A,3C) as well as airway mucus accumulation (Fig3B,3D) in *Scnn1b*-Tg control air mice compared to WT littermates that did not exhibit BAL PAS positive staining and showed no sign of mucus accumulation in the airways (FigS2). BAL PAS-stained area was increased in *Scnn1b*-Tg mice exposed to Paris-S (Fig3C) and Beijing-S₁ (FigS2) atmospheres as compared to their control air littermates. Though not significant, these results are supported by a trend in increasing PAS-stained area on lung sections from *Scnn1b*-Tg mice exposed to Paris-S atmosphere (Fig3D). In addition, few goblet cells could be observed in airway epithelium of WT Paris-S exposed mice. Of note, a Paris-S atmosphere exposure did not induce any modification of MUC5AC and MUC5B expression whether in WT or *Scnn1b*-Tg mice (Fig3E,3F). However, *Scnn1b*-Tg mice mucins expression could be stimulated by a Beijing-W₂ atmosphere which is in line with the potentially increased BAL PAS-stained area in those mice (FigS2).

Exposure to urban atmospheres promote inflammatory responses in WT and Scnn1b-Tg mice

In order to assess whether air pollution exposure induces inflammation, BAL were performed in all mice. BAL cellularity analysis indicated basal neutrophilic infiltration in *Scnn1b*-Tg mice compared with WT littermates (Fig4D, FigS3). This basal inflammatory phenotype in *Scnn1b*-Tg mice is confirmed by higher levels of neutrophils-attracting chemokines such as CXCL1, MIP-2 and CXCL5 combined with low levels of the anti-inflammatory cytokine IL-10 compared with WT mice (Fig4, FigS3). While the total number of BAL cells was not affected by any of our atmosphere exposure, a significant increase in lymphocytes and neutrophils proportions in *Scnn1b*-Tg mice but not in WT mice was observed following exposure to Paris-S atmosphere (Fig4). Though not statistically significant, Paris-W atmosphere and Beijing-W₁ atmospheres could have similar effects (FigS3). In addition, BAL fluid of Paris-S exposed mice, whatever their genotype, presented a greater diversity in macrophage morphology than control air mice with enlarged and activated macrophages showing cytoplasmic vacuoles (Fig4E). Such macrophages could also be observed in BAL fluid of mice exposed to the four other atmospheres (FigS3). These observations towards the induction of an inflammatory response

after air pollution exposure are also supported by an increased secretion of pro-inflammatory cytokines in BAL fluid. Indeed, IL-9 levels were increased in both WT and *Scnn1b*-Tg mice after exposure to Paris-S atmosphere while IL-2 and IFN γ levels were increased only in WT mice and IL-1a and MIP-2 levels were increased only in *Scnn1b*-Tg mice (Fig5). All quantified cytokines tended to increase in both WT and *Scnn1b*-Tg mice in response to Paris-S and Beijing-W₁ exposure (FigS3). Surprisingly, all gene expression tended to be downregulated in both WT and *Scnn1b*-Tg mice after exposure to Paris-S atmosphere. Inflammatory cytokines such as *Tnf* and transcription factor *Rela* were significantly downregulated in WT mice while *Il1b* and *Tgfb1* expression significantly decreased in *Scnn1b*-Tg mice (Fig6). Cytokine protein secretion also tended to increase after an exposure to Paris-W atmosphere specifically in WT mice (FigS3). Beijing-S₁ and Beijing-S₂ atmospheres tended to stimulate pro-inflammatory secretions in *Scnn1b*-Tg mice while it had moderate effects in WT individuals. Interestingly, a decrease in almost all cytokines was observed in WT mice after exposure to Beijing-S₂ atmosphere as well as in response to Beijing-W₂ in both WT and *Scnn1b*-Tg mice. As an exception in the latter, VEGF, IL-5, and IL-6 secretions were increased (FigS3). In addition, Beijing-W₂ atmosphere upregulated *Ccl2*, *Cxcl1* and *Cxcl2* expression in *Scnn1b*-Tg mice though *Rela* expression was decreased (FigS4). Finally, anti-inflammatory secretion of IL-10 tended to be increased in WT mice except for Beijing-S₂ and Beijing-W₂ atmospheres (FigS3). If a secretion pattern could not be identified for IL-10 after air pollution exposure in *Scnn1b*-Tg mice, Leukocyte Inhibitor Factor (LIF), a protein with anti-inflammatory properties, tended to increase following exposure to all atmospheres except for the Beijing-W₂ one for which it was decreased (FigS3).

Paris-like summer-type atmosphere induces oxidative stress in WT and Scnn1b-Tg mice

To assess the effect of air pollution exposure on oxidative stress, myeloperoxidase (MPO) and glutathione peroxidase 1 (GPX1) expression were quantified. MPO expression was found to be significantly higher in *Scnn1b*-Tg control air mice compared with WT control air mice (Fig7A). Such levels were further increased following exposure to Paris-S atmosphere. This increase in MPO levels was also observed in Paris-S exposed WT mice compared with their control air littermates. Though not significant, similar increase in MPO levels could be observed after exposure to Beijing-W₁ atmosphere but only in *Scnn1b*-Tg mice (FigS5). No modification of GPX1 expression was found after exposure to whatever atmosphere except for Beijing-S₁ (FigS5). As for antioxidant gene expression, *Cat* and *Gstm1* transcript levels were significantly

reduced in WT mice following Paris-S atmosphere exposure in line with *Nfe2l2* transcription factor downregulation (Fig6). Gene expression of antioxidant enzymes followed the same pattern in *Scnn1b*-Tg mice exposed to Paris-S atmosphere (Fig6). By contrast, Beijing-S₁ atmosphere specifically upregulated *Nqo1* in both WT and *Scnn1b*-Tg mice. In *Scnn1b*-Tg mice exposed to Beijing-W₂ atmosphere, a downregulation of *Gpx1* was combined with an upregulation of *Sod2* and *Nfe2l2* (FigS4).

Paris-like atmospheres may predispose to lung remodeling

Morphometry analysis with the measurement of mean linear intercept (MLI) was used to assess the effects of air pollution on lung remodeling. Distal airspace enlargement could be observed in *Scnn1b*-Tg mice compared with WT individuals but no variation of MLI was observed between control air groups and exposed groups whatever the atmosphere and whatever the genotype (Fig8A-B, FigS6). However, Neutrophil Elastase (NE) levels were found to be increased in *Scnn1b*-Tg mice after exposure to Paris-S atmosphere (Fig8C). Beijing-W₁ exposure tend to have the same stimulating effects on NE secretion. The protein expression of matrix metalloproteinases MMP9 and MMP12 were not significantly modified after exposure of mice to Paris-S atmosphere while MMP9 was significantly increased in *Scnn1b*-Tg mice following Paris-W exposure (Fig8D-E, FigS6). The gene expression of corresponding metalloproteinases was either upregulated or downregulated depending on the atmosphere. *Mmp9* expression was decreased in *Scnn1b*-Tg Paris-S exposed group and followed the same trend in WT mice though the variation was not significant (Fig6). *Mmp12* expression was also decreased in *Scnn1b*-Tg Beijing-S₁ exposed mice (FigS4). On the contrary, *Mmp9* and *Mmp12* transcript levels tended to be increased in *Scnn1b*-Tg mice following Beijing-W₂ exposure (FigS4). Genes coding for antiproteases were also affected. *Slpi* expression was decreased in *Scnn1b*-Tg mice exposed to Paris-S atmosphere (Fig6) while *Timp1* expression tended to increase only in *Scnn1b*-Tg Beijing-W₂ exposed group and *Timp2* and *Timp3* were upregulated in WT mice (FigS4).

Beijing-like winter-type atmosphere could alter lung function in Scnn1b-Tg mice

Lung mechanics were assessed with the flexiVentTM apparatus. *Scnn1b*-Tg control air lungs were characterized by an increase in lung volume and static lung compliance, a decrease in tissue elastance and upwards shift of pressure-volume curves compared with control air WT

mice (Fig9A-D, FigS7). Taken together, these data indicate an emphysematous status of *Scnn1b*-Tg mice in line with the previously described distal airspace enlargement (Fig8). Pollution exposure to either Paris-S, Beijing-S₂ or Beijing-W₂ did not alter lung mechanics in WT and *Scnn1b*-Tg mice (Fig9, FigS7). In addition, negative pressure forced expirations (NPFE) were performed in mice exposed to Beijing-W₂ atmosphere. These NPFE manipulations are used as proxy to assess forced expiratory volumes (FEV) and forced vital capacity (FVC) in mice. *Scnn1b*-Tg mice are characterized by a decrease FEV/FVC ratio indicative of obstructive disease (FigS7F). Though the effects were not significant, exposure to Beijing-W₂ atmosphere could further alter lung function in *Scnn1b*-Tg mice based on the decrease in FEV/FVC ratio and upwards shift of pressure-volume curves compared to control air *Scnn1b*-Tg mice (FigS7). Interestingly, FEV/FVC ratio seemed to be increase in WT Beijing-W exposed mice with no apparent modification of pressure-volume curves.

Exposure to Beijing-like winter-type atmosphere induce time-dependent effects in WT and Scnn1b-Tg mice

To further investigate the kinetic onset of air pollution effects, a subset of mice was sacrificed after 18H of exposure to air pollution in addition to those sacrificed after 72H of exposure. This 18-hour timepoint was performed only for the Beijing-W₁ atmosphere exposure.

Lung histology reveal no major lung damage and alteration in WT and *Scnn1b*-Tg mice in response to an 18-hour exposure to Beijing-W₁ atmosphere compared with corresponding control air (data not shown). 18-hour exposed lungs did not morphologically differ from control lungs as well as from 72-hour exposed lungs (Fig10).

Mucus secretion, assessed with PAS staining, did not significantly differ between the different time-points (Fig11A-D). However, WT mice exposed either 18H or 72H to a Beijing-W₁ atmosphere presented few goblet cells (Fig11B). In addition, MUC5AC and MUC5B expression tended to be higher in the 18-hour exposed groups compared with control air groups in both WT and *Scnn1b*-Tg mice (Fig11E). A 72-hour exposure tended to further stimulate mucins expression in mice of both genotypes.

No significant change in BAL total cell number could be observed after exposure to Beijing-W₁ atmosphere at both timepoints and whatever the mice genotype (Fig12A). However, non-significant increase in neutrophil counts could be noted in *Scnn1b*-Tg mice exposed to Beijing-W₁ atmosphere during 72H (Fig12D). This neutrophilic inflammation was not observed

at the 18-hour timepoint. This result is supported by apparent increase of NE secretion specifically in the 72-hour exposed *Scnn1b*-Tg mice (Fig12F). Among control air groups, the presence of Neutrophil Extracellular Traps (NETs) was highlighted only in *Scnn1b*-Tg mice in alveolar region as well as respiratory airways. In bronchi, NETs were entangled in mucus plaques (Fig12E). If NETs frequency did not appear to be changed after exposure to Beijing-W₁ atmosphere in *Scnn1b*-Tg mice, few NETs were observed in WT mice after 18H of exposure (Fig12E). In addition, pro-inflammatory as well as anti-inflammatory cytokine secretion clearly tended to increase after 72H of exposure, but not 18H of exposure, in both WT and *Scnn1b*-Tg individuals (Fig12F). Gene expression study showed an upregulation of *Tnf* in WT mice following a 72-hour exposure to Beijing-W₁ atmosphere as well as non-significant stimulation of pro-inflammatory genes such as *Il6*, *Ccl2* and *Cxcl15* in *Scnn1b*-Tg mice following the same exposure (Fig13). MMP9 expression globally tended to be increased in all exposed mice from 18H until 72H of exposure. On the contrary, MMP12 expression appeared to be altered only after 72H of exposure with opposite variations in WT and *Scnn1b*-Tg mice (Fig12F). *Mmp9* and *Mmp12* transcripts showed increased levels from 72H of exposure to Beijing-W₁ in WT mice and *Scnn1b*-Tg mice respectively (Fig13). Antioxidant enzyme GPX1 was significantly increase after 18H of exposure to Beijing-W₁ atmosphere only in WT mice (Fig12F). Concomitantly, genes involved in antioxidant defenses such as *Cat* and *Sod1* showed earlier variation with upregulation from 18H of exposure in WT and *Scnn1b*-Tg mice (Fig13). In *Scnn1b*-Tg mice, GPX1 expression tended to increase only after 72H of exposure along with a trend in increased MPO secretion.

Urban atmospheres do not equally impact CF hallmarks and affect WT and Scnn1b-Tg mice in a time dependent manner

For an integrated analysis of all data, radar plots were generated (Fig14). Radar plot construction strategy is described in supplementary Tables S1 and S2. These plots allow to give a synthetic view of the biological effects induced following exposure to the different urban atmospheres for direct comparison of such effects. Mucus secretion was gradually increased following exposure to Beijing-W₁, Beijing-W₂, Paris-W and Paris-S atmosphere in WT mice (Fig14A). A common pattern in oxidative stress stimulation of all studied atmospheres except Beijing-S₁ atmosphere could be observed in WT mice. Such oxidative stress stimulation was gradual with Paris-S atmosphere having the least effects, Beijing-W₂ and Paris-W atmospheres having intermediate effects and Beijing-W₁ atmosphere having the most important effects. All

studied atmospheres also increased pro-inflammatory and anti-inflammatory levels with Beijing-W₁ atmosphere having the greatest effects (Fig14A). On the other hand, in *Scnn1b*-Tg mice, exposure to a Paris-S type atmosphere had the greatest effects on mucus secretion while exposure to a Beijing-W₁ type atmosphere had the greatest effects on pro-inflammatory and anti-inflammatory markers secretion (Fig14B). In a lesser extent, exposure to Beijing-S₁ atmosphere also had pro-inflammatory effects, anti-inflammatory secretions induction and mucus production stimulation. These effects were specific of *Scnn1b*-Tg mice as Beijing-S₁ did not affect WT mice. A particular effect of Paris-W atmosphere towards stimulation of lung destruction actors could be noted in *Scnn1b*-Tg mice. Beijing-W₂ atmosphere exposure, as well as Paris-W atmosphere exposure, decreased pro-inflammatory and mainly anti-inflammatory markers levels in *Scnn1b*-Tg mice. As in WT mice, we could observe a common pattern of the studied atmospheres towards oxidative stress induction with the most important effects attributed to Beijing-S₁ exposure followed by Paris-W atmosphere exposure and Beijing-W₁ atmosphere exposure. In response to a shorter exposure of 18H to Beijing-W₁ atmosphere, WT and *Scnn1b*-Tg mice seemed to develop an antioxidant protective response while mucus secretion and lung destruction markers were stimulated (Fig14C-D). These effects were more important in WT mice compared to *Scnn1b*-Tg mice. Responses to a Beijing-W₁ atmosphere 72-hour exposure were largely pro-inflammatory and pro-oxidative in both WT and *Scnn1b*-Tg mice compared to effects induced in response to an 18-hour exposure. Effects were bigger in WT mice except for anti-inflammatory secretions.

Discussion

To our knowledge, this study was the first to assess effects of realistic urban atmospheres on pulmonary phenotype in the context of CF. The aim of our study was to investigate the effects of realistic urban atmospheres in a CF *Scnn1b*-Tg murine model. In a comprehensive approach to consider air pollution as a complex and multiphasic mixture, we used an atmospheric simulation chamber. We simulated six different atmospheres representative of different urban environments found in Paris and Beijing during summer and winter^{56-59,61,62}. These atmospheres were constituted of a mixture of realistic levels of PM, NO₂, SO₂, CO and VOCs. Overall, we demonstrated worsening effects of urban atmospheres on CF phenotype in *Scnn1b*-Tg lungs and increased susceptibility of those mice to air pollution compared to WT mice.

Exposure to summer-like atmospheres, either Paris or Beijing, led to mucus accumulation in the lungs of *Scnn1b*-Tg mice while it did not affect WT mice (FigS2). This increased amount of mucus was observed without significant alteration of MUC5AC and MUC5B expression. This suggests a decreased mucociliary clearance (MCC) rather than an increase in mucus secretion following exposure to Paris-S and Beijing-S₁ atmospheres. These results are in line with previously described decreased mucociliary transport in healthy smokers⁶³. The decreased MCC in response to cigarette smoke could be related to decreased ciliary beat frequency (CBF), itself related to shortened airway cilia and loss of cilia⁶⁴⁻⁶⁷ as a possible consequence of altered expression of genes involved in ciliary function and ciliogenesis⁶⁸. Cigarette smoke-induced decreased CBF could possibly be CFTR-dependent⁶⁹. In addition, decreased MCC could be further deepened by increase of mucus viscosity as it was found in human and ferrets airways after cigarette smoke exposure⁷⁰. Though these studies were limited to the effects of cigarette smoke and predominantly showed after a long-term exposure, our results suggest that similar perturbations of the mucociliary system could occur in response to air pollution following an exposure as short as 3 days. As supporting evidence, MCC was found to be decreased in frog palate after exposure to PM_{2.5} and altered CBF and cilia structure were observed after only 3 repeated cigarette smoke exposures in human tracheobronchial epithelial cells and after 5 days of cigarette smoke exposure in the mouse larynx respectively^{67,68,71}. MCC is one of the primary host defense mechanisms. Its role is to trap pathogens and favor their elimination. In the frame of CF, this decreased MCC is deleterious especially since *Scnn1b*-Tg mice are prone to spontaneous infections⁷². This is probably why we observed NETs that constitute another defense mechanism against pathogens⁷³ – entangled in mucus plaques in *Scnn1b*-Tg mice airways (Fig12). NETs released was found to be increased after air pollution exposure *in vitro* and *in vivo*^{74,75}. However in our study, we did not quantify presence of NETs and neither assessed bacterial load in *Scnn1b*-Tg lungs. In addition, NETs visualization was not performed on the lungs of *Scnn1b*-Tg mice exposed to Paris-S and Beijing-S₁ atmospheres for which mucus accumulation was observed. Together, this limits to establish possible linking between air pollution exposure, mucus accumulation and bacterial infection. In a context where MCC is decreased in CF mice and combined with decreased alveolar macrophagic clearance^{49,50,76}, we could assume a possible increased susceptibility of *Scnn1b*-Tg air polluted exposed mice to develop infection as suggested by Psoter et al. in CF patients^{47,48}.

Urban atmospheres have the capacity to trigger inflammation as shown by the increased levels of IL-1a and IL-6 (FigS3), two pro-inflammatory cytokines secreted in early phase of inflammation. In Paris-S and Beijing-W₁ exposed mice, whatever the genotype considered, we

observed increased BAL levels of T cell-characteristic proteins such as IFN γ and IL-2 suggesting a typical T helper cell type 1 response (Th₁)⁷⁷ (FigS3). This Th₁ response activates pro-inflammatory macrophages (M1 phenotype) which are important producers of CXCL10 and IL-12 sustaining Th₁ cells differentiation, recruitment and activation⁷⁸⁻⁸⁰. Lymphocytes chemotaxis is also supported by increased levels of CCL5⁷⁹. This Th₁ response has previously been reported in response to chronic particulate air pollution⁸². Interestingly, a Paris-W exposure induced the same immune response in WT but not *Scnn1b*-Tg mice. In addition to this lymphocyte-based response, Paris-S and Beijing-W₁ *Scnn1b*-Tg exposed mice exhibited an inflammatory response polarized towards the recruitment and activation of neutrophils. Indeed, BAL of these mice were characterized by increased levels of CXCL1, CXCL5, MIP-1a, MIP-2 and G-CSF that are common neutrophil chemoattractant and activating molecules^{83,84} (FigS3). Of note, MIP-1a also participate to Th₁ differentiation and could further stimulate development of the Th₁ response⁸⁵. Additionally, BAL MPO and NE levels were also increased. Such increase can be related to the previously mentioned BAL neutrophils influx (FigS3). This specific neutrophil-based response in *Scnn1b*-Tg mice compared to WT mice could be the result of already “on-site” activated neutrophils. Indeed, in addition to neutrophil chemoattractant secretions from macrophages, neutrophils are able to produce chemokines that are primarily chemotactic for themselves as well as for lymphocytes and monocytes⁸⁶. Thus, neutrophils could amplify their own recruitment but also participate to orchestrate subsequent arrival of other leukocytes at the site of inflammation such as type 1 lymphocytes. A common share to Paris-S and Beijing-W₁ atmospheres is their relatively high concentration in organic carbon (OC), both primary and secondary, compared to the other atmospheres (Fig1). When expressed in percentage, Paris-S atmosphere presents the highest OC contribution to PM chemical composition with 10% – 6% and 4% of primary and secondary OC respectively, compared to only 2 to 4% for the other atmospheres. Yet, toxicological and epidemiological studies suggest that all PM species may not be equally toxic^{87,88}. Of note, higher abundance of primary carbon components could set the frame for chemical reactions to occur thus potentiating formation of secondary organic aerosols (SOA) with potentially more toxic biological effects. Although there is still uncertainty about which species are the most detrimental, organic carbon has been associated with increased mortality and deleterious effects such as increased levels of pro-inflammatory biomarkers and decreased lung function in healthy adults⁸⁹⁻⁹³. On the other hand, a feature of Beijing-W₂ atmosphere is the high abundance of PM nitrates (38%) and VOC aromatic compounds (37%) that have otherwise also been linked to airway inflammation and impaired lung function though data are less obvious⁹⁴⁻⁹⁶. Interestingly, exposure to Beijing-W₂

atmosphere triggered IL-5 secretion in *Scnn1b*-Tg mice only. This could be a clue for the establishment of a T helper cell type 2 anti-inflammatory response (Th₂) consistent with the low levels of IFN γ and IL-12 that would favor the development of such response⁸⁰. However, a lack of BAL IL-4 and IL-13 (levels under limit of detection for most samples), two signature cytokines of a Th₂ response, prevent to strongly affirm that such a response is induced. Nevertheless, activation of type 2 lymphocytes after exposure to PM, NO₂ and O₃ has been previously described^{97,98}.

Many studies have shown non-threshold dose-dependent effects of air pollution with increased biological effects as the dose increases^{124,125}. Overall, when we tried to correlate the biological responses to pollutant mass concentrations, we could not find any clear association regarding the intensity of the effects. Interestingly, the highest concentrations of pollutant – found for Beijing-W₂ atmosphere – were not associated with the greatest effects whatever the analyzed parameters. Similar results were also reported in rats exposed to ambient particles¹²⁶⁻¹³². In addition, mice exposed to atmospheres that exhibited close pollutant concentrations – *i.e.* Beijing-W₁ and Beijing-W₂, elicited disparate responses. Happo and colleagues also found differential inflammatory responses in mice exposed to identical PM concentrations but collected from different cities and during different seasons^{124,133,134}. Together, these data suggest that particle chemical composition has an important role to play in orchestrating interactions between constituents and thus modulate biological effects. Moreover, Paris-S atmosphere statistically had the greatest effects while it is the less polluted atmosphere. First, influence of group sizes could be an explanation for the observed difference in statistical significance. Second, in addition to the importance of considering PM chemical composition, non-linear dose-response effects appear to exist as regard to pollutant concentrations for both short and long-term exposures¹³⁵⁻¹³⁸. Still, these dose-response curves are mainly generated for individual pollutant, thus non considering potential synergism and reactivity between them.

All 72-hour exposures to urban atmospheres induced oxidative stress by increasing MPO levels that was sometimes combined with decreased antioxidant protection in WT mice in response to Paris-W, Beijing-W₁ and Beijing-W₂ atmospheres. The effects of O₃, PM and NO₂ on causing this pro-oxidant/antioxidant imbalance are well known⁹⁹⁻¹⁰¹. By contrast, shorter 18-hour exposures stimulated protective antioxidant defenses. This could be related to increased catalase gene expression concomitant with increased expression of GPX1 protein effector. If studies consensually describe the induction of Nrf2 pathway for inducing upregulation of enzymes related to antioxidant defense^{102,103}, our results concerning 72-hour exposures are

more controversial. The accuracy of oxidative stress assessment in our study will be discussed later.

While we have no indication of morphological structural changes, probably because a 72-hour exposure is too short to see such changes occurring¹⁰⁴, exposure to urban atmospheres could set a favorable environment for subsequent lung remodeling. First, we observed increased BAL levels of NE following exposure to Paris-S and Beijing-W₁ atmospheres as well as increased lung expression of MMP9 after Paris-W exposure in *Scnn1b*-Tg mice only. Induction of pulmonary MMPs (MMP2, MMP9 and MMP12) by pollutants have been previously described mainly in the context of an inflammatory response¹⁰⁵. In addition, activation of these proteinases is thought to likely cause emphysema¹⁰⁶. In the specific context of CF, NE seems to have an important role in mediating tissue destruction due to its elastase activity^{107,108}. Secondly, although VEGF expression and angiogenesis are known to be stimulated upon exposure to PM_{2.5} and diesel exhaust particles^{109–112}, we noticed that CO-enriched atmospheres, and particularly Paris-W atmosphere (Fig1), were associated with increased VEGF levels in both WT and *Scnn1b*-Tg mice (FigS3). VEGF is basically involved in angiogenesis¹¹³. Angiogenesis, and more extensively remodeling of airway vasculature, can be induced by inflammation and hypoxia^{114–119}. Exogenous CO exerts its effects by decreasing the availability of hemoglobin-bound oxygen. On the other hand, CO is an important mediator of VEGF signaling in hypoxic conditions¹²⁰. For these reasons, we could hypothesize that VEGF stimulated expression in an enriched CO environment could be partly linked to a CO-induced hypoxic state. Similar effects on VEGF levels were observed following exposure to less CO concentrated atmospheres – *i.e.* Beijing-S₁, Beijing-S₂ and Beijing-W₂ – but only in *Scnn1b*-Tg mice, suggesting these mice would be more susceptible to CO than WT mice. Together, these data could prelude future airway remodeling in a context of chronic airway inflammation related to chronic exposure to air pollution^{114,121–123}.

The current study is subjected to some limitations. First, the mice model used in the study is characterized by an airway-targeted overexpression of the ENaC β subunit responsible for Na⁺ hyperabsorption resulting in airway surface dehydration, mucus obstruction and inflammation^{51,52}. This model presently constitutes the most complete murine model reproducing human CF lung phenotype. However, *Cftr* gene is not mutated in these mice. This limits possible secondary effects resulting from *Cftr* mutations. As an illustration, double mutant $\Delta F508$ /*Scnn1b*-Tg mice showed more severe lung disease than mice with *Scnn1b* transgene alone¹³⁹. In addition, it has been shown that environmental exposures to either

cigarette smoke, ozone, diesel particulate matter and carbon nanoparticles can reduce CFTR gene and protein expression as well as its activity in human epithelial cells^{140–144}. Aforementioned cigarette smoke effects on decreased CBF could also be CFTR-dependent⁶⁹. Thus, presence of a *Cftr* mutation could influence responses in *Scnn1b*-Tg mice and could be interesting to evaluate in our experimental exposure model.

Regarding the analysis strategy adopted, as much as we wanted to make a comprehensive screening of the effects, some points must be taken into consideration. Radar diagrams depict differential impacts of the urban atmospheres on the different biological endpoints tested (Fig14). These endpoints were chosen based on their common relevance to CF pathophysiology and air pollution known effects. It is important to note that biological endpoints scores were not calculated from the same number of markers and did not include gene expression assessment (Tables S1 and S2). For example, anti-inflammatory response was assessed with only one or two anti-inflammatory proteins (*i.e.* IL-10 and LIF) while pro-inflammatory markers comprised more than fifteen cytokines and included BAL cellular counts. For this reason, assessment of the pro-inflammatory response is more robust than the assessment of any other endpoint. Likewise, MPO/GPX1 ratio was used as an initial proxy to assess oxidative status. Yet, oxidative stress cannot be restricted only to these two markers and quantification of other pro-oxidant and antioxidant proteins as well as quantification of direct oxidative damages such as oxidized DNA, lipid peroxides and carbonylated proteins should be considered. Eventually, we should keep in mind that some markers had more weight into determination of final the score due to the existence of outliers that had increasing influence as the group size was smaller as it was the case for G-CSF in WT mice exposed to Beijing-W₁ atmosphere. Despite these limitations, our analysis strategy allowed us to compute all results in a synthetic way allowing a direct comparison of effects induced by the different urban atmospheres.

Finally, as realistic as our simulations can be, they currently do not encompass polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) – that come from biomass burning, halogenated compounds as well as PM heavy metals. PM are also only representative of the submicron size (PM₁). In addition, while ozone is formed by secondary photochemical processes, it cannot accumulate in our system because of its high reactivity – *i.e.* ozone is consumed immediately after its production – while population are exposed to an average of 100 µg/m³ in Beijing in peak season. Yet, these pollutants are known to have carcinogenic effects^{145–149} and a potent role to trigger inflammatory responses and reactive oxygen species (ROS) production^{150–152}.

Conclusions

In summary, our results show that these realistic urban atmospheres differentially affect pulmonary hallmarks of CF but globally all led to exacerbating effects with particular susceptibility of CF mice compared to WT mice. This study shows how important it is to consider air pollution mixture as a whole because of the dynamic character of chemical reactions leading to the production of new pollutants that add to the complexity of the atmospheric mixture and the subsequent effects induced. Classical approach considering individual pollutants would hide this synergism and possibly lead to mis-estimation of the effects. Further investigations are needed to identify what specific components could be involved into mediating such observed effects following exposure to realistic urban atmospheres.

Acknowledgments

Authors wish to acknowledge Mathieu Surenaud and the Dosage de biomarqueurs platform (PL13 IMRB) for realizing the Luminex assays. Authors also want to thank the DIM Qi² with the support of the Ile-de-france Region for funding Marion Blayac PhD program as well as EU project #874753 REMEDIA which currently supports the authors' activity on the effects of exposome on the course of Cystic Fibrosis.

Declaration of interest

Authors have no conflict of interest to declare.

Tables and Figures

Table 1 List of primary and secondary antibodies used for western blot experiments.

Protein	Primary antibody	Secondary antibody
GPX1 (22 kDa)	ab22604 (Abcam) 1/500	NA934 (Amersham ECL) HRP-linked 1/5 000
MMP12 (40 kDa)	MA532011 (ThermoFisher) 1/1 000	7074 (Cell Signaling) HRP-linked 1/5 000
MMP9 (92 kDa)	ab228402 (Abcam) 1/1 000	NA934 (Amersham ECL) HRP-linked 1/5 000
β -actine (40 kDa)	A5316 (Sigma-Aldrich) 1/10 000	1706520 (Biorad) AP-linked 1/10 000

Table 2 List of primary and secondary antibodies used for immunofluorescence experiment.

Marker	Primary antibody	Secondary antibody
MPO	Goat AF3667 (R&D Systems) 5 μ g/mL	Anti-goat AlexaFluor 488 A-11055 (Invitrogen) 1/200
Isotype control	Goat IgG AB-108-C (R&D Systems) 1/200	
Cit-H3	Rabbit ab5103 (Abcam) 10 μ g/mL	Anti-rabbit AlexaFluor 594 A-11012 (Invitrogen) 1/200
Isotype control	Rabbit IgG 02-6102 (Invitrogen) 1/500	

Table 3 Chemical composition of the “Paris-like” Summer-type atmosphere.

Pollutants	Mean concentration \pm Standard Deviation	
	Exposed isolator	Control isolator
<i>Gaseous pollutants</i>		
NO ₂ ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	18.77 \pm 3.14	9.4 \pm 0.51
NO ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	2.53 \pm 1.34	2.62 \pm 1.9
SO ₂ ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	-	-
O ₃ ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	25.22 \pm 7.46	9.47 \pm 1.29
CO ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	180.93 \pm 30.49	-
Acetaldehyde (ppb)	4 \pm 1.4	-
Acetone (ppb)	0.31 \pm 0.18	-
Methanol (ppb)	1.05 \pm 0.6	-
Methacrolein (ppb)	0.09 \pm 0.04	-
<i>Particulate pollutants</i>		
PM - Mass concentration ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	31.26 \pm 8.11	0.26 \pm 1.19
PM - Number (part/cm ³)	9 070.58 \pm 11 370.97	-
<i>Aerosol speciation</i>		
Sulfates ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	25.66 \pm 29.78	-
Ammonium ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	10.11 \pm 12.77	-
Nitrates ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	1.25 \pm 1.46	-
Organic carbon ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	2.96 \pm 2.39	-
Black carbon ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	1.1 \pm 0.46	-
Benzoic acid	Identified SOA	-
3-nitrotoluene	Identified SOA	-
Succinic acid	Identified SOA	-
Oxalic acid	Identified SOA	-

“-” undetectable as referred to under limit of detection

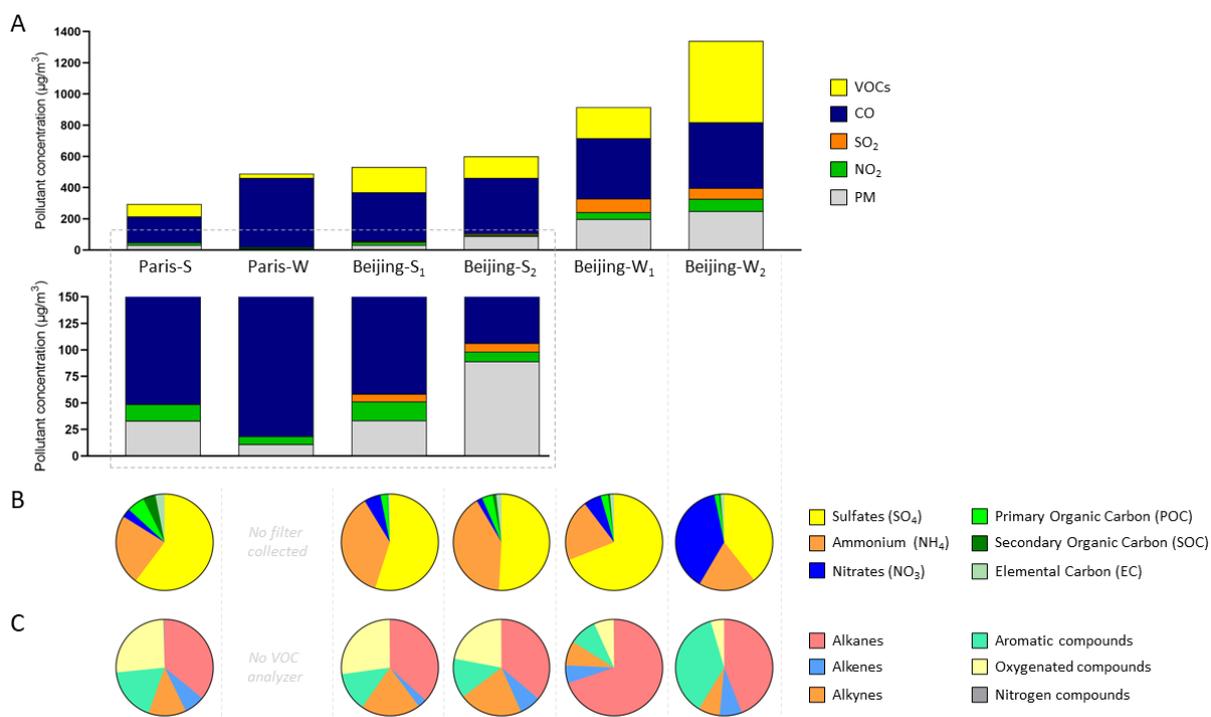


Fig1 Total concentrations of gaseous and particulate pollutants (**A**) and chemical composition of PM (**B**) and VOCs (**C**) in the six simulated atmospheres. For the chemical composition of PM and VOCs, each slice represents the mass percentage of contribution of the corresponding chemical compound or chemical family to the total mass expressed in $\mu\text{g}/\text{m}^3$ of PM and VOCs respectively.

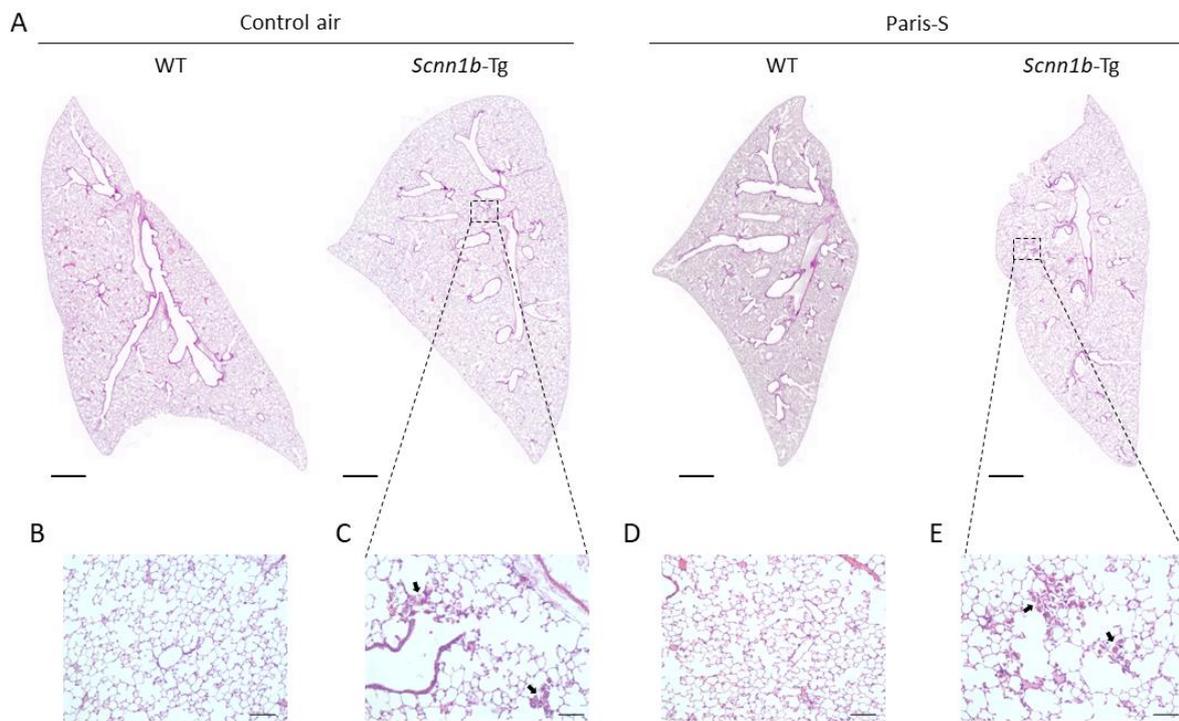


Fig.2 Lung histology in WT and *Scnn1b*-Tg mice exposed to Paris-S atmosphere. **(A)** Lung tissue sections of WT and *Scnn1b*-Tg Paris-S exposed mice and air littermate controls. Scale bar = 1 000 μ m. **(B-E)** Higher magnification of control air WT **(B)**, control air *Scnn1b*-Tg **(C)**, Paris-S exposed WT **(D)** and Paris-S exposed *Scnn1b*-Tg mice **(E)** showing macrophages infiltrates (black arrows) only in *Scnn1b*-Tg mice. Scale bar = 100 μ m. Representative for n = 4-6 mice per group.

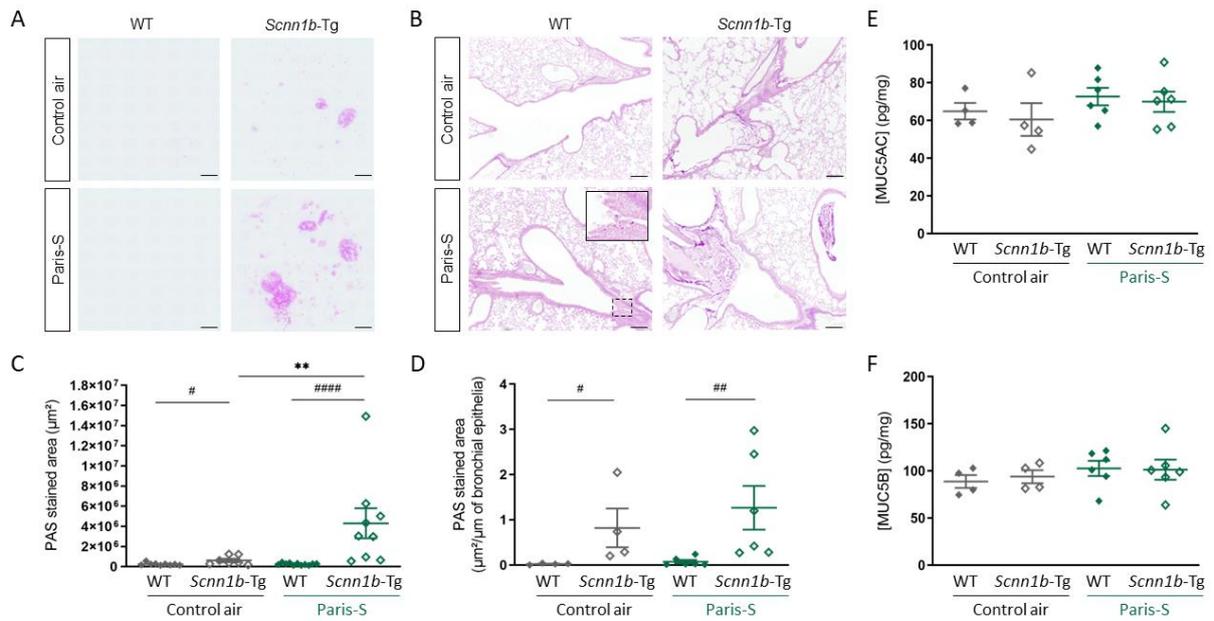


Fig.3 Mucus accumulation in lungs of *Scnn1b*-Tg mice exposed to Paris-S atmosphere. **(A)** Mucus PAS staining on BAL slides. Scale bar = 1 000 μm . **(B)** Mucus PAS staining on lung tissue sections. Scale bar = 200 μm . **(C)** PAS staining quantification on BAL samples. PAS staining is expressed as positive stained surface area in μm^2 . # p < 0.05 and ##### p < 0.0001 compared with WT mice; ** p < 0.01 compared with control air mice. **(D)** PAS staining quantification on lung tissue sections. PAS staining is expressed as positive stained surface area in μm^2 normalized to total perimeter of airway epithelium. # p < 0.05 and ## p < 0.01 compared with WT mice. **(E-F)** MUC5AC **(E)** and MUC5B **(F)** mucins expression in lung homogenates. Concentrations are normalized to total lung protein quantity (pg/mg of protein).

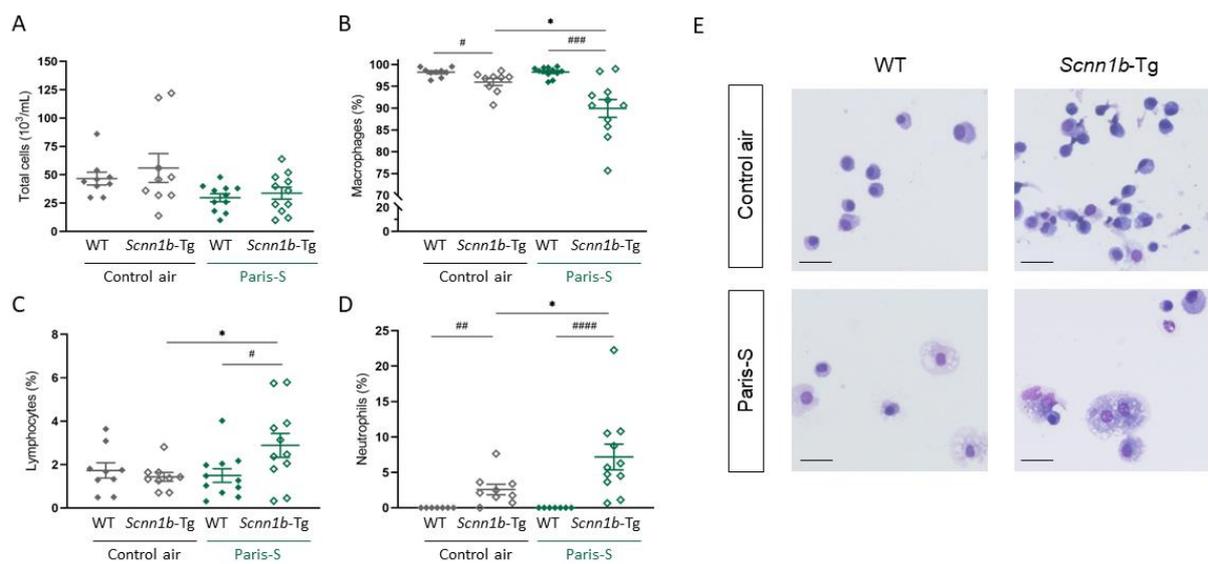


Fig 4 Airway inflammation following exposure to Paris-S atmosphere. **(A-D)** Total cell count **(A)** and macrophages **(B)**, lymphocytes **(C)**, and neutrophils **(D)** proportions in BAL from Paris-S exposed and control air mice. # $p < 0.05$, ### $p < 0.001$ and ##### $p < 0.0001$ compared with WT mice; * $p < 0.05$ compared with control air mice. $n = 9-11$ mice per group. **(E)** Macrophage morphology in BAL fluid of WT and *Scnn1b*-Tg mice exposed to a Paris-S atmosphere and their control littermates. Scale bar = 25 μ m.

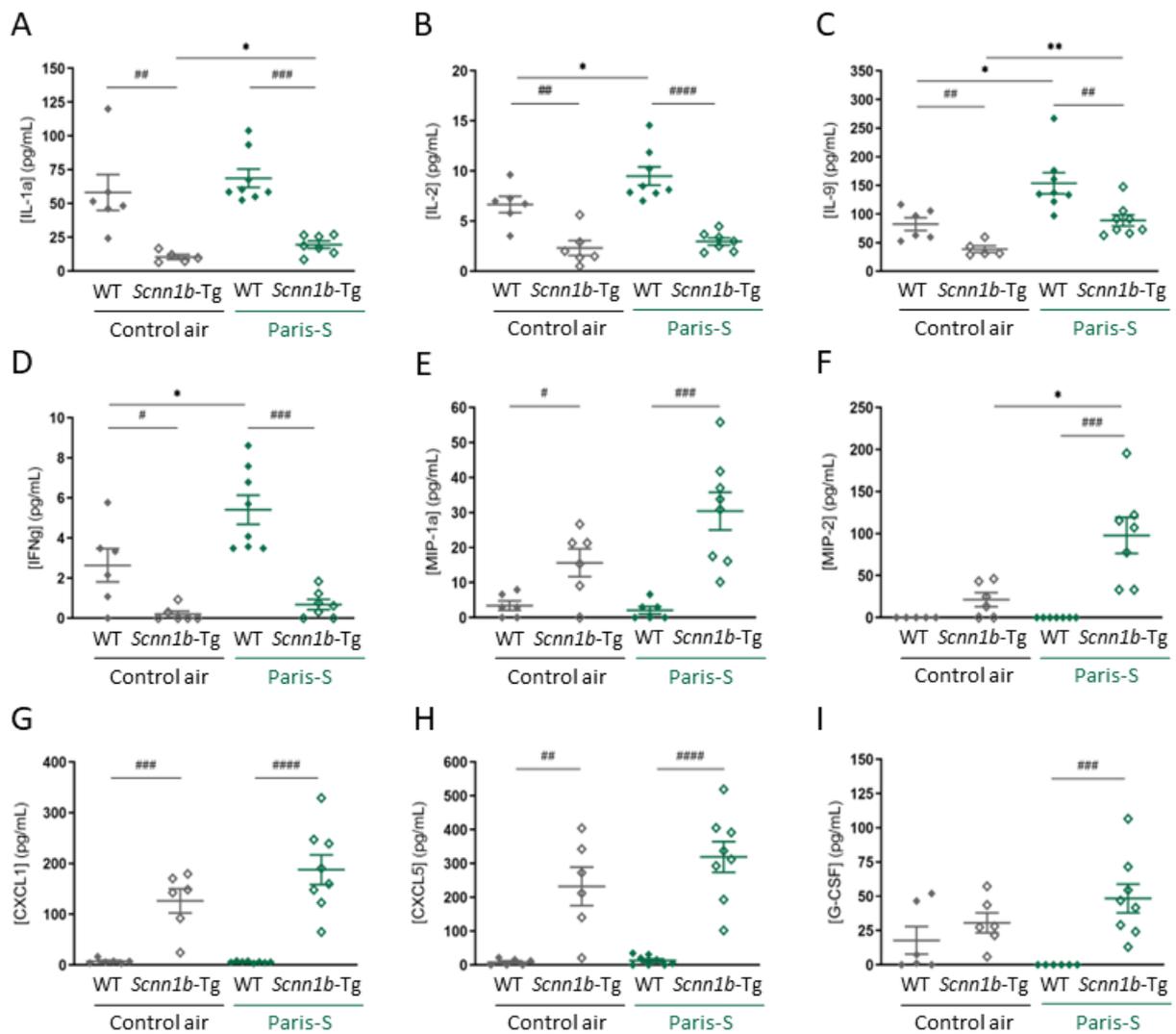


Fig.5 Cytokines secretion in WT and *Scnn1b*-Tg mice exposed to a Paris-S atmosphere. BAL fluid concentrations of pro-inflammatory cytokines IL-1a (A), IL-9 (B), IL-2 (C), IFNg (D), MIP-1a (E), MIP-2 (F), CXCL1 (G), CXCL5 (H) and G-CSF (I). Concentrations are expressed in pg/mL. # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ and #### $p < 0.0001$ compared with WT mice; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ and **** $p < 0.0001$ compared with control air mice. $n = 5-8$ mice per group.

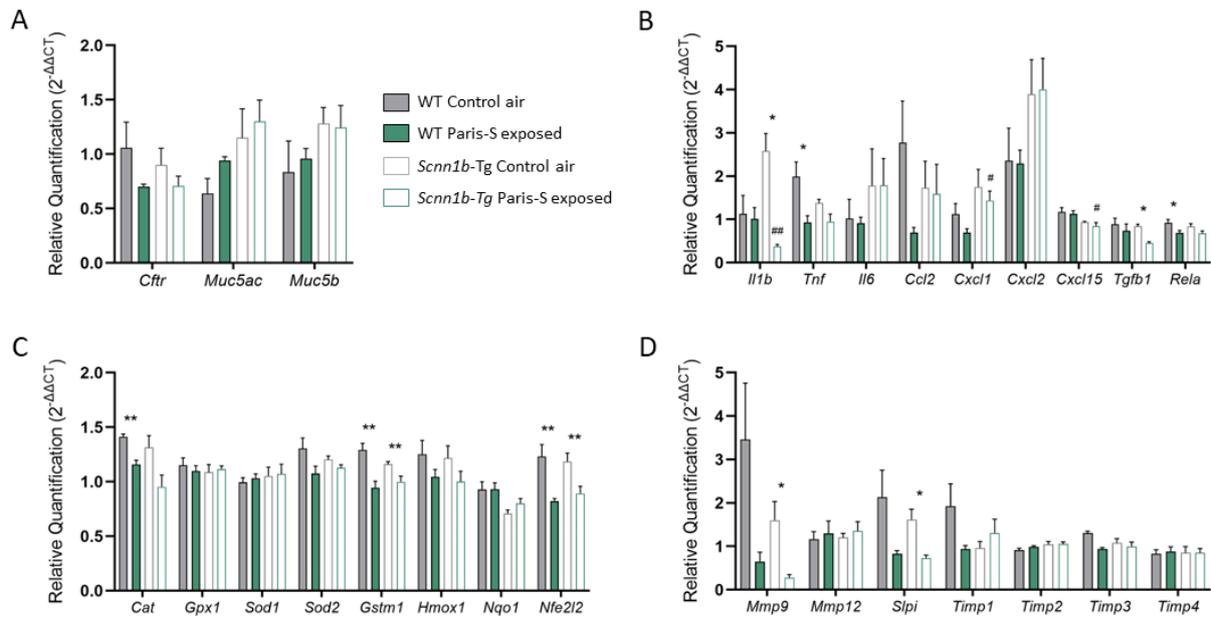


Fig.6 Gene expression pattern in WT and *Scnn1b*-Tg mice exposed to Paris-S atmosphere. **(A)** mRNA transcript levels of *Cfr* and *Muc5ac* and *Muc5b*. **(B)** mRNA transcript levels of inflammatory genes. **(C)** mRNA transcript levels of antioxidant enzymes. **(D)** mRNA transcript levels of proteases and protease inhibitors. Transcript levels are expressed as RQ for Relative Quantification ($2^{-\Delta\Delta CT}$) with *Hprt* used as endogenous control. # $p < 0.05$ and ## $p < 0.01$ compared with WT mice; * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ compared with control air mice. $n = 4-6$ mice per group.

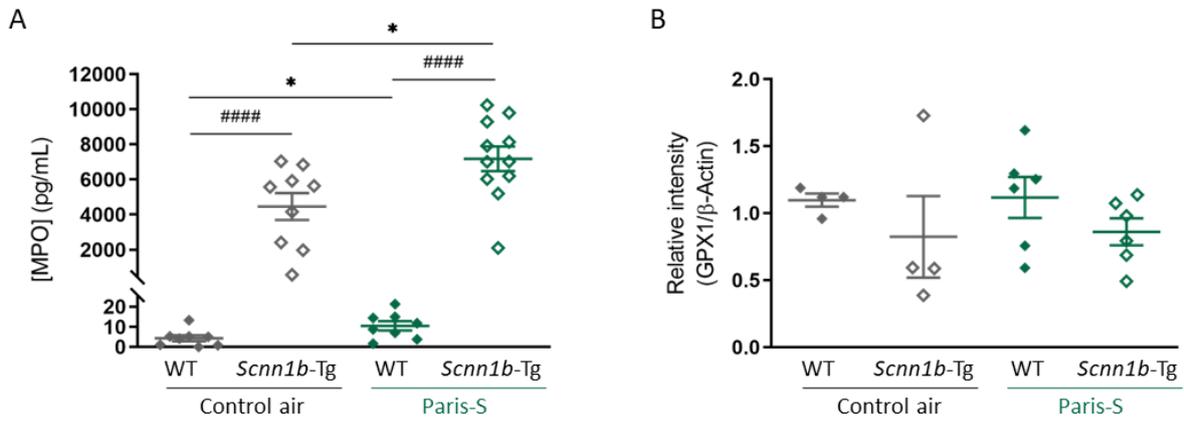


Fig.7 Oxidative stress markers assessment in WT and *Scnn1b*-Tg mice following exposure to Paris-S atmosphere. **(A)** Myeloperoxidase (MPO) concentration in BAL fluid from WT and *Scnn1b*-Tg control and Paris-S exposed mice. Concentration is expressed in pg/mL. ##### $p < 0.0001$ compared with WT mice; * $p < 0.01$ compared with control air mice. $n = 9-11$ mice per group. **(B)** Glutathione peroxidase 1 (GPX1) protein expression in lung homogenates of WT and *Scnn1b*-Tg mice exposed to control air or Paris-S atmosphere. Expression is normalized to β -actin. $n = 4-6$ mice per group.

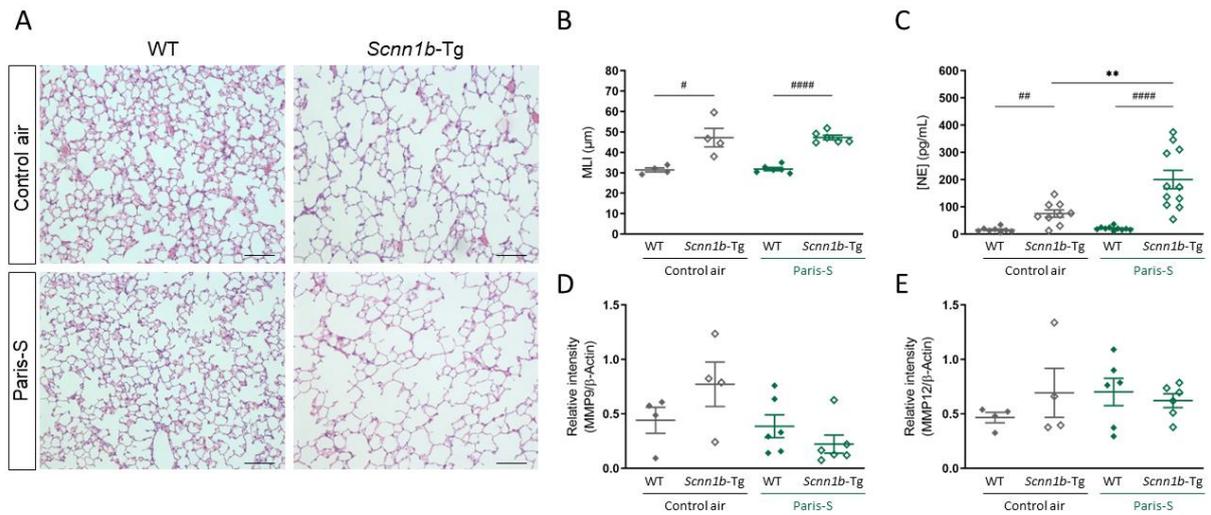


Fig.8 Assessment of lung remodeling in WT and *Scnn1b*-Tg mice exposed to a Paris-S atmosphere. **(A)** Lung histology from WT and *Scnn1b*-Tg control and Paris-S exposed mice. Scale bar = 100 μm. **(B)** Mean linear intercept (MLI) quantification in Paris-S exposed WT and *Scnn1b*-Tg mice and control air mice. n = 4-6 mice per group. **(C)** Neutrophil Elastase (NE) quantification in BAL fluid from WT and *Scnn1b*-Tg control and Paris-S exposed mice. Concentration is expressed in pg/mL. ## p < 0.01 and ##### p < 0.0001 compared with WT mice; ** p < 0.01 compared with control air mice. n = 9-11 mice per group. **(D-E)** Matrix metalloproteinases MMP9 and MMP12 expression in lung homogenates of WT and *Scnn1b*-Tg mice exposed to control air or Paris-S atmosphere. Expression is normalized to β-actin. n = 4-6 mice per group.

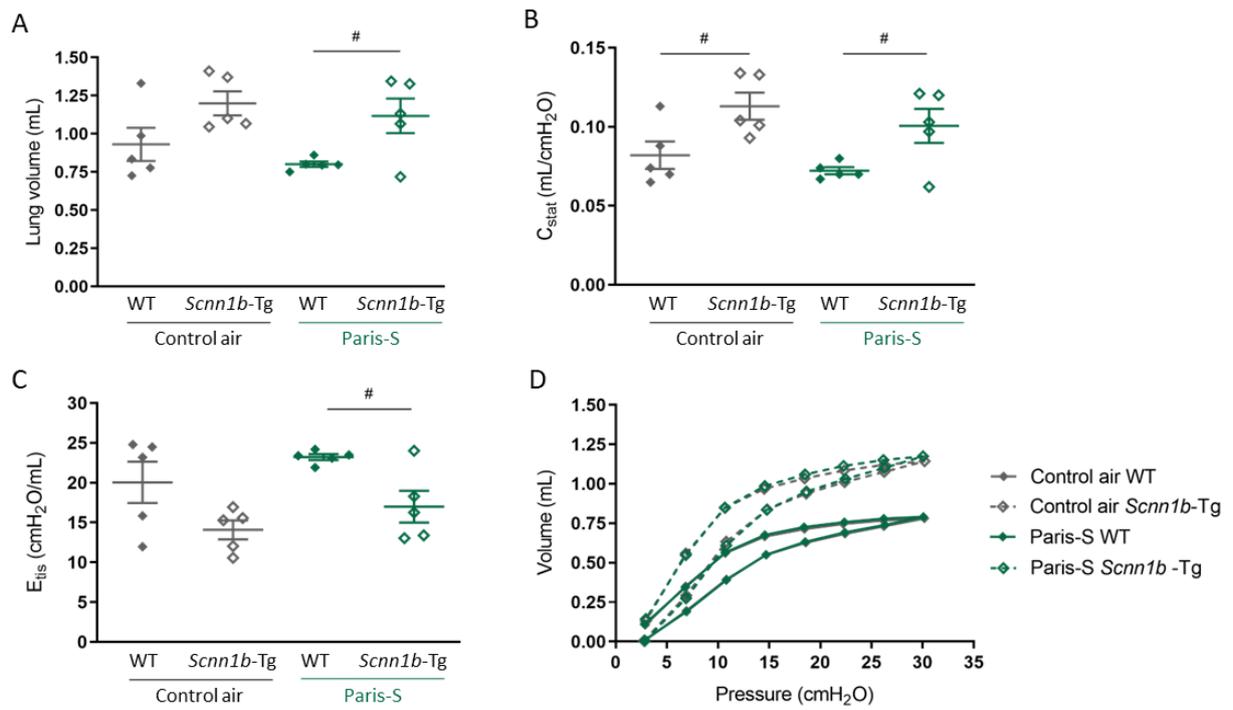


Fig.9 Lung mechanics measurement in WT and *Scnn1b*-Tg mice exposed to Paris-S atmosphere. **(A-D)** Lung volume **(A)**, static lung compliance (C_{stat}) **(B)**, tissue elastance (E_{tis}) **(C)** and pressure-volume curves **(D)** were measured in WT and *Scnn1b*-Tg control air mice and WT and *Scnn1b*-Tg mice exposed to Paris-S atmosphere. # $p < 0.05$ compared with WT littermates. $n = 5$ mice per group.

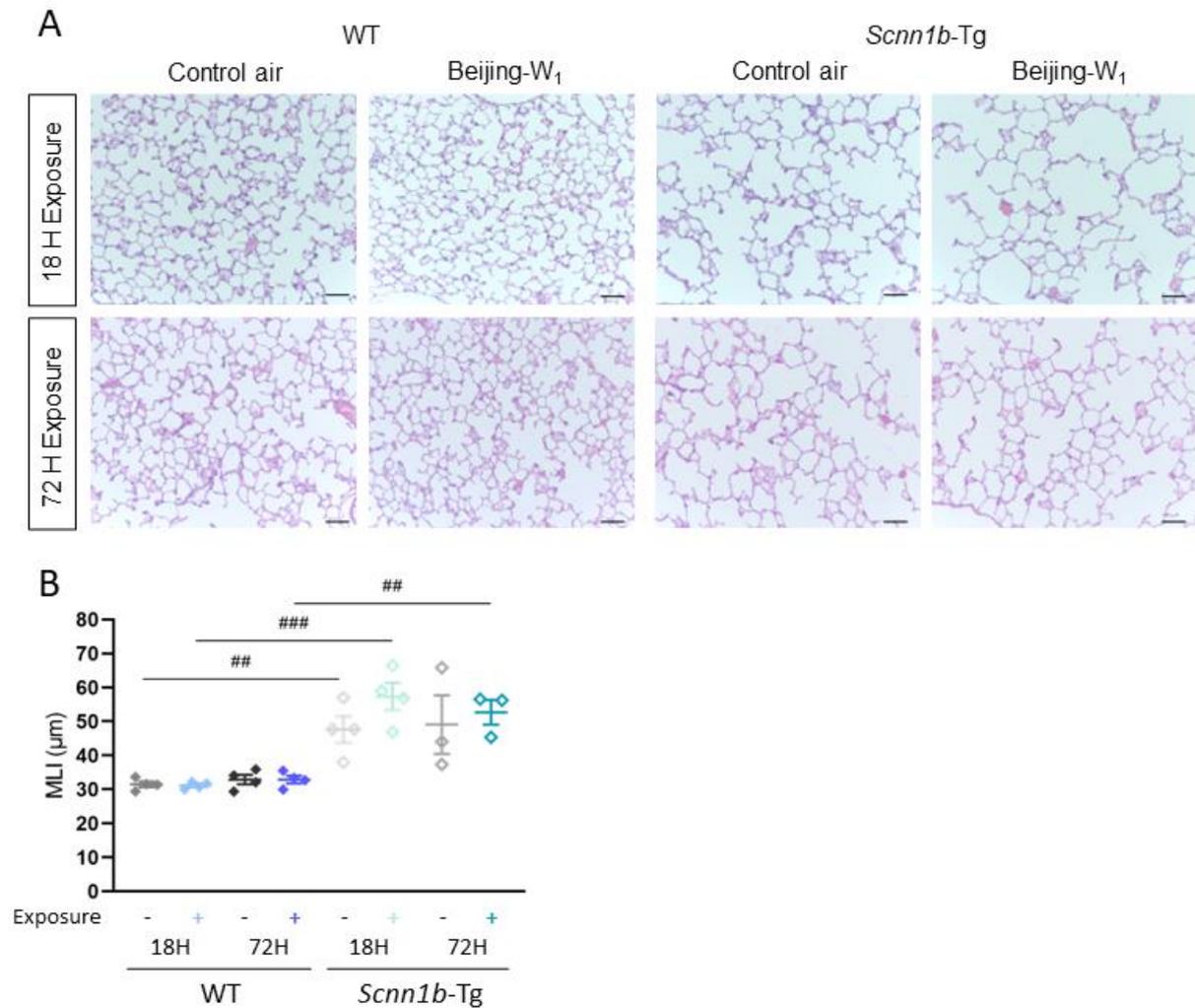


Fig.10 Morphometry assessment following an 18-hour or 72-hour exposure to Beijing-W₁ atmosphere. Lung histology (**A**) and MLI determination (**B**) in WT and *Scnn1b*-Tg mice exposed either 18H or 72H to a Beijing-W₁ atmosphere and control littermates. Scale bar = 50 μm. ## p < 0.01 and ### p < 0.001 compared with WT littermates. n = 3-4 mice per group.

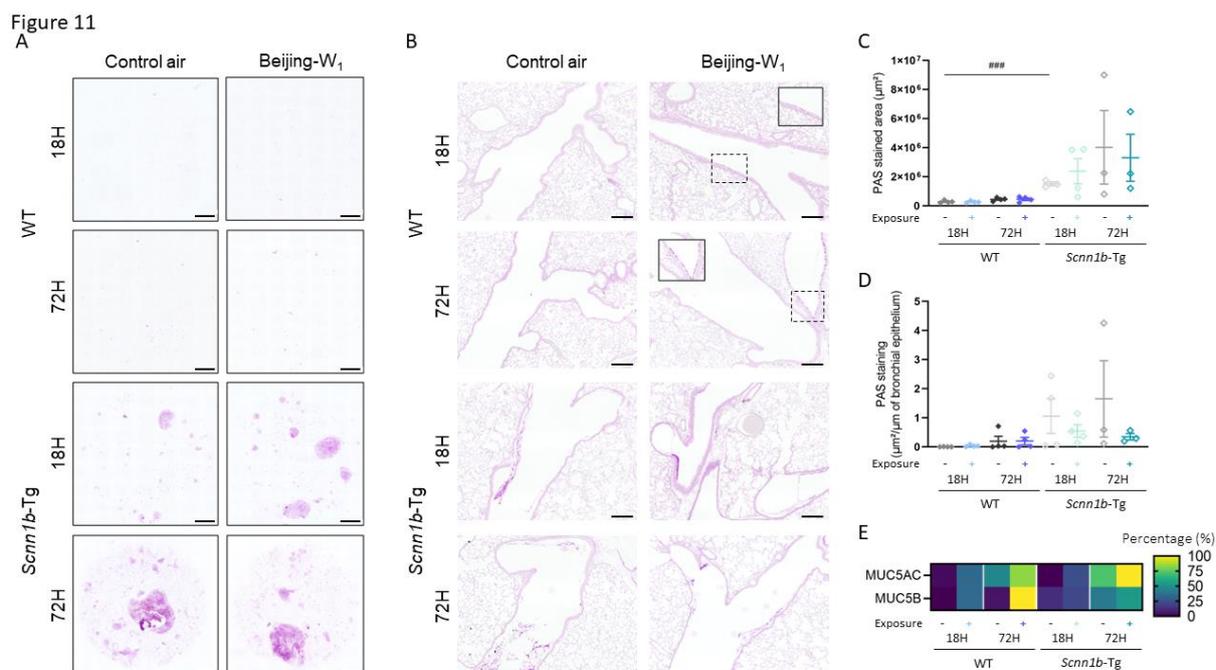


Fig.11 Mucus production analysis in response to an 18-hour and 72-hour exposure to a Beijing-W₁ atmosphere. **(A)** PAS staining in BAL fluid. Scale bar = 1 000 µm. **(B)** PAS staining in lung sections. Scale bar = 200 µm. **(C)** BAL PAS staining quantification expressed as PAS-stained surface area (µm²). ### p < 0.001 compared with WT littermates. **(D)** Tissue PAS staining quantification expressed as PAS-stained surface reported to total perimeter of bronchi on lung section (µm²/µm of bronchial epithelium). **(E)** MUC5AC and MUC5B dosage in lung homogenates of WT and *Scnn1b*-Tg mice exposed to ambient air or Beijing-W₁ atmosphere during 18H or 72H. Mucin concentrations were reported to total protein quantity (pg/mg of protein). Results are presented in a heatmap where data were normalized and expressed as percentages with 0% defined as the smallest dosage result and 100% defined as the greatest dosage result for each mucin.

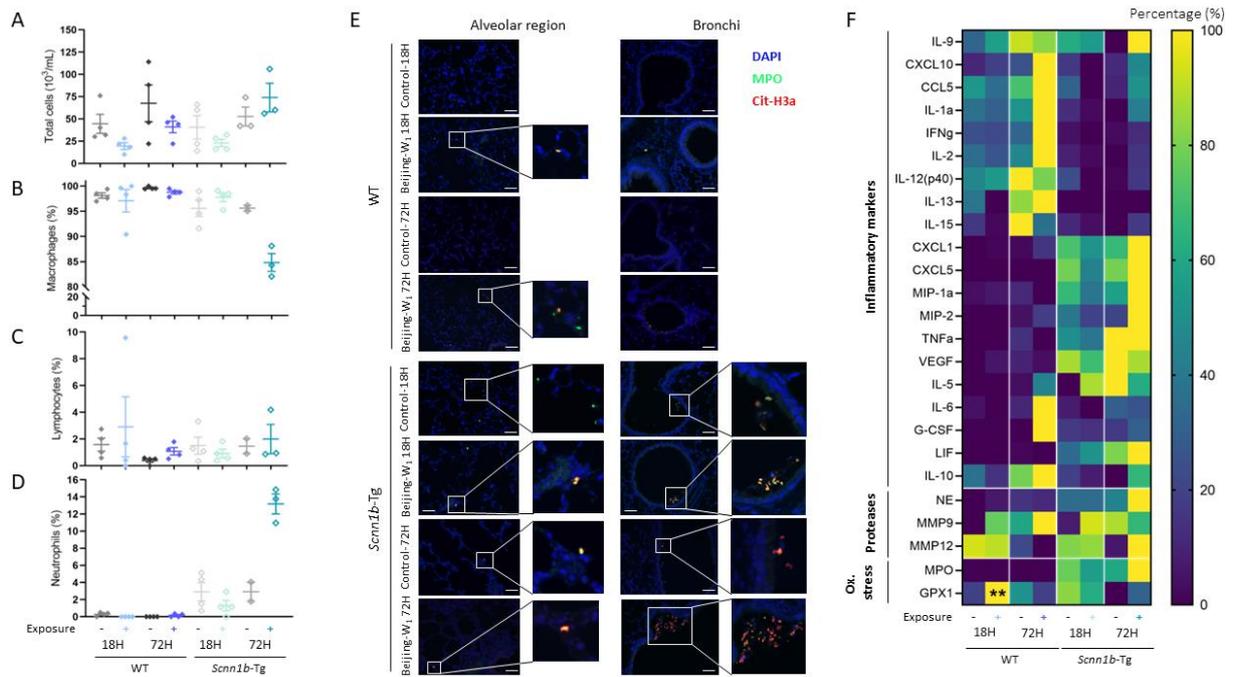


Fig.12 Airway inflammation analysis following 18-hour and 72-hour exposure to Beijing-W₁ atmosphere. **(A-D)** BAL analysis showing total cell count **(A)**, macrophages **(B)**, lymphocytes **(C)** and neutrophils **(D)** proportions in BAL from WT and *Scnn1b*-Tg Beijing-W₁ exposed and control air mice. **(E)** Immunofluorescence for Neutrophil Extracellular Traps (NETs) staining on lung sections of WT and *Scnn1b*-Tg control and Beijing-W₁ exposed mice. Merged images are presented with nuclei staining in blue (DAPI), MPO staining in green and Cit-H3 staining in red. NETs are identified as extracellular structures with co-localization of MPO and Cit-H3 (yellow). Scale bar = 50 μm . **(F)** Protein expression profile in WT and *Scnn1b*-Tg mice exposed to Beijing-W₁ atmosphere for 18H and 72H. For each protein, data are presented as percentages with 0% defined as the smallest concentration/relative expression and 100% defined as the greatest concentration/relative expression. ** p < 0.01 compared with control air mice. n = 3-4 mice per group.

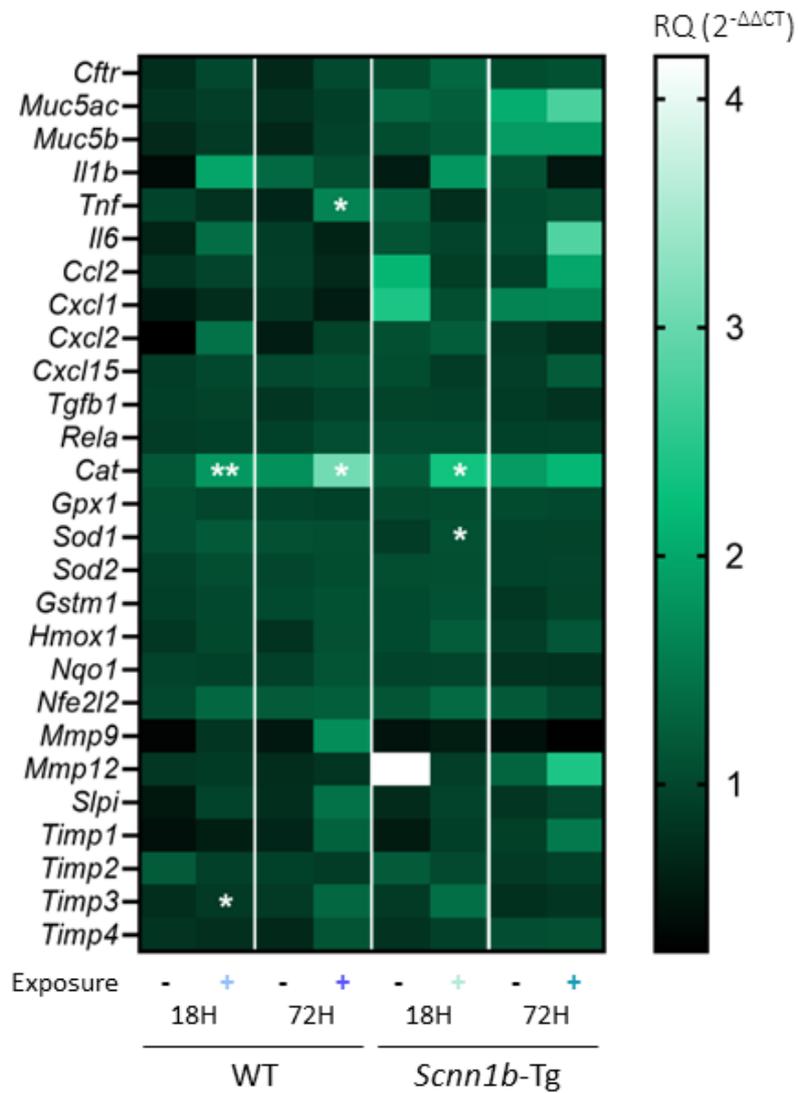


Fig.13 Gene expression pattern in WT and *Scnn1b*-Tg mice exposed 18H and 72H to Beijing-W₁ atmosphere. A total of 27 genes representative of *Cftr*, mucins, inflammatory and oxidative stress response and lung remodeling were studied. mRNA transcript levels are expressed as RQ for Relative Quantification ($2^{-\Delta\Delta CT}$) with *Hprt* used as endogenous control. * p < 0.05 and ** p < 0.01 compared with control air mice. n = 3-4 mice per group.

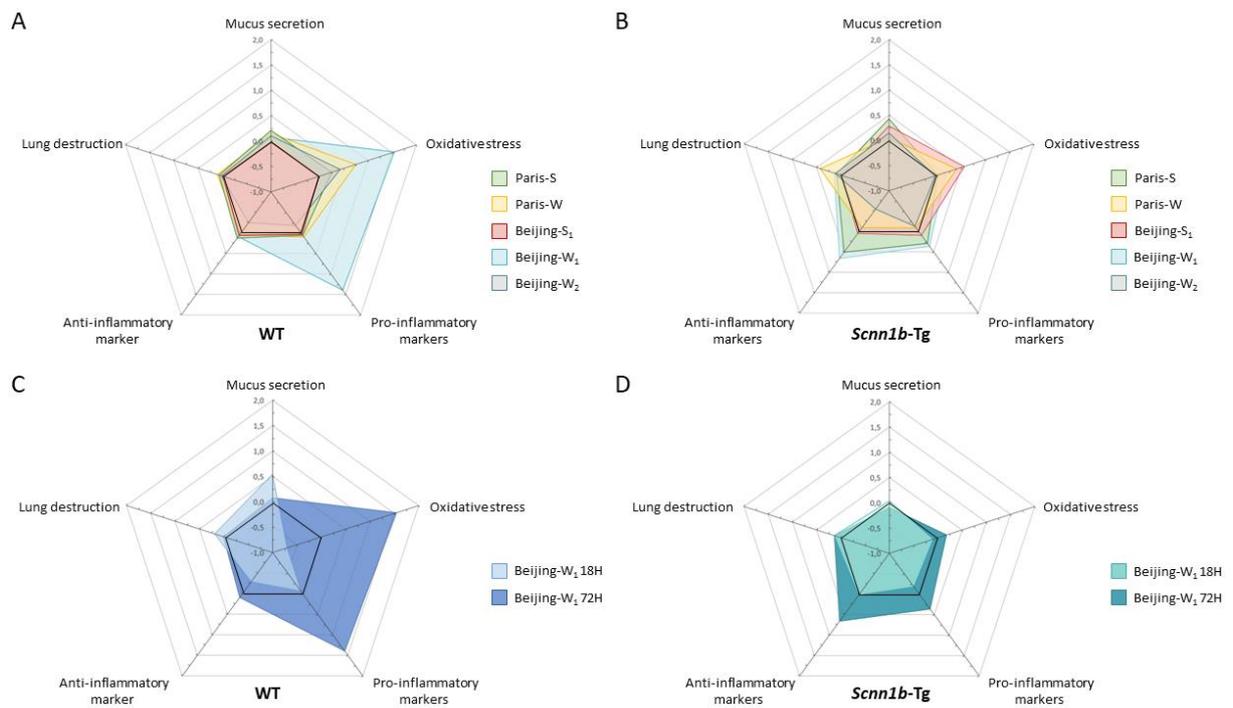


Fig.14 Overview of effects induced in WT and *Scnn1b*-Tg mice exposed to realistic urban atmospheres. **(A-B)** Radar plots showing global effects of different types of urban atmospheres in WT mice **(A)** and in *Scnn1b*-Tg mice **(B)**. **(C-D)** Radar plots showing global effects of 18-hour and 72-hour exposure to Beijing-W₁ atmosphere in WT mice **(C)** and in *Scnn1b*-Tg mice **(D)**. Black line indicates no effect.

Supplementary materials

Table S1 List of target genes and primers used for RT-qPCR analysis.

Gene	Forward primer (5' → 3')	Reverse primer (5' → 3')
Internal control		
<i>Hprt</i>	AGCAGTACAGCCCCAAAATG	GTCTGGCCTGTATCCAACACT
CFTR		
<i>Cftr</i>	GAAGCGATGTTGGATTGCCAG	CTCAGAAGTGCCTGAAGGGAG
Mucins		
<i>Muc5ac</i>	TCACCCTCAAGGGCATGTTG	GCCTGGTATGTCCTGGGTTG
<i>Muc5b</i>	TGTTACGGACAACGGTGTGG	TAGACCATAGGCGCCTGACA
Inflammation		
<i>Ccl2</i>	GCTGGAGCATCCACGTGTT	GAGTGGGGCGTTAACTGCAT
<i>Cxcl1</i>	TCAAGAATGGTCGCGAGGCT	CTTTCTCCGTTACTTGGGGACA
<i>Cxcl15</i>	TGGGTGAAGGCTACTGTTGG	CAGAAGCTTCATTGCCGGTG
<i>Cxcl2</i>	CCCCTGGTTCAGAAAATCATCCA	TTCTCTTTGGTTCTTCCGTTGAGG
<i>Il1b</i>	TTGAAGTTGACGGACCCCAAA	AAGCTGGATGCTCTCATCAGG
<i>Il6</i>	TGATGGATGCTACCAAACCTGGA	GGTACTCCAGAAGACCAGAGRG
<i>Rela</i>	GATGGCTACTATGAGGCTGACC	CAGGTCTCGCTTCTTCACAC
<i>Tgfb1</i>	GCTAATGGTGGACCGCAAC	ACTGTGTGAGATGTCTTTGGTTTTTC
<i>Tnf</i>	TGTCTACTGAACTTCGGGGTG	GCCATAGAACTGATGAGAGGGA
Antioxidant enzymes		
<i>Cat</i>	TTCTGGAGTCTTCGTCCCGA	CCATAGCCATTCATGTGCCG
<i>Gpx1</i>	CCTGTGAGCGCTAGTACGG	GAGAAGGCATACACGGTGGAC
<i>Gstm1</i>	ATGCTCTGTTACAACCCTGACT	CCTGCAAACCATGGCCTCTT
<i>Hmox1</i>	CACAGATGGCGTCACTTCGT	GCTAGTGCTGATCTGGGGTT
<i>Nfe2l2</i>	CTGTATGCAGCTTTTGGCAGA	GAGGGGCAGTGAAGACTGAAC
<i>Nqo1</i>	TGTTTTGAGAGAGTGCTCGT	CCCCAGTGGTGATAGAAAGCA
<i>Sod1</i>	ACGTCCATCAGTATGGGGACA	CAGGTCTCCAACATGCCTCTC
<i>Sod2</i>	TCGCTTACAGATTGCTGCCT	GGTAGTAAGCGTGCTCCCAC
Lung remodeling		
<i>Mmp9</i>	CGACATAGACGGCATCCAGTA	GTCGGCTGTGGTTCAGTTGT
<i>Mmp12</i>	GGCTGCTCCCATGAATGACA	GTCATTGGAATTCTGTCCTTTCCA
<i>Slpi</i>	TGCGGCCTTTTACCTTTTAC	GGGCAGGCTCCGATTTTGAT
<i>Timp1</i>	CAGCCTTCTGCAACTCGGAC	AACGCTGGTATAAGGTGGTCTC
<i>Timp2</i>	GCAACAGGCGTTTTGCAATG	CGGAATCCACCTCCTTCTCG
<i>Timp3</i>	CCTTTGGCACTCTGGTCTACA	CTTTCAGAGGCTTCCGTGTGA
<i>Timp4</i>	GACTCTTCCCTCTGTGGTGTG	CCAGGGCTCAATGTAGTTGC

Table S2 Summary table of fold-change for all studied makers in WT mice.

Biological endpoint	Markers	Beijing-W ₁ 18H	Beijing-W ₁ 72H	Beijing-W ₂	Beijing-S	Paris-W	Paris-S
Mucus secretion	MUC5AC	1,31	1,26	1,25	1,02	1,16	1,12
	MUC5B	1,17	1,48	1,05	0,92	0,91	1,16
	PAS staining (tissue)	10,62	1,05	N.A	0,8	2,18	3,19
	PAS staining (BAL)	0,95	1,02	1,52	1,06	N.A	1,05
	Mean	3,51	1,20	1,27	0,95	1,42	1,63
	Log₁₀	0,55	0,08	0,1	-0,02	0,15	0,21
Destruction of lung tissue	MLI	0,99	1,00	N.A	1,02	0,95	1,01
	MMP9	2,29	1,35	0,67	1,19	1,08	0,87
	MMP12	0,99	0,90	0,78	0,79	1,60	1,50
	NE	1,91	0,85	1,7	0,89	1,49	1,3
	Moyenne	1,54	1,03	1,05	0,97	1,28	1,17
	Log₁₀	0,19	0,01	0,02	-0,01	0,11	0,07
Oxidative stress	MPO/GPX1 Ratio	0,20	35,20	2,69	0,97	5,65	1,80
	Log₁₀	-0,70	1,54	0,43	-0,01	0,75	0,26
Pro-inflammatory markers	CCL5	0,66	1,41	0,39	1,10	1,15	1,58
	CXCL1	1,74	5,45	0,59	0,65	1,15	0,78
	CXCL5	-	-	-	1,33	1,26	1,60
	CXCL10	1,17	2,19	0,50	1,02	1,29	1,47
	IFNg	0,93	2,64	0,37	0,94	1,53	2,05
	G-CSF	0,74	501,32	0,00	2,19	0,20	0,01
	IL-1a	0,88	1,70	0,61	1,05	1,07	1,18
	IL-1b	-	0,00	-	0,00	1,44	1,20
	IL-2	0,86	1,72	0,50	1,08	1,19	1,43
	IL-5	-	14,89	-	3,84	1,78	0,90
	IL-6	0,00	9,51	-	0,95	0,33	0,00
	IL-9	1,33	0,93	1,32	0,95	1,23	1,86
	IL-12(p40)	1,13	0,82	0,40	0,51	1,70	2,34
	IL-13	0,00	1,20	0,45	-	1,07	0,66
	IL-15	0,11	0,36	0,51	1,39	1,42	2,49
	MIP-1a	1,25	0,40	0,72	0,78	0,63	1,14
	MIP-2	-	4,26	0,00	-	3,30	0,00
	VEGF	1,38	0,75	0,75	0,85	1,56	1,08
	NE	1,91	0,85	1,7	0,89	1,49	1,3
	Macrophages (10 ³ /mL)	0,43	0,60	1,63	1,12	1,18	0,64
Lymphocytes (10 ³ /mL)	1,15	1,39	1,49	0,00	0,55	0,49	
Neutrophils (10 ³ /mL)	0	-	0	-	-	-	
Mean	0,87	25,11	0,66	1,09	1,26	1,15	
Log₁₀	-0,06	1,40	-0,18	0,04	0,10	0,06	
Anti-inflammatory marker	IL-10	0,51	1,24	0,57	1,15	1,12	1,34
	Log₁₀	-0,29	0,09	-0,24	0,06	0,05	0,13

Lung function	Inspiratory capacity			1,04		0,86
	Static compliance	N.A	N.A	1,05	N.A	0,88
	Mean			1,04		0,87
	Log₁₀			0,02		-0,06

N.A = Not Attributable as not measured

Fold-change were calculated between each exposed group and its corresponding control air group from mean marker value. A mean fold-change was then calculated for each biological endpoint. For scaling matter, Log₁₀ of these mean fold-change were finally plot on the radar charts. Of note, genes expressions were not taken in consideration for radar plot construction. In addition, lung function was not included in radar plots as it was not measured for all atmospheres.

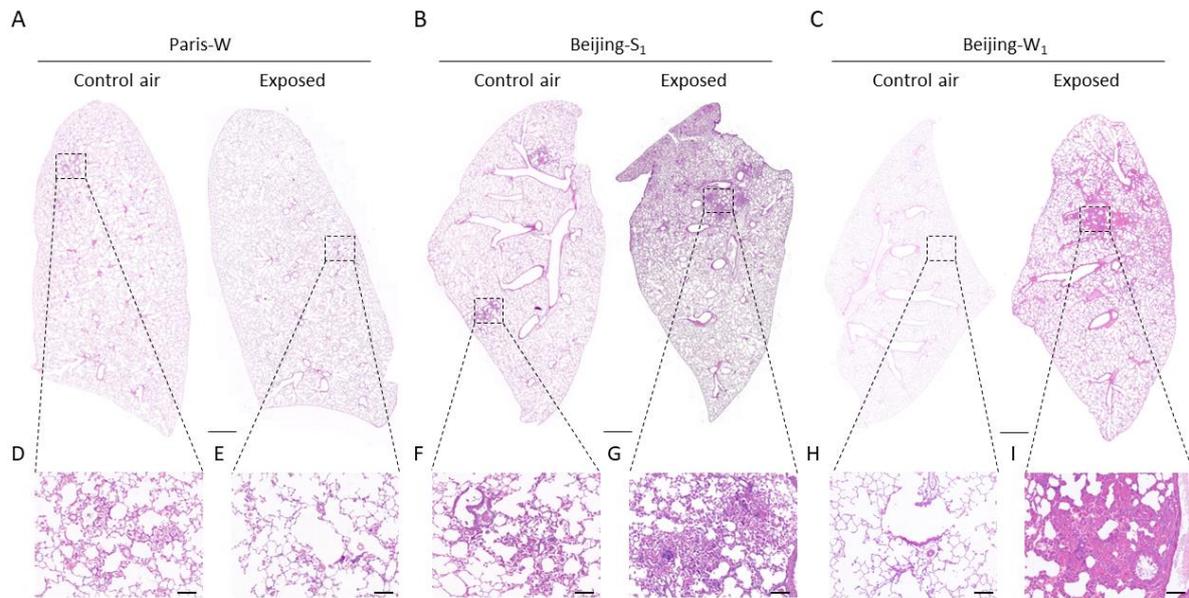
Table S3 Summary table of fold-change for all studied markers in *Scnn1b*-Tg mice.

Biological endpoint	Markers	Beijing-W ₁ 18H	Beijing-W ₁ 72H	Beijing-W ₂	Beijing-S	Paris-W	Paris-S
Mucus secretion	MUC5AC	1,24	1,17	1,57	0,94	1,56	1,16
	MUC5B	1,04	1,06	1,18	0,80	0,98	1,08
	PAS staining (tissue)	0,52	0,21	N.A	0,70	0,85	1,54
	PAS staining (BAL)	1,57	0,82	1,48	5,31	N.A	6,99
	Mean	1,09	0,81	1,41	1,94	1,13	2,69
	Log₁₀	0,04	-0,09	0,15	0,29	0,05	0,43
Destruction of lung tissue	MLI	1,20	1,07	N.A	0,97	1,00	1,00
	MMP9	2,28	0,85	1,93	1,03	8,20	0,29
	MMP12	1,01	1,46	1,40	0,41	0,85	0,90
	NE	1,01	2,09	0,57	1,41	0,64	2,66
	Mean	1,38	1,37	1,30	0,95	2,67	1,21
	Log₁₀	0,14	0,14	0,11	-0,02	0,43	0,08
Oxidative stress	MPO/GPX1 Ratio	0,80	1,52	0,91	3,68	2,56	1,03
	Log₁₀	-0,1	0,19	-0,91	0,57	0,41	0,01
Pro-inflammatory markers	CCL5	0,00	5,18	-	1,28	0,86	1,18
	CXCL1	0,73	1,48	0,68	1,13	0,97	1,49
	CXCL5	0,55	1,26	0,91	1,04	1,02	1,37
	CXCL10	0,70	1,70	0,63	1,05	1,30	1,17
	IFNg	0,68	1,89	0,00	4,04	0,86	7,09
	G-CSF	0,84	1,80	0,66	1,23	0,97	1,58
	IL-1a	0,66	3,19	0,50	1,28	0,81	1,39
	IL-2	0,82	1,52	0,50	1,33	0,86	1,68
	IL-5	-	0,61	-	0,75	1,08	0,36
	IL-6	0,00	0,85	-	0,82	0,53	3,76
	IL-9	0,93	3,46	0,39	1,44	0,98	1,52
	IL-12(p40)	0,36	2,06	0,00	-	0,00	-
	IL-15	0,30	-	0,00	-	0,04	-
	MIP-1a	0,62	1,68	0,63	1,00	0,71	1,94
	MIP-2	0,49	4,97	0,96	1,02	0,75	4,59
	TNFa	0,78	0,99	-	-	-	-
	VEGF	0,82	0,89	2,00	1,46	1,29	1,04
	NE	1,01	2,09	0,57	1,41	0,64	2,66
	Macrophages (10 ³ /mL)	0,58	1,58	0,83	0,91	0,53	0,57
	Lymphocytes (10 ³ /mL)	0,45	2,09	2,22	0,54	0,81	0,78
Neutrophils (10 ³ /mL)	0,32	7,65	0,45	0,53	0,38	1,01	
Mean	0,66	2,31	0,75	1,24	0,81	1,96	
Log₁₀	-0,18	0,36	-0,12	0,09	-0,09	0,29	
Anti-inflammatory markers	IL-10	0,62	7,92	0,17	1,48	0,70	1,88
	LIF	1,48	1,24	0,39	0,75	0,91	4,53
	Mean	1,05	4,58	0,28	1,11	0,81	3,21
	Log₁₀	0,02	0,66	-0,55	0,05	-0,09	0,51

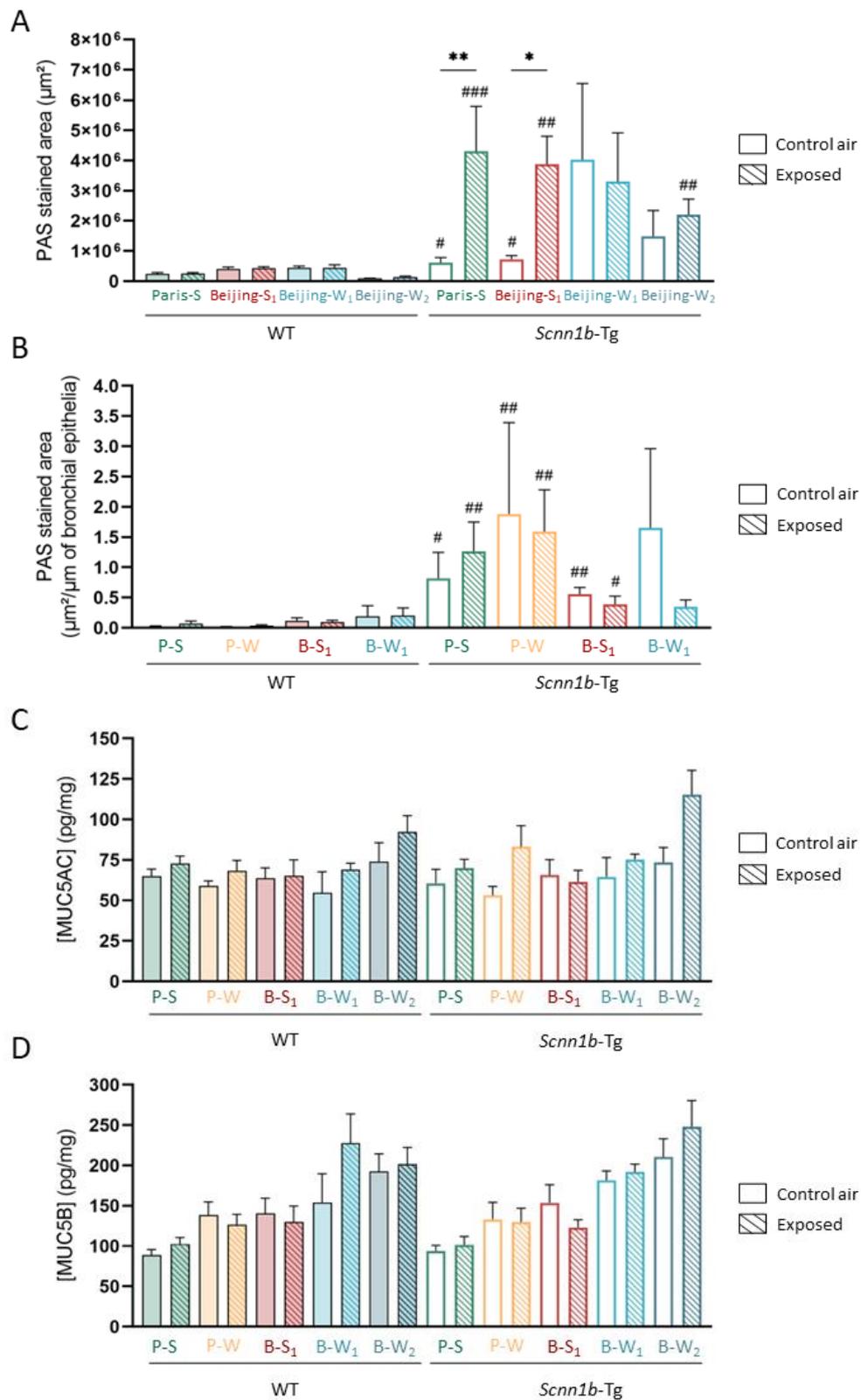
Lung function	Inspiratory capacity			1,08			0,93
	Compliance			1,04			0,89
	Mean	N.A	N.A	1,06	N.A	N.A	0,91
	Log₁₀			0,025			-0,04

N.A = Not Attributable as not measured

Fold-change were calculated between each exposed group and its corresponding control air group from mean marker value. A mean fold-change was then calculated for each biological endpoint. For scaling matter, Log₁₀ of these mean fold-change were finally plot on the radar charts. Of note, genes expressions were not taken in consideration for radar plot construction. In addition, lung function was not included in radar plots as it was not measured for all atmospheres.

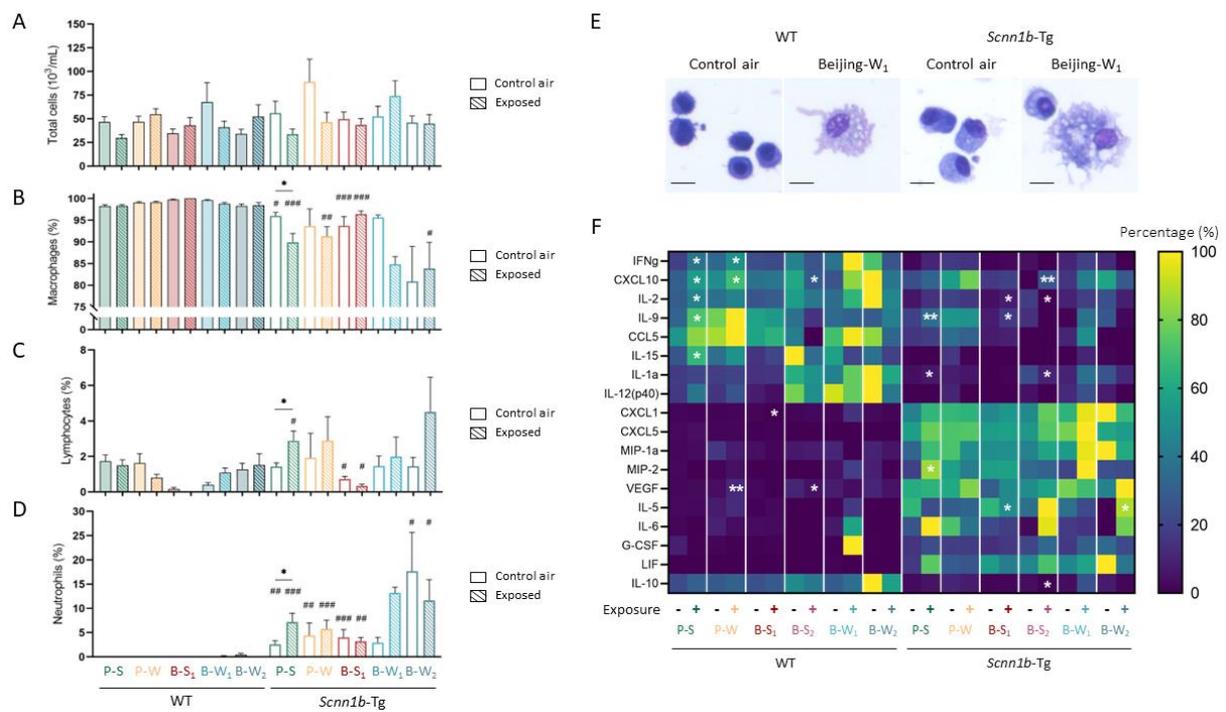


FigS1 Overview of lung histology in *Scnn1b*-Tg mice exposed to complex urban atmospheres. (A-C) Lung sections of *Scnn1b*-Tg mice exposed to Paris-W atmosphere (A), Beijing-S atmosphere (B) or Beijing-W atmosphere (C) and their control air littermate controls. Scale bar = 1 000 μm . (D-I) Detailed micrographs of control and exposed Paris-W, Beijing-S and Beijing-W *Scnn1b*-Tg mice showing alveolar macrophages infiltrates. Scale bar = 100 μm . n = 3-10 mice per group.

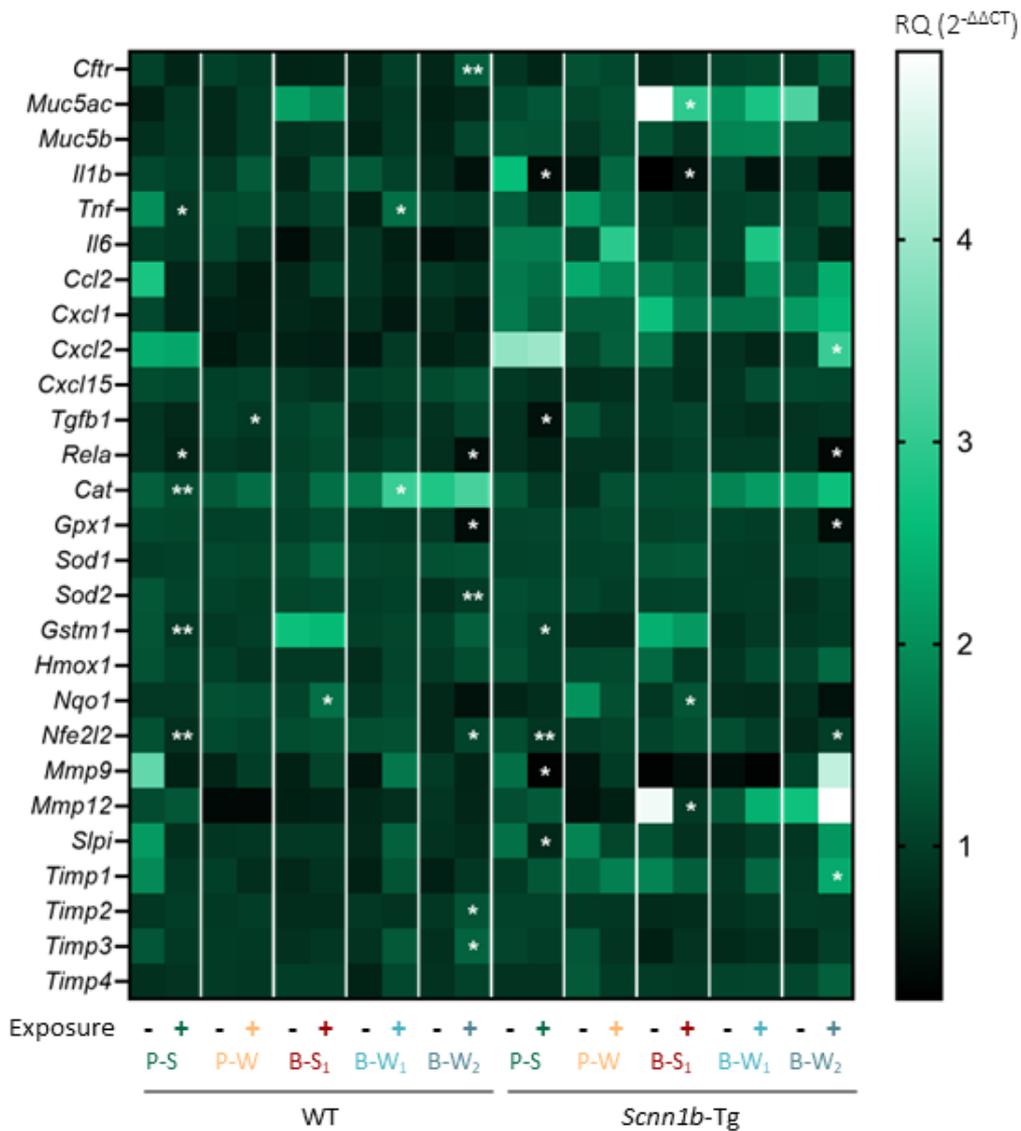


FigS2 Mucus quantification in lungs of WT and *Scnn1b*-Tg mice exposed to complex urban atmospheres. **(A)** PAS staining quantification on BAL. PAS staining is expressed as positive stained surface area in μm^2 . # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ and ##### $p < 0.0001$ compared with WT mice; * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ compared with control air mice. **(B)** PAS staining

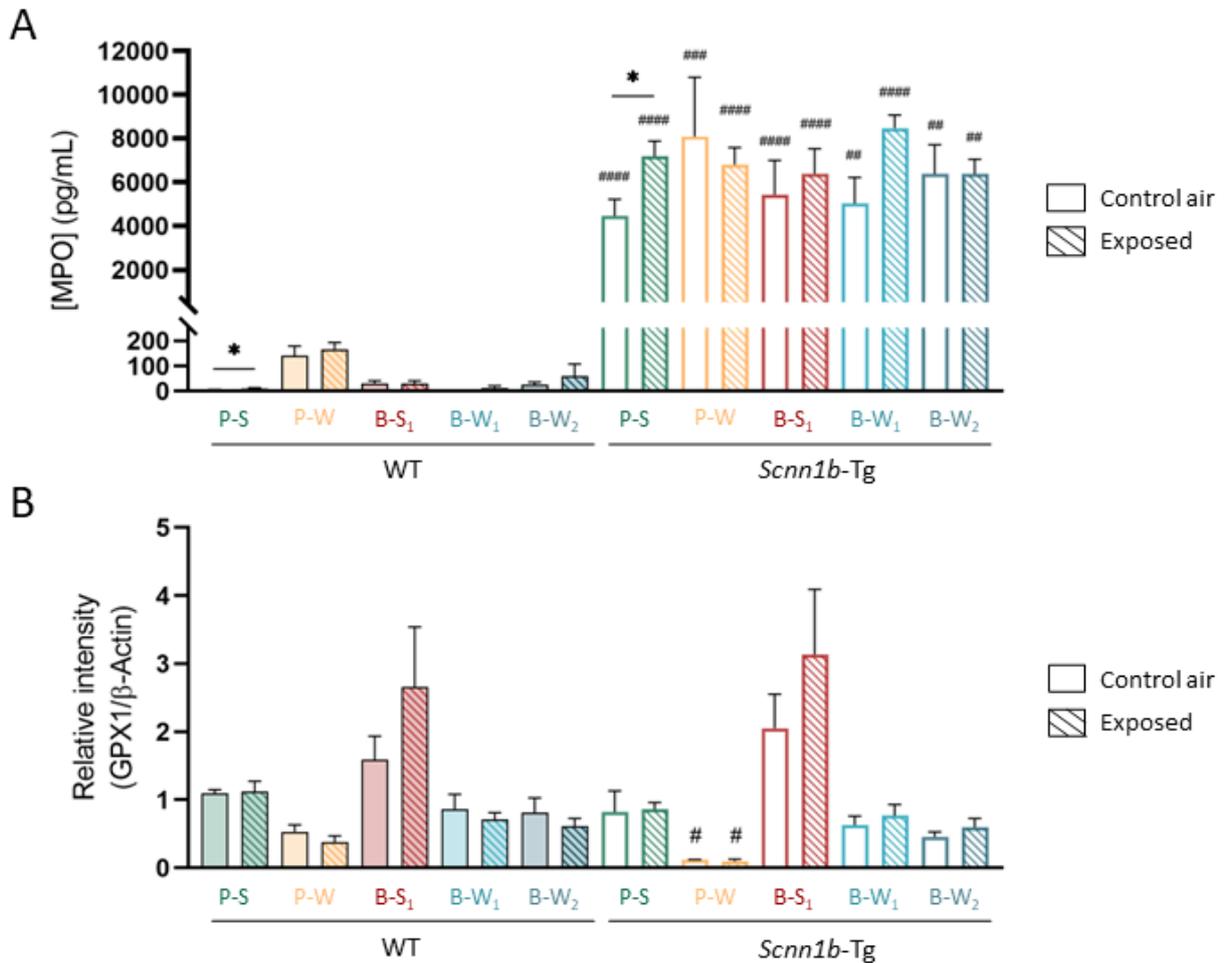
quantification on lung sections. PAS staining is expressed as positive stained surface area in μm^2 normalized to total perimeter of airway epithelium. # $p < 0.05$ and ## $p < 0.01$ compared with WT mice. **(E-D)** MUC5AC and MUCB mucins expression in lung homogenates. Heatmap was generated based on mucins concentrations expressed in pg/mg of lung proteins. For each mucin, data was normalized with 0% defined as the smallest concentration and 100% defined as the greatest concentration. n = 3-11 mice per group.



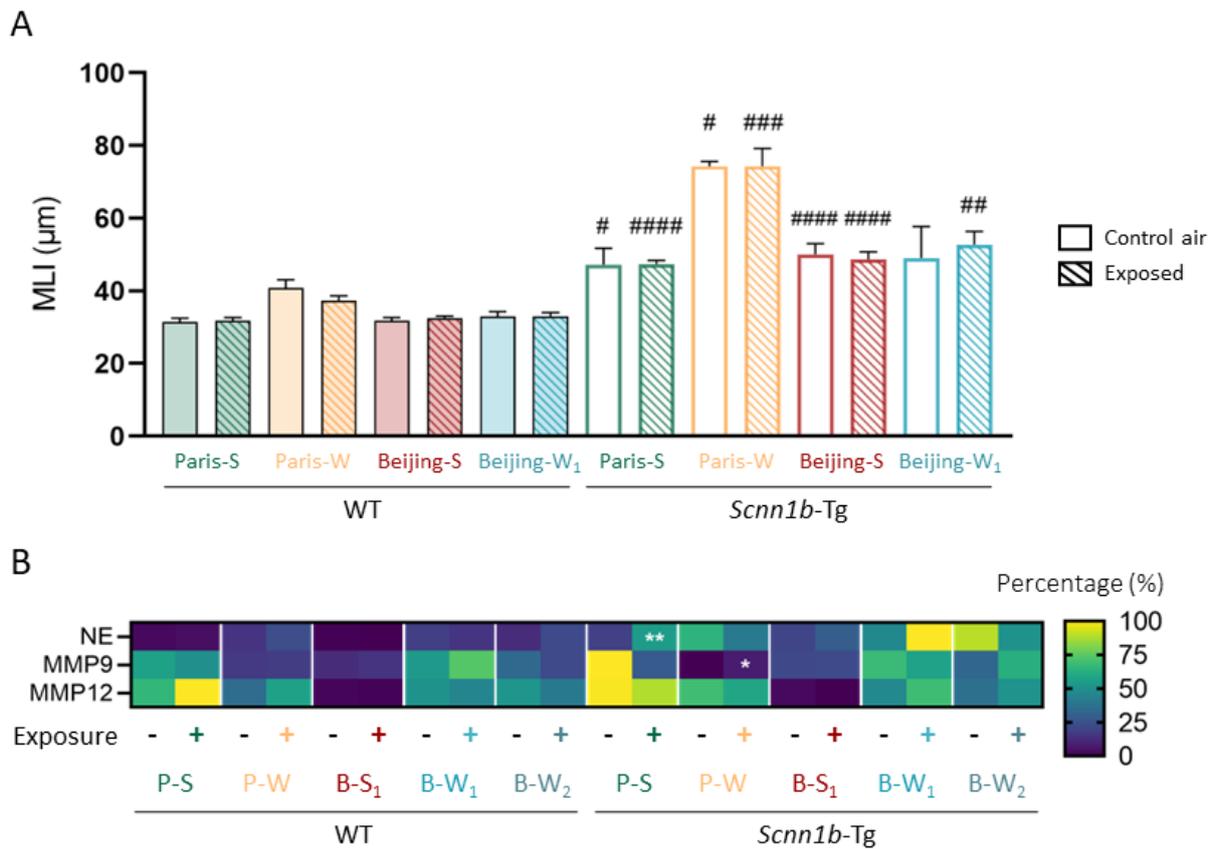
FigS3 Airway inflammation in WT and *Scnn1b*-Tg mice exposed to complex urban atmospheres. **(A-D)** Total cell count and macrophages, lymphocytes, and neutrophils proportions in BAL from exposed and control air mice. # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ and #### $p < 0.0001$ compared with WT mice; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ and **** $p < 0.0001$ compared with control air mice. $n = 3-11$ mice per group. **(E)** Example of activated and vacuolized macrophages in BAL of Beijing-W exposed WT and *Scnn1b*-Tg mice. Scale bar = 10 μm . **(F)** Cytokines secretion profile in WT and *Scnn1b*-Tg mice exposed to different urban atmospheres. Heatmap was generated with normalized cytokines concentrations expressed as percentages. For each cytokine, 0% was defined as the smallest concentration and 100% was defined as the greatest concentration. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ compared with control air mice.



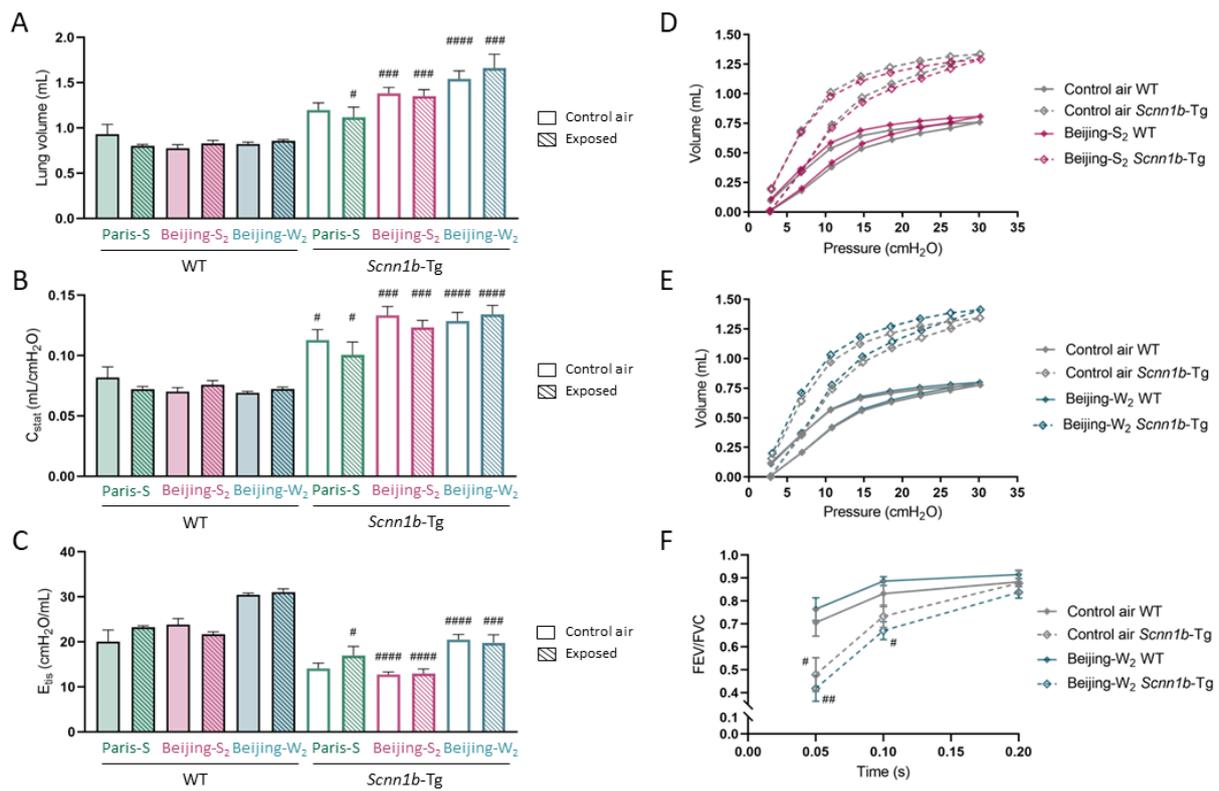
FigS4 Gene expression pattern in WT and *Scnn1b*-Tg mice exposed to complex urban atmospheres. Heatmap was generated with RQ data (2^{-ΔΔCT}) of mRNA transcript levels in WT and *Scnn1b*-Tg control air mice exposed individuals to different urban atmospheres. A total of 28 genes representative of *Cftr*, mucins, inflammatory and oxidative stress response and lung remodeling were studied. *Hprt* was used as endogenous control. * p < 0.05 and ** p < 0.01 compared with control air mice. n = 3-10 mice per group.



FigS5 Oxidative stress markers measurement in WT and *Scnn1b*-Tg mice exposed to complex urban atmospheres. **(A)** MPO levels in BAL fluid. Concentration is expressed in pg/mL and was quantified by ELISA. **(B)** GPX1 expression in lung homogenates. Expression assessed by western blot and quantified relatively to β -actin. # $p < 0.05$ compared with WT mice. * $p < 0.05$ compared with control air mice. $n = 3-11$ mice per group.



FigS6 Assessment of lung remodeling in WT and *Scnn1b*-Tg mice exposed to complex urban atmospheres. **(A)** Mean linear intercept (MLI) measurement in WT and *Scnn1b*-Tg mice and control air mice. n = 3-10 mice per group. **(B)** Proteases expression profile in WT and *Scnn1b*-Tg control and polluted atmospheres exposed mice. NE concentration is expressed in pg/mL of BAL fluid while MMP9 and MMP12 were quantified relatively to β -actin in lung homogenates. Heatmap was generated with normalized data expressed as percentages. For each protease, 0% was defined as the smallest concentration or relative expression value and 100% was defined as the greatest concentration or relative expression value. * p < 0.05 and ** p < 0.01 compared with control air mice. n = 3-11 mice per group.



FigS7 Impact of exposure to complex urban atmospheres on lung function in WT and *Scnn1b*-Tg mice. Respiratory parameters such as lung volume (**A**), static lung compliance (C_{stat}) (**B**), tissue elastance (E_{tis}) (**C**), pressure-volume curves (**D**) and FEV/FVC ratio (**E**) were measured in WT and *Scnn1b*-Tg exposed to Paris-S, Beijing-S₂ and Beijing-W₂ atmospheres and in control individuals. # $p < 0.05$, ### $p < 0.001$ and ##### $p < 0.0001$ compared with WT littermates. $n = 5$ mice per group.

References

1. Boucher RC. Airway surface dehydration in cystic fibrosis: pathogenesis and therapy. *Annu Rev Med.* 2007;58:157-170. doi:10.1146/annurev.med.58.071905.105316
2. Elborn JS. Cystic fibrosis. *The Lancet.* 2016;388(10059):2519-2531. doi:10.1016/S0140-6736(16)00576-6
3. Ferkol T, Rosenfeld M, Milla CE. Cystic fibrosis pulmonary exacerbations. *The Journal of Pediatrics.* 2006;148(2):259-264. doi:10.1016/j.jpeds.2005.10.019
4. Stanford GE, Dave K, Simmonds NJ. Pulmonary Exacerbations in Adults With Cystic Fibrosis: A Grown-up Issue in a Changing Cystic Fibrosis Landscape. *CHEST.* 2021;159(1):93-102. doi:10.1016/j.chest.2020.09.084
5. Sanders DB, Bittner RCL, Rosenfeld M, Hoffman LR, Redding GJ, Goss CH. Failure to Recover to Baseline Pulmonary Function after Cystic Fibrosis Pulmonary Exacerbation. *Am J Respir Crit Care Med.* 2010;182(5):627-632. doi:10.1164/rccm.200909-1421OC
6. Sanders DB, Bittner RC, Rosenfeld M, Redding GJ, Goss CH. Pulmonary exacerbations are associated with subsequent FEV1 decline in both adults and children with cystic fibrosis. *Pediatric Pulmonology.* 2011;46(4):393-400. doi:10.1002/ppul.21374
7. de Boer K, Vandemheen KL, Tullis E, et al. Exacerbation frequency and clinical outcomes in adult patients with cystic fibrosis. *Thorax.* 2011;66(8):680-685. doi:10.1136/thx.2011.161117
8. Waters V, Stanojevic S, Atenafu EG, et al. Effect of pulmonary exacerbations on long-term lung function decline in cystic fibrosis. *European Respiratory Journal.* 2012;40(1):61-66. doi:10.1183/09031936.00159111
9. Rommens JM. Cystic Fibrosis Mutation Database. Published April 25, 2011. Accessed January 30, 2021. <http://www.genet.sickkids.on.ca/StatisticsPage.html>
10. Cutting GR. Cystic fibrosis genetics: from molecular understanding to clinical application. *Nat Rev Genet.* 2015;16(1):45-56. doi:10.1038/nrg3849
11. Burke W, Aitken ML, Chen SH, Scott CR. Variable Severity of Pulmonary Disease in Adults with Identical Cystic Fibrosis Mutations. *Chest.* 1992;102(2):506-509. doi:10.1378/chest.102.2.506
12. Kerem E, Kerem B. Genotype-phenotype correlations in cystic fibrosis. *Pediatric Pulmonology.* 1996;22(6):387-395. doi:https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-0496(199612)22:6<387::AID-PPUL7>3.0.CO;2-G
13. Zielenski J. Genotype and phenotype in cystic fibrosis. *Respiration.* 2000;67(2):117-133. doi:10.1159/000029497
14. Kulczycki LL, Kostuch M, Bellanti JA. A clinical perspective of cystic fibrosis and new genetic findings: Relationship of CFTR mutations to genotype-phenotype manifestations. *American Journal of Medical Genetics Part A.* 2003;116A(3):262-267. doi:10.1002/ajmg.a.10886

15. Dugu  peroux I, De Braekeleer M, Participating Centres to the French National Cystic Fibrosis Registry. Genotype-phenotype relationship for five CFTR mutations frequently identified in western France. *J Cyst Fibros.* 2004;3(4):259-263. doi:10.1016/j.jcf.2004.07.004
16. Mekus F, Ballmann M, Bronsveld I, Bijman J, Veeze H, Tümmler B. Categories of Δ F508 homozygous cystic fibrosis twin and sibling pairs with distinct phenotypic characteristics. *twin res.* 2000;3(4):277-293. doi:10.1375/136905200320565256
17. Vanscoy LL, Blackman SM, Collaco JM, et al. Heritability of lung disease severity in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007;175(10):1036-1043. doi:10.1164/rccm.200608-1164OC
18. Collaco JM, Blackman SM, McGready J, Naughton KM, Cutting GR. Quantification of the Relative Contribution of Environmental and Genetic Factors to Variation in Cystic Fibrosis Lung Function. *The Journal of Pediatrics.* 2010;157(5):802-807.e3. doi:10.1016/j.jpeds.2010.05.018
19. Wright FA, Strug LJ, Doshi VK, et al. Genome-wide association and linkage identify modifier loci of lung disease severity in cystic fibrosis at 11p13 and 20q13.2. *Nat Genet.* 2011;43(6):539-546. doi:10.1038/ng.838
20. Corvol H, Blackman SM, Bo  lle PY, et al. Genome-wide association meta-analysis identifies five modifier loci of lung disease severity in cystic fibrosis. *Nat Commun.* 2015;6(1):8382. doi:10.1038/ncomms9382
21. Kopp BT, Ortega-García JA, Sadreameli SC, et al. The Impact of Secondhand Smoke Exposure on Children with Cystic Fibrosis: A Review. *Int J Environ Res Public Health.* 2016;13(10). doi:10.3390/ijerph13101003
22. Blayac M, Coll P, Urbach V, Fanen P, Epaud R, Lanone S. The Impact of Air Pollution on the Course of Cystic Fibrosis: A Review. *Frontiers in Physiology.* 2022;13. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fphys.2022.908230>
23. Collaco JM, McGready J, Green DM, et al. Effect of Temperature on Cystic Fibrosis Lung Disease and Infections: A Replicated Cohort Study. *PLOS ONE.* 2011;6(11):e27784. doi:10.1371/journal.pone.0027784
24. Psoter KJ, De Roos AJ, Wakefield J, Mayer J, Rosenfeld M. Season is associated with *Pseudomonas aeruginosa* acquisition in young children with cystic fibrosis. *Clinical Microbiology and Infection.* 2013;19(11):E483-E489. doi:10.1111/1469-0691.12272
25. Ramsay KA, Stockwell RE, Bell SC, Kidd TJ. Infection in cystic fibrosis: impact of the environment and climate. *Expert Rev Respir Med.* 2016;10(5):505-519. doi:10.1586/17476348.2016.1162715
26. Oates GR, Schechter MS. Socioeconomic status and health outcomes: cystic fibrosis as a model. *Expert Rev Respir Med.* 2016;10(9):967-977. doi:10.1080/17476348.2016.1196140
27. Health Effects Institute. *State of Global Air 2020.*; 2020.

28. Gauderman WJ, Vora H, McConnell R, et al. Effect of exposure to traffic on lung development from 10 to 18 years of age: a cohort study. *The Lancet*. 2007;369(9561):571-577. doi:10.1016/S0140-6736(07)60037-3
29. Rice MB, Ljungman PL, Wilker EH, et al. Short-Term Exposure to Air Pollution and Lung Function in the Framingham Heart Study. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013;188(11):1351-1357.
30. Hwang BF, Chen YH, Lin YT, Wu XT, Leo Lee Y. Relationship between exposure to fine particulates and ozone and reduced lung function in children. *Environmental Research*. 2015;137:382-390. doi:10.1016/j.envres.2015.01.009
31. Paulin L, Hansel N. Particulate air pollution and impaired lung function. *F1000Res*. 2016;5. doi:10.12688/f1000research.7108.1
32. Milanzi EB, Koppelman GH, Smit HA, et al. Air pollution exposure and lung function until age 16 years: the PIAMA birth cohort study. *European Respiratory Journal*. 2018;52(3). doi:10.1183/13993003.00218-2018
33. Raaschou-Nielsen O, Andersen ZJ, Beelen R, et al. Air pollution and lung cancer incidence in 17 European cohorts: prospective analyses from the European Study of Cohorts for Air Pollution Effects (ESCAPE). *The Lancet Oncology*. 2013;14(9):813-822. doi:10.1016/S1470-2045(13)70279-1
34. Sunyer J. Urban air pollution and chronic obstructive pulmonary disease: a review. *European Respiratory Journal*. 2001;17(5):1024-1033.
35. Brunekreef B, Holgate ST. Air pollution and health. *Lancet*. 2002;360(9341):1233-1242. doi:10.1016/S0140-6736(02)11274-8
36. Tiotiu AI, Novakova P, Nedeva D, et al. Impact of Air Pollution on Asthma Outcomes. *Int J Environ Res Public Health*. 2020;17(17):6212. doi:10.3390/ijerph17176212
37. Thurston GD, Balmes JR, Garcia E, et al. Outdoor Air Pollution and New-Onset Airway Disease. An Official American Thoracic Society Workshop Report. *Annals ATS*. 2020;17(4):387-398. doi:10.1513/AnnalsATS.202001-046ST
38. Liu S, Jørgensen JT, Ljungman P, et al. Long-term exposure to low-level air pollution and incidence of asthma: the ELAPSE project. *European Respiratory Journal*. Published online January 1, 2020. doi:10.1183/13993003.030992020
39. Liu S, Jørgensen JT, Ljungman P, et al. Long-term exposure to low-level air pollution and incidence of chronic obstructive pulmonary disease: The ELAPSE project. *Environment International*. 2021;146:106267. doi:10.1016/j.envint.2020.106267
40. HEI Panel on the Health Effects of Long-Term Exposure to Traffic-Related Air Pollution. *Systematic Review and Meta-Analysis of Selected Health Effects of Long-Term Exposure to Traffic-Related Air Pollution*.; 2022. Accessed August 4, 2022. <https://www.healtheffects.org/publication/systematic-review-and-meta-analysis-selected-health-effects-long-term-exposure-traffic>
41. Lu Z, Coll P, Maitre B, Epaud R, Lanone S. Air pollution as an early determinant of COPD. *European Respiratory Review*. 2022;31(165). doi:10.1183/16000617.0059-2022

42. World Health Organization. Ambient (outdoor) air pollution. [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/ambient-\(outdoor\)-air-quality-and-health](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/ambient-(outdoor)-air-quality-and-health). Published 2021.
43. Goss CH, Newsom SA, Schildcrout JS, Sheppard L, Kaufman JD. Effect of ambient air pollution on pulmonary exacerbations and lung function in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004;169(7):816-821. doi:10.1164/rccm.200306-779OC
44. Jassal MS, Yu AM, Bhatia R, Keens TG, Davidson Ward SL. Effect of residential proximity to major roadways on cystic fibrosis exacerbations. *Int J Environ Health Res*. 2013;23(2):119-131. doi:10.1080/09603123.2012.708917
45. Goeminne PC, Kiciński M, Vermeulen F, et al. Impact of air pollution on cystic fibrosis pulmonary exacerbations: a case-crossover analysis. *Chest*. 2013;143(4):946-954. doi:10.1378/chest.12-1005
46. Farhat SCL, Almeida MB, Silva-Filho LVRF, Farhat J, Rodrigues JC, Braga ALF. Ozone is associated with an increased risk of respiratory exacerbations in patients with cystic fibrosis. *Chest*. 2013;144(4):1186-1192. doi:10.1378/chest.12-2414
47. Psoter KJ, De Roos AJ, Mayer JD, Kaufman JD, Wakefield J, Rosenfeld M. Fine Particulate Matter Exposure and Initial *Pseudomonas aeruginosa* Acquisition in Cystic Fibrosis. *Annals ATS*. 2015;12(3):385-391. doi:10.1513/AnnalsATS.201408-400OC
48. Psoter KJ, De Roos AJ, Wakefield J, Mayer JD, Rosenfeld M. Air pollution exposure is associated with MRSA acquisition in young U.S. children with cystic fibrosis. *BMC Pulm Med*. 2017;17(1):106. doi:10.1186/s12890-017-0449-8
49. Geiser M, Quaile O, Wenk A, et al. Cellular uptake and localization of inhaled gold nanoparticles in lungs of mice with chronic obstructive pulmonary disease. *Part Fibre Toxicol*. 2013;10:19. doi:10.1186/1743-8977-10-19
50. Geiser M, Stoeger T, Casaulta M, et al. Biokinetics of nanoparticles and susceptibility to particulate exposure in a murine model of cystic fibrosis. *Part Fibre Toxicol*. 2014;11:19. doi:10.1186/1743-8977-11-19
51. Livraghi-Butrico A, Grubb BR, Kelly EJ, et al. Genetically determined heterogeneity of lung disease in a mouse model of airway mucus obstruction. *Physiol Genomics*. 2012;44(8):470-484. doi:10.1152/physiolgenomics.00185.2011
52. Mall M, Grubb BR, Harkema JR, O'Neal WK, Boucher RC. Increased airway epithelial Na⁺ absorption produces cystic fibrosis-like lung disease in mice. *Nat Med*. 2004;10(5):487-493. doi:10.1038/nm1028
53. Hsia CCW, Hyde DM, Ochs M, Weibel ER. An Official Research Policy Statement of the American Thoracic Society/European Respiratory Society: Standards for Quantitative Assessment of Lung Structure. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010;181(4):394-418. doi:10.1164/rccm.200809-1522ST
54. Crowley G, Kwon S, Caraher EJ, et al. Quantitative lung morphology: semi-automated measurement of mean linear intercept. *BMC Pulm Med*. 2019;19:206. doi:10.1186/s12890-019-0915-6

55. Radermecker C, Hego A, Delvenne P, Marichal T. Identification and Quantitation of Neutrophil Extracellular Traps in Human Tissue Sections. *Bio-protocol*. 2021;11(18):e4159-e4159.
56. Gros V, Sciare J, Yu T. Air-quality measurements in megacities: Focus on gaseous organic and particulate pollutants and comparison between two contrasted cities, Paris and Beijing. *Comptes Rendus Geoscience*. 2007;339(11):764-774. doi:10.1016/j.crte.2007.08.007
57. von der Weiden-Reinmüller SL, Drewnick F, Crippa M, et al. Application of mobile aerosol and trace gas measurements for the investigation of megacity air pollution emissions: the Paris metropolitan area. *Atmos Meas Tech*. 2014;7(1):279-299. doi:10.5194/amt-7-279-2014
58. Baudic A, Gros V, Sauvage S, et al. Seasonal variability and source apportionment of volatile organic compounds (VOCs) in the Paris megacity (France). *Atmos Chem Phys*. 2016;16(18):11961-11989. doi:10.5194/acp-16-11961-2016
59. Sun Y, Jiang Q, Wang Z, et al. Investigation of the sources and evolution processes of severe haze pollution in Beijing in January 2013. *Journal of Geophysical Research: Atmospheres*. 2014;119(7):4380-4398. doi:10.1002/2014JD021641
60. Ji D, Li L, Wang Y, et al. The heaviest particulate air-pollution episodes occurred in northern China in January, 2013: Insights gained from observation. *Atmospheric Environment*. 2014;92:546-556. doi:10.1016/j.atmosenv.2014.04.048
61. Shi Z, Vu T, Kotthaus S, et al. Introduction to the special issue “In-depth study of air pollution sources and processes within Beijing and its surrounding region (APHH-Beijing).” *Atmospheric Chemistry and Physics*. 2019;19(11):7519-7546. doi:10.5194/acp-19-7519-2019
62. Zhang H, Li H, Zhang Q, et al. Atmospheric Volatile Organic Compounds in a Typical Urban Area of Beijing: Pollution Characterization, Health Risk Assessment and Source Apportionment. *Atmosphere*. 2017;8(3):61.
63. Prasetyo A, Sadhana U, Budiman J. Nasal Mucociliary Clearance in Smokers: A Systematic Review. *Int Arch Otorhinolaryngol*. 2021;25(1):e160-e169. doi:10.1055/s-0040-1702965
64. Cohen NA, Zhang S, Sharp DB, et al. Cigarette smoke condensate inhibits transepithelial chloride transport and ciliary beat frequency. *Laryngoscope*. 2009;119(11):2269-2274. doi:10.1002/lary.20223
65. Leopold PL, O'Mahony MJ, Lian XJ, Tilley AE, Harvey BG, Crystal RG. Smoking Is Associated with Shortened Airway Cilia. *PLoS One*. 2009;4(12):e8157. doi:10.1371/journal.pone.0008157
66. Simet SM, Sisson JH, Pavlik JA, et al. Long-Term Cigarette Smoke Exposure in a Mouse Model of Ciliated Epithelial Cell Function. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2010;43(6):635-640. doi:10.1165/rcmb.2009-0297OC
67. Easwaran M, Martinez JD, Ramirez DJ, Gall PA, Erickson-DiRenzo E. Short-term whole body cigarette smoke exposure induces regional differences in cellular response in the mouse larynx. *Toxicol Rep*. 2021;8:920-937. doi:10.1016/j.toxrep.2021.04.007

68. Xiong R, Wu L, Wu Y, et al. Transcriptome analysis reveals lung-specific miRNAs associated with impaired mucociliary clearance induced by cigarette smoke in an in vitro human airway tissue model. *Arch Toxicol*. 2021;95(5):1763-1778. doi:10.1007/s00204-021-03016-0
69. Raju SV, Lin VY, Liu L, et al. The Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Potentiator Ivacaftor Augments Mucociliary Clearance Abrogating Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Inhibition by Cigarette Smoke. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2017;56(1):99-108. doi:10.1165/rcmb.2016-0226OC
70. Lin VY, Kaza N, Birket SE, et al. Excess mucus viscosity and airway dehydration impact COPD airway clearance. *Eur Respir J*. 2020;55(1):1900419. doi:10.1183/13993003.00419-2019
71. Carvalho-Oliveira R, Pires-Neto RC, Bustillos JOV, et al. Chemical composition modulates the adverse effects of particles on the mucociliary epithelium. *Clinics (Sao Paulo)*. 2015;70(10):706-713. doi:10.6061/clinics/2015(10)09
72. Livraghi-Butrico A, Kelly EJ, Klem ER, et al. Mucus clearance, MyD88-dependent and MyD88-independent immunity modulate lung susceptibility to spontaneous bacterial infection and inflammation. *Mucosal Immunol*. 2012;5(4):397-408. doi:10.1038/mi.2012.17
73. Boeltz S, Amini P, Anders HJ, et al. To NET or not to NET:current opinions and state of the science regarding the formation of neutrophil extracellular traps. *Cell Death Differ*. 2019;26(3):395-408. doi:10.1038/s41418-018-0261-x
74. Wooding DJ, Ryu MH, Li H, Alexis NE, Pena O, Carlsten C. Acute air pollution exposure alters neutrophils in never-smokers and at-risk humans. *Eur Respir J*. 2020;55(4):1901495. doi:10.1183/13993003.01495-2019
75. Valderrama A, Ortiz-Hernández P, Agraz-Cibrián JM, et al. Particulate matter (PM10) induces in vitro activation of human neutrophils, and lung histopathological alterations in a mouse model. *Sci Rep*. 2022;12(1):7581. doi:10.1038/s41598-022-11553-6
76. Liu NM, Miyashita L, Sanak M, Barratt B, Grigg J. Prostaglandin E2 and phagocytosis of inhaled particulate matter by airway macrophages in cystic fibrosis. *Journal of Cystic Fibrosis*. Published online 2020:S1569-1993(20)30913-9. doi:10.1016/j.jcf.2020.11.010
77. Romagnani S. Th1/Th2 cells. *Inflamm Bowel Dis*. 1999;5(4):285-294. doi:10.1097/00054725-199911000-00009
78. Benoit M, Desnues B, Mege JL. Macrophage Polarization in Bacterial Infections. *The Journal of Immunology*. 2008;181(6):3733-3739. doi:10.4049/jimmunol.181.6.3733
79. Veckman V, Miettinen M, Matikainen S, et al. Lactobacilli and streptococci induce inflammatory chemokine production in human macrophages that stimulates Th1 cell chemotaxis. *J Leukoc Biol*. 2003;74(3):395-402. doi:10.1189/jlb.0402212
80. Butcher MJ, Zhu J. Recent advances in understanding the Th1/Th2 effector choice. *Fac Rev*. 2021;10:30. doi:10.12703/r/10-30

81. Zeng Z, Lan T, Wei Y, Wei X. CCL5/CCR5 axis in human diseases and related treatments. *Genes Dis.* 2022;9(1):12-27. doi:10.1016/j.gendis.2021.08.004
82. Deiuliis JA, Kampftrath T, Zhong J, et al. Pulmonary T cell activation in response to chronic particulate air pollution. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2012;302(4):L399-L409. doi:10.1152/ajplung.00261.2011
83. Quinton LJ, Nelson S, Zhang P, et al. Selective transport of cytokine-induced neutrophil chemoattractant from the lung to the blood facilitates pulmonary neutrophil recruitment. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology.* 2004;286(3):L465-L472. doi:10.1152/ajplung.00153.2003
84. Petri B, Sanz MJ. Neutrophil chemotaxis. *Cell Tissue Res.* 2018;371(3):425-436. doi:10.1007/s00441-017-2776-8
85. Karpus WJ, Kennedy KJ. MIP-1 α and MCP-1 differentially regulate acute and relapsing autoimmune encephalomyelitis as well as Th1/Th2 lymphocyte differentiation. *Journal of Leukocyte Biology.* 1997;62(5):681-687. doi:10.1002/jlb.62.5.681
86. Tecchio C, Micheletti A, Cassatella MA. Neutrophil-Derived Cytokines: Facts Beyond Expression. *Front Immunol.* 2014;5:508. doi:10.3389/fimmu.2014.00508
87. Kelly FJ, Fussell JC. Size, source and chemical composition as determinants of toxicity attributable to ambient particulate matter. *Atmospheric Environment.* 2012;60:504-526. doi:10.1016/j.atmosenv.2012.06.039
88. Cassee FR, Héroux ME, Gerlofs-Nijland ME, Kelly FJ. Particulate matter beyond mass: recent health evidence on the role of fractions, chemical constituents and sources of emission. *Inhalation Toxicology.* 2013;25(14):802-812. doi:10.3109/08958378.2013.850127
89. Rohr AC, Wyzga RE. Attributing health effects to individual particulate matter constituents. *Atmospheric Environment.* 2012;62:130-152. doi:10.1016/j.atmosenv.2012.07.036
90. Rohr A, McDonald J. Health effects of carbon-containing particulate matter: focus on sources and recent research program results. *Critical Reviews in Toxicology.* 2016;46(2):97-137. doi:10.3109/10408444.2015.1107024
91. Yin G, Wu X, Wu Y, et al. Evaluating carbon content in airway macrophages as a biomarker of personal exposure to fine particulate matter and its acute respiratory effects. *Chemosphere.* 2021;283:131179. doi:10.1016/j.chemosphere.2021.131179
92. Yang Y, Ruan Z, Wang X, et al. Short-term and long-term exposures to fine particulate matter constituents and health: A systematic review and meta-analysis. *Environmental Pollution.* 2019;247:874-882. doi:10.1016/j.envpol.2018.12.060
93. Yang T, Chen R, Gu X, et al. Association of fine particulate matter air pollution and its constituents with lung function: The China Pulmonary Health study. *Environment International.* 2021;156:106707. doi:10.1016/j.envint.2021.106707

94. Schlesinger RB. The Health Impact of Common Inorganic Components of Fine Particulate Matter (PM_{2.5}) in Ambient Air: A Critical Review. *Inhalation Toxicology*. 2007;19(10):811-832. doi:10.1080/08958370701402382
95. Wu Y, Li H, Xu D, et al. Associations of fine particulate matter and its constituents with airway inflammation, lung function, and buccal mucosa microbiota in children. *Science of The Total Environment*. 2021;773:145619. doi:10.1016/j.scitotenv.2021.145619
96. Wang X, Guo Y, Cai M, et al. Constituents of fine particulate matter and asthma in 6 low- and middle-income countries. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2022;150(1):214-222.e5. doi:10.1016/j.jaci.2021.12.779
97. Glencross DA, Ho TR, Camiña N, Hawrylowicz CM, Pfeffer PE. Air pollution and its effects on the immune system. *Free Radic Biol Med*. 2020;151:56-68. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2020.01.179
98. Wiegman CH, Li F, Ryffel B, Togbe D, Chung KF. Oxidative Stress in Ozone-Induced Chronic Lung Inflammation and Emphysema: A Facet of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Front Immunol*. 2020;11:1957. doi:10.3389/fimmu.2020.01957
99. Kelly FJ. Oxidative stress: its role in air pollution and adverse health effects. *Occup Environ Med*. 2003;60(8):612.
100. Yang W, Omaye ST. Air pollutants, oxidative stress and human health. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2009;674(1):45-54. doi:10.1016/j.mrgentox.2008.10.005
101. Mudway IS, Kelly FJ, Holgate ST. Oxidative stress in air pollution research. *Free Radic Biol Med*. 2020;151:2-6. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2020.04.031
102. Gangwar RS, Bevan GH, Palanivel R, Das L, Rajagopalan S. Oxidative stress pathways of air pollution mediated toxicity: Recent insights. *Redox Biology*. 2020;34:101545. doi:10.1016/j.redox.2020.101545
103. Leni Z, Künzi L, Geiser M. Air pollution causing oxidative stress. *Current Opinion in Toxicology*. 2020;20-21:1-8. doi:10.1016/j.cotox.2020.02.006
104. Serban KA, Petrache I. Mouse Models of COPD. In: Alper S, Janssen WJ, eds. *Lung Innate Immunity and Inflammation: Methods and Protocols*. Methods in Molecular Biology. Springer; 2018:379-394. doi:10.1007/978-1-4939-8570-8_25
105. Dagouassat M, Lanone S, Boczkowski J. Interaction of matrix metalloproteinases with pulmonary pollutants. *Eur Respir J*. 2012;39(4):1021-1032. doi:10.1183/09031936.00195811
106. Gharib SA, Manicone AM, Parks WC. Matrix Metalloproteinases in Emphysema. *Matrix Biol*. 2018;73:34-51. doi:10.1016/j.matbio.2018.01.018
107. Gehrig S, Duerr J, Weitnauer M, et al. Lack of neutrophil elastase reduces inflammation, mucus hypersecretion, and emphysema, but not mucus obstruction, in mice with cystic fibrosis-like lung disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2014;189(9):1082-1092. doi:10.1164/rccm.201311-1932OC

108. Nichols DP, Chmiel JF. Inflammation and its genesis in cystic fibrosis. *Pediatric Pulmonology*. 2015;50(S40):S39-S56. doi:10.1002/ppul.23242
109. Xu X, Kherada N, Hong X, et al. Diesel exhaust exposure induces angiogenesis. *Toxicol Lett*. 2009;191(1):57-68. doi:10.1016/j.toxlet.2009.08.006
110. Yang B, Xiao C. PM2.5 exposure significantly improves the exacerbation of A549 tumor-bearing CB17-SCID mice. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2018;60:169-175. doi:10.1016/j.etap.2018.04.025
111. Sun Y, Wang Y, Yuan S, et al. Exposure to PM2.5 via vascular endothelial growth factor relationship: Meta-analysis. *PLoS One*. 2018;13(6):e0198813. doi:10.1371/journal.pone.0198813
112. Bengalli R, Zerboni A, Marchetti S, et al. In vitro pulmonary and vascular effects induced by different diesel exhaust particles. *Toxicology Letters*. 2019;306:13-24. doi:10.1016/j.toxlet.2019.01.017
113. Joško J, Gwóźdź B, Jedrzejowska-Szypułka H, Hendryk S. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its effect on angiogenesis. *Med Sci Monit*. 2000;6(5):1047-1052.
114. McDonald DM. Angiogenesis and remodeling of airway vasculature in chronic inflammation. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;164(10 Pt 2):S39-45. doi:10.1164/ajrccm.164.supplement_2.2106065
115. Paredi P, Barnes PJ. The airway vasculature: recent advances and clinical implications. *Thorax*. 2009;64(5):444-450. doi:10.1136/thx.2008.100032
116. Maloney JP, Gao L. Proinflammatory Cytokines Increase Vascular Endothelial Growth Factor Expression in Alveolar Epithelial Cells. *Mediators Inflamm*. 2015;2015:387842. doi:10.1155/2015/387842
117. Barratt SL, Blythe T, Ourradi K, et al. Effects of hypoxia and hyperoxia on the differential expression of VEGF-A isoforms and receptors in Idiopathic Pulmonary Fibrosis (IPF). *Respir Res*. 2018;19:9. doi:10.1186/s12931-017-0711-x
118. Tirpe AA, Gulei D, Ciortea SM, Crivii C, Berindan-Neagoe I. Hypoxia: Overview on Hypoxia-Mediated Mechanisms with a Focus on the Role of HIF Genes. *Int J Mol Sci*. 2019;20(24):6140. doi:10.3390/ijms20246140
119. Xu Y, Kong X, Li J, et al. Mild Hypoxia Enhances the Expression of HIF and VEGF and Triggers the Response to Injury in Rat Kidneys. *Front Physiol*. 2021;12:690496. doi:10.3389/fphys.2021.690496
120. Choi YK, Kim CK, Lee H, et al. Carbon monoxide promotes VEGF expression by increasing HIF-1alpha protein level via two distinct mechanisms, translational activation and stabilization of HIF-1alpha protein. *J Biol Chem*. 2010;285(42):32116-32125. doi:10.1074/jbc.M110.131284
121. Wang M, Aaron CP, Madrigano J, et al. Association Between Long-term Exposure to Ambient Air Pollution and Change in Quantitatively Assessed Emphysema and Lung Function. *JAMA*. 2019;322(6):546-556. doi:10.1001/jama.2019.10255

122. Tripathy S, Marsland AL, Kinnee EJ, et al. Long-Term Ambient Air Pollution Exposures and Circulating and Stimulated Inflammatory Mediators in a Cohort of Midlife Adults. *Environmental Health Perspectives*. 2021;129(5):057007. doi:10.1289/EHP7089
123. Kress S, Wigmann C, Zhao Q, et al. Chronic air pollution-induced subclinical airway inflammation and polygenic susceptibility. *Respiratory Research*. 2022;23(1):265. doi:10.1186/s12931-022-02179-3
124. Happonen MS, Salonen RO, Hälinen AI, et al. Dose and Time Dependency of Inflammatory Responses in the Mouse Lung to Urban Air Coarse, Fine, and Ultrafine Particles From Six European Cities. *Inhalation Toxicology*. 2007;19(3):227-246. doi:10.1080/08958370601067897
125. Forastiere L, Carugno M, Baccini M. Assessing short-term impact of PM10 on mortality using a semiparametric generalized propensity score approach. *Environmental Health*. 2020;19(1):46. doi:10.1186/s12940-020-00599-6
126. Kodavanti UP, Mebane R, Ledbetter A, et al. Variable pulmonary responses from exposure to concentrated ambient air particles in a rat model of bronchitis. *Toxicol Sci*. 2000;54(2):441-451. doi:10.1093/toxsci/54.2.441
127. Saldiva PHN, Clarke RW, Coull BA, et al. Lung Inflammation Induced by Concentrated Ambient Air Particles Is Related to Particle Composition. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;165(12):1610-1617. doi:10.1164/rccm.2106102
128. Smith KR, Kim S, Recendez JJ, et al. Airborne particles of the California central valley alter the lungs of healthy adult rats. *Environ Health Perspect*. 2003;111(7):902-908. doi:10.1289/ehp.5964
129. Kodavanti UP, Schladweiler MC, Ledbetter AD, et al. Consistent Pulmonary and Systemic Responses from Inhalation of Fine Concentrated Ambient Particles: Roles of Rat Strains Used and Physicochemical Properties. *Environmental Health Perspectives*. 2005;113(11):1561-1568. doi:10.1289/ehp.7868
130. Harkema JR, Keeler G, Wagner J, et al. Effects of concentrated ambient particles on normal and hypersecretory airways in rats. *Res Rep Health Eff Inst*. 2004;(120):1-68; discussion 69-79.
131. Harkema JR, Wagner JG, Kaminski NE, et al. Effects of concentrated ambient particles and diesel engine exhaust on allergic airway disease in Brown Norway rats. *Res Rep Health Eff Inst*. 2009;(145):5-55.
132. Wagner JG, Morishita M, Keeler GJ, Harkema JR. Divergent effects of urban particulate air pollution on allergic airway responses in experimental asthma: a comparison of field exposure studies. *Environ Health*. 2012;11:45. doi:10.1186/1476-069X-11-45
133. Happonen MS, Hirvonen MR, Hälinen AI, et al. Chemical Compositions Responsible for Inflammation and Tissue Damage in the Mouse Lung by Coarse and Fine Particulate Samples from Contrasting Air Pollution in Europe. *Inhalation Toxicology*. 2008;20(14):1215-1231. doi:10.1080/08958370802147282

134. Happonen MS, Hirvonen MR, Hälinen AI, et al. Seasonal variation in chemical composition of size-segregated urban air particles and the inflammatory activity in the mouse lung. *Inhalation Toxicology*. 2010;22(1):17-32. doi:10.3109/08958370902862426
135. Amini H, Trang Nhung NT, Schindler C, et al. Short-term associations between daily mortality and ambient particulate matter, nitrogen dioxide, and the air quality index in a Middle Eastern megacity. *Environmental Pollution*. 2019;254:113121. doi:10.1016/j.envpol.2019.113121
136. Samoli E, Touloumi G, Zanobetti A, et al. Investigating the dose-response relation between air pollution and total mortality in the APHEA-2 multicity project. *Occupational and Environmental Medicine*. 2003;60(12):977-982. doi:10.1136/oem.60.12.977
137. Crouse DL, Peters PA, van Donkelaar A, et al. Risk of Nonaccidental and Cardiovascular Mortality in Relation to Long-term Exposure to Low Concentrations of Fine Particulate Matter: A Canadian National-Level Cohort Study. *Environ Health Perspect*. 2012;120(5):708-714. doi:10.1289/ehp.1104049
138. Cesaroni G, Badaloni C, Gariazzo C, et al. Long-Term Exposure to Urban Air Pollution and Mortality in a Cohort of More than a Million Adults in Rome. *Environmental Health Perspectives*. 2013;121(3):324. doi:10.1289/ehp.1205862
139. Livraghi-Butrico A, Kelly EJ, Wilkinson KJ, et al. Loss of Cftr function exacerbates the phenotype of Na⁺-hyperabsorption in murine airways. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2013;304(7):L469-L480. doi:10.1152/ajplung.00150.2012
140. Cantin AM, Hanrahan JW, Bilodeau G, et al. Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Function Is Suppressed in Cigarette Smokers. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006;173(10):1139-1144. doi:10.1164/rccm.200508-1330OC
141. Qu F, Qin XQ, Cui YR, et al. Ozone stress down-regulates the expression of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in human bronchial epithelial cells. *Chem Biol Interact*. 2009;179(2-3):219-226. doi:10.1016/j.cbi.2008.10.059
142. Shi R, Su WW, Zhu ZT, et al. Regulation effects of naringin on diesel particulate matter-induced abnormal airway surface liquid secretion. *Phytomedicine*. 2019;63:153004. doi:10.1016/j.phymed.2019.153004
143. Nguyen JP, Huff RD, Cao QT, Tiessen N, Carlsten C, Hirota JA. Effects of environmental air pollutants on CFTR expression and function in human airway epithelial cells. *Toxicology in Vitro*. 2021;77:105253. doi:10.1016/j.tiv.2021.105253
144. Stermann T, Nguyen T, Stahlmecke B, et al. Carbon nanoparticles adversely affect CFTR expression and toxicologically relevant pathways. *Sci Rep*. 2022;12:14255. doi:10.1038/s41598-022-18098-8
145. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. *Some Non-Heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Some Related Exposures*. International Agency for Research on Cancer; 2010.

146. International Agency for Research on Cancer. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans Volume 95 Household Use of Solid Fuels and High-Temperature Frying.*; 2010. Accessed August 6, 2022. <https://publications.iarc.fr/Book-And-Report-Series/Iarc-Monographs-On-The-Identification-Of-Carcinogenic-Hazards-To-Humans/Household-Use-Of-Solid-Fuels-And-High-temperature-Frying-2010>
147. Mallah MA, Changxing L, Mallah MA, et al. Polycyclic aromatic hydrocarbon and its effects on human health: An overview. *Chemosphere.* 2022;296:133948. doi:10.1016/j.chemosphere.2022.133948
148. Weisburger EK. Carcinogenicity studies on halogenated hydrocarbons. *Environ Health Perspect.* 1977;21:7-16. doi:10.1289/ehp.77217
149. Lee NW, Wang HY, Du CL, et al. Air-polluted environmental heavy metal exposure increase lung cancer incidence and mortality: A population-based longitudinal cohort study. *Sci Total Environ.* 2022;810:152186. doi:10.1016/j.scitotenv.2021.152186
150. Valavanidis A, Vlachogianni T, Fiotakis K, Loridas S. 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.* 2013;10(9):3886-3907. doi:10.3390/ijerph10093886
151. Nassan FL, Wang C, Kelly RS, et al. Ambient PM_{2.5} species and ultrafine particle exposure and their differential metabolomic signatures. *Environ Int.* 2021;151:106447. doi:10.1016/j.envint.2021.106447
152. Chen H, Oliver BG, Pant A, et al. Effects of air pollution on human health – Mechanistic evidence suggested by in vitro and in vivo modelling. *Environmental Research.* 2022;212:113378. doi:10.1016/j.envres.2022.113378

2 Partie 2 : Effets d'une exposition à des atmosphères urbaines réalistes sur le modèle $Cftr^{tmIEUR}$

Les résultats présentés dans cette seconde partie sont consacrés au deuxième modèle d'étude, le modèle $Cftr^{tmIEUR}$. Nous proposons d'étudier dans ce modèle l'impact d'une exposition à différentes atmosphères urbaines réalistes sur le développement d'un phénotype pulmonaire de mucoviscidose. Les résultats présentés ici feront l'objet de la publication d'un second article.

Dans l'ensemble des figures qui suit, les atmosphères sont dénommées selon la nomenclature suivante : Paris-S pour Paris été, Beijing-S pour Pékin été (Beijing-S₁, Beijing-S₂ et Beijing-S₃ première, deuxième et troisième simulation respectivement) et Beijing-W pour Pékin hiver (Beijing-W₁ et Beijing-W₂ première et deuxième simulation respectivement).

2.1 Analyses physico-chimiques

La Figure 31 présente la composition chimique des atmosphères urbaines simulées auxquelles ont été exposées les souris $Cftr^{tmIEUR}$. La concentration totale de polluants gazeux et particulaires est graduelle entre les atmosphères Paris-S, Beijing-S et Beijing-W. Ainsi, l'atmosphère la moins polluée (Paris-S) est constituée de 25 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ de particules, d'une vingtaine de $\mu\text{g}/\text{m}^3$ de NO_2 , d'environ 200 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ de CO et 100 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ de COV. Au contraire, les concentrations de particules, NO_2 , SO_2 et COV ont atteint respectivement un maximum de 200, 50, 90 et 400 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ dans les atmosphères Beijing-W. Une analyse plus fine de la composition chimique montre que ces atmosphères sont caractérisées par une contribution dominante du sulfate et de l'ammonium dans la composition des aérosols. Les atmosphères Paris-S et Beijing-S₁ se démarquent par une contribution plus importante de la fraction de carbone organique alors que l'atmosphère Beijing-W₂ se caractérise par une part plus importante de nitrates. Les COV sont constitués dans la plupart des cas d'une majorité d'alcane à l'exception de l'atmosphère Beijing-W₂ pour laquelle plus de la moitié des COV sont des hydrocarbures aromatiques. Les parts d'alcènes, d'alcyne et de composés oxygénés apparaissent relativement constantes au cours des différentes simulations.

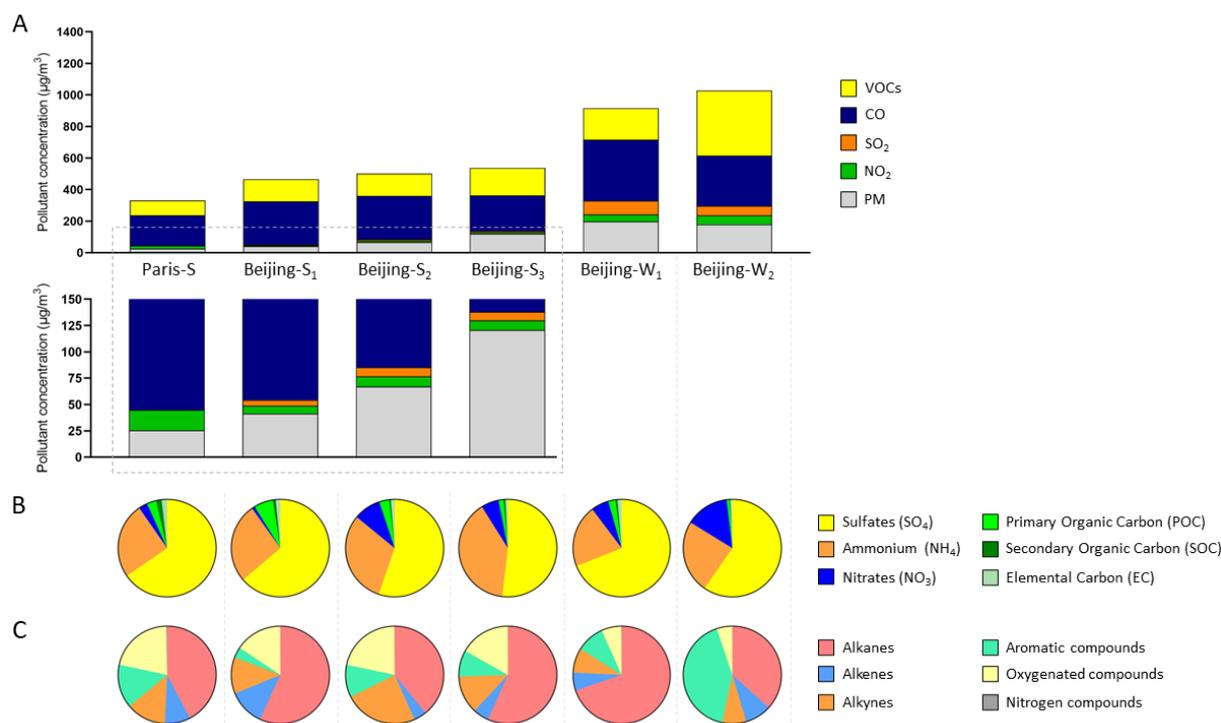


Figure 31 Composition chimique des atmosphères urbaines simulées auxquelles ont été exposées les souris de la lignée *Cftr^{tm1EUR}*. (A) Concentrations totales de polluants gazeux et particulaires. (B) Composition chimique des particules. (C) Composition chimique des COV. Chaque part des diagrammes circulaires représente la contribution, en pourcentage de la masse, de l'élément ou de la famille chimique dans la composition totale des particules et des COV.

2.2 Étude de l'expression des mucines

Afin de déterminer si une exposition à des atmosphères urbaines pouvait avoir un impact sur la sécrétion du mucus, l'expression génique et protéique des mucines MUC5AC et MUC5B a été étudiée dans les broyats de poumons provenant de souris WT et *Cftr^{tm1EUR}* exposées ou non la pollution. Il n'apparaît aucune modification significative de l'expression des gènes *Muc5ac* et *Muc5b* ainsi que des protéines MUC5AC et MUC5B à la suite d'une exposition de souris WT et *Cftr^{tm1EUR}* à des atmosphères urbaines (Figure 32). Cependant, nous avons pu constater une tendance à la diminution de l'expression de *Muc5ac* chez les souris WT exposées aux atmosphères Beijing-S₂ et Beijing-W₂ et une tendance à l'augmentation de l'expression de *Muc5b* chez les souris WT exposées à l'atmosphère Paris-S. Au niveau protéique, une exposition des souris WT à l'atmosphère Beijing-W₂ tend à augmenter l'expression des deux mucines MUC5AC et MUC5B. En ce qui concerne les souris *Cftr^{tm1EUR}*, les 4 atmosphères étudiées pourraient stimuler l'expression de *Muc5ac* avec un effet plus important de l'atmosphère Beijing-S₂ quand seule une exposition à l'atmosphère Paris-S pourrait stimuler l'expression de *Muc5b*. L'expression protéique de MUC5AC et MUC5B chez les souris

Cftr^{tm1EUR} a plutôt tendance à diminuer en réponse à une exposition aux différentes atmosphères urbaines considérées à l'exception de l'atmosphère Beijing-W₂.

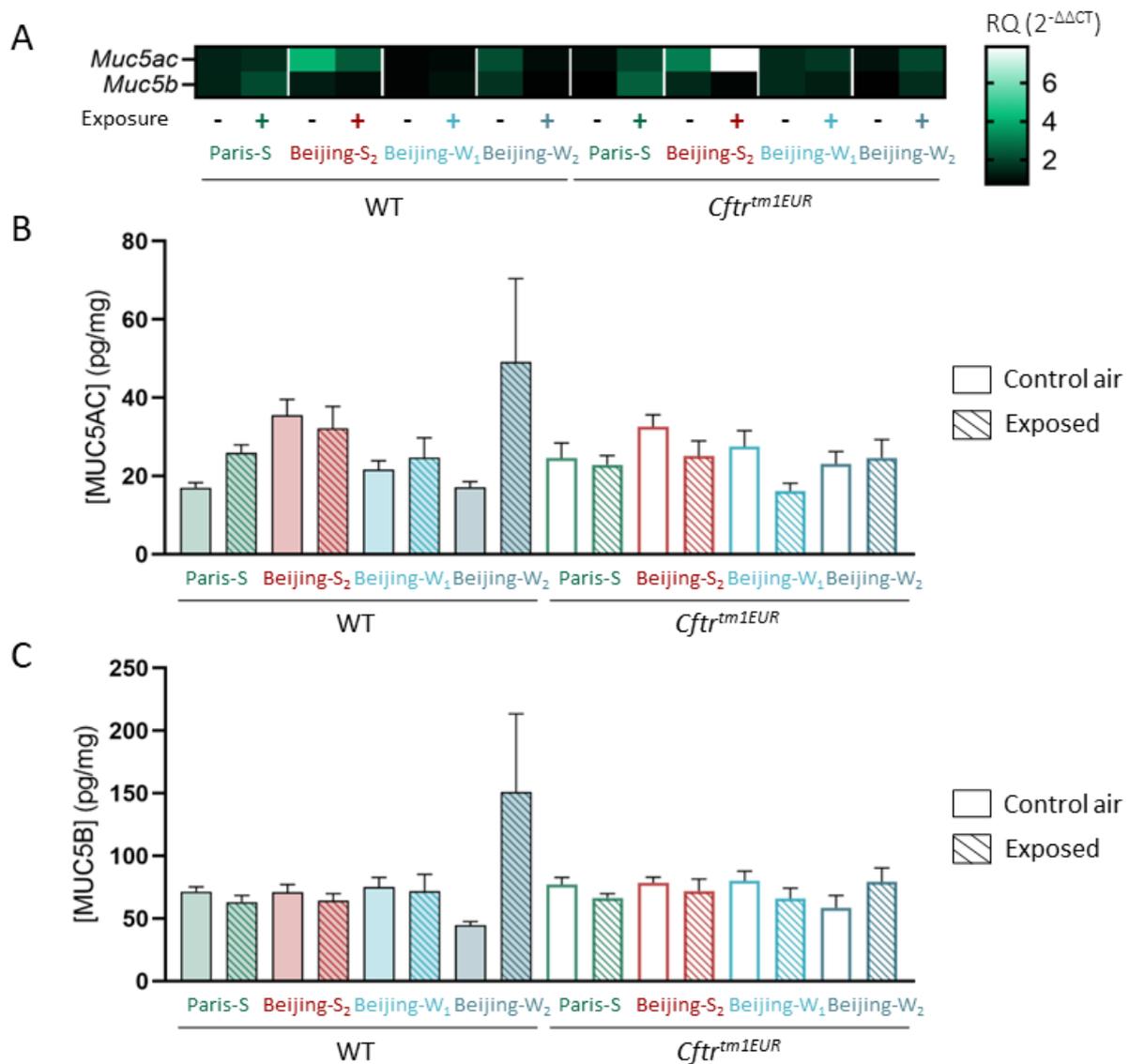


Figure 32 Expression des mucines dans les poumons de souris WT et *Cftr^{tm1EUR}* exposées à différents types d'atmosphères urbaines. **(A)** Expression génique des mucines *Muc5ac* et *Muc5b*. L'expression des gènes a été quantifiée par la méthode du $2^{-\Delta\Delta CT}$ en considérant le gène *Hprt* comme gène de ménage. n = 4-6 souris par groupe. **(B)** Expression protéique de MUC5AC. **(C)** Expression protéique de MUC5B. Les mucines ont été dosées par la méthode ELISA dans les surnageants de broyats de poumons. Leur concentration en pg/mL a été rapportée à la quantité totale de protéines dosées dans le poumon pour ainsi être exprimée en pg/mg de protéines. n = 4-6 souris par groupe.

2.3 Analyse de la réponse inflammatoire

Afin d'évaluer l'induction d'une réponse inflammatoire à la suite d'une exposition à des atmosphères urbaines, des lavages bronchoalvéolaires (LBA) ont été réalisés chez toutes les souris. L'analyse de la cellularité des LBA n'a pas permis de mettre en évidence de variation significative du nombre total de cellules dans les LBA bien qu'une tendance à l'augmentation ait pu être observée uniquement chez les souris *Cftr^{tm1EUR}* exposées à l'atmosphère Beijing-W₁ (Figure 33). La nature de l'infiltrat inflammatoire n'a lui non plus pas été modifié à l'exception des souris *Cftr^{tm1EUR}* exposées à l'atmosphère Beijing-W₁ chez qui la proportion de lymphocytes a diminué au profit de celle des neutrophiles. Cette proportion de lymphocytes dans les LBA des souris *Cftr^{tm1EUR}* semble aussi diminuer mais de manière non significative après une exposition aux atmosphères Paris-S et Beijing-S₂. Chez les souris WT, l'atmosphère Beijing-S₂ pourrait augmenter la proportion de lymphocytes et de neutrophiles.

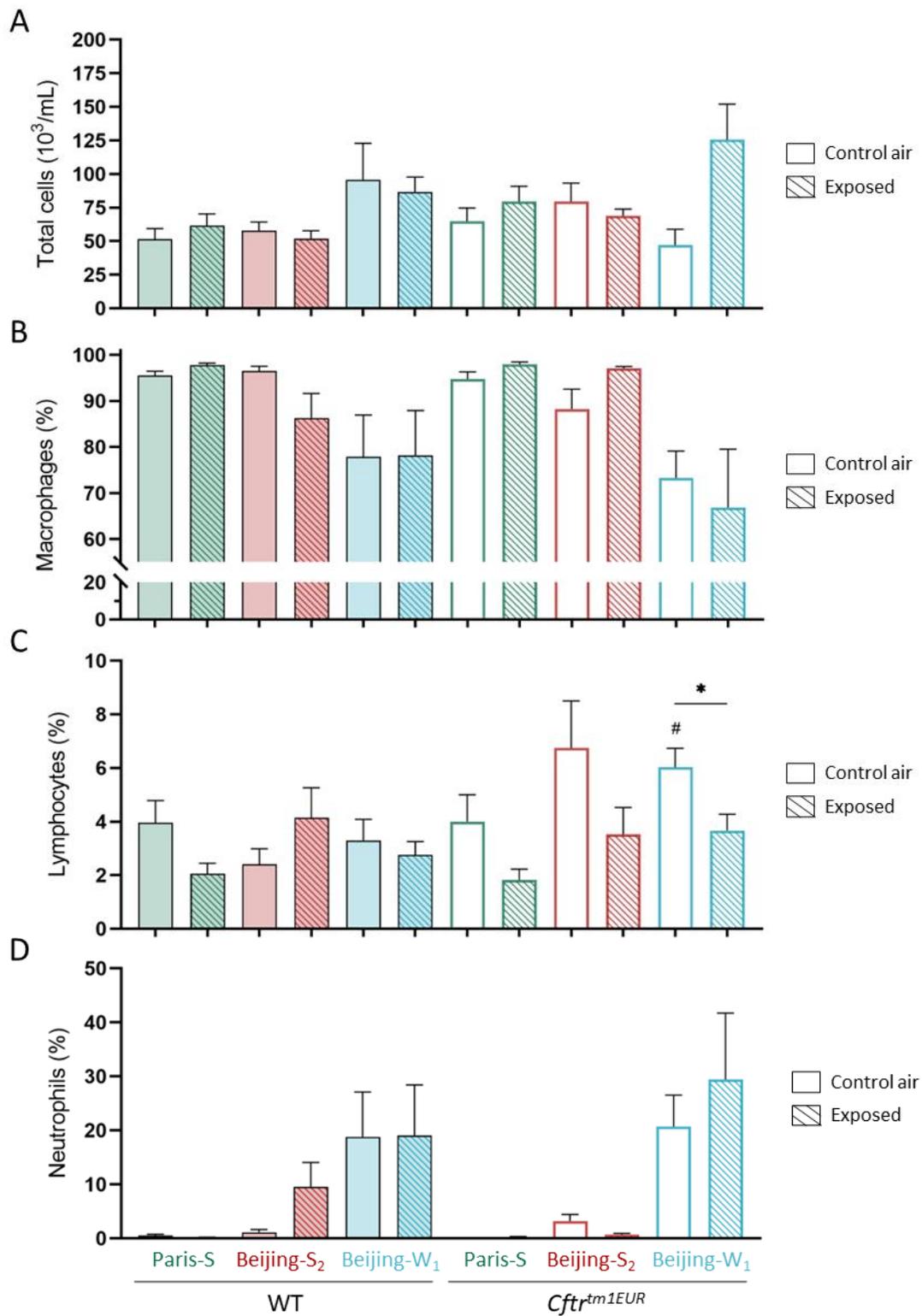


Figure 33 Analyse de la cellularité des lavages bronchoalvéolaires de souris WT et *Cftr^{tm1EUR}* exposées à différents types d'atmosphères urbaines. Cellularité totale (A) et pourcentages de macrophages (B), de lymphocytes (C) et de neutrophiles (D) dans les LBA de souris WT et de souris *Cftr^{tm1EUR}* témoins et exposées aux atmosphères Paris-S, Beijing-S₂ et Beijing-W₁. # $p < 0.05$ en comparaison au souris WT ; * $p < 0.05$ en comparaison aux souris exposées à une atmosphère contrôle. $n = 4-6$ souris par groupe.

Un dosage des cytokines pro-inflammatoires a ensuite été réalisé sur les LBA de toutes les souris (Figure 34). De manière intéressante, on observe une diminution significative des niveaux de plus de la moitié des cytokines dosées chez les souris WT exposées à une atmosphère Paris-S par rapport aux souris exposées à une atmosphère contrôle. Au contraire, chez les souris *Cftr^{tm1EUR}* exposées à cette même atmosphère, la tendance est plutôt à l'augmentation des niveaux de cytokines pro-inflammatoires à l'exception de VEGF dont les niveaux sont significativement diminués. Une exposition aux atmosphères Beijing-S₁ et Beijing-S₂ semble avoir des effets similaires chez les souris *Cftr^{tm1EUR}* quant à une possible stimulation de la sécrétion cytokinique. Toutefois, une exposition à l'atmosphère Beijing-S₂ induit une augmentation significative d'IFN γ ce qui n'est pas le cas avec une exposition à l'atmosphère Beijing-S₁. Une exposition à ces deux types d'atmosphères ne semble pas avoir d'effet spécifique chez les souris WT mise à part sur la sécrétion de G-CSF après une exposition à l'atmosphère Beijing-S₂. Une exposition à l'atmosphère Beijing-S₃ semble quant à elle augmenter les niveaux d'IL13 et diminuer ceux d'IFN γ de façon commune aux souris WT et *Cftr^{tm1EUR}*. Bien que les variations observées ne soient pas significatives, une exposition à l'atmosphère Beijing-W₁ semble entraîner une augmentation des niveaux de la plupart des cytokines chez les souris *Cftr^{tm1EUR}*. La stimulation de la sécrétion cytokinique à la suite d'une exposition à l'atmosphère Beijing-W₁ semble être beaucoup moins marquée chez les souris WT. Enfin, la sécrétion de la cytokine anti-inflammatoire IL-10 tend à augmenter chez les souris *Cftr^{tm1EUR}* toutes simulations confondues alors qu'elle ne paraît pas être affectée chez les souris WT excepté à la suite d'une exposition à une atmosphère Paris-S.

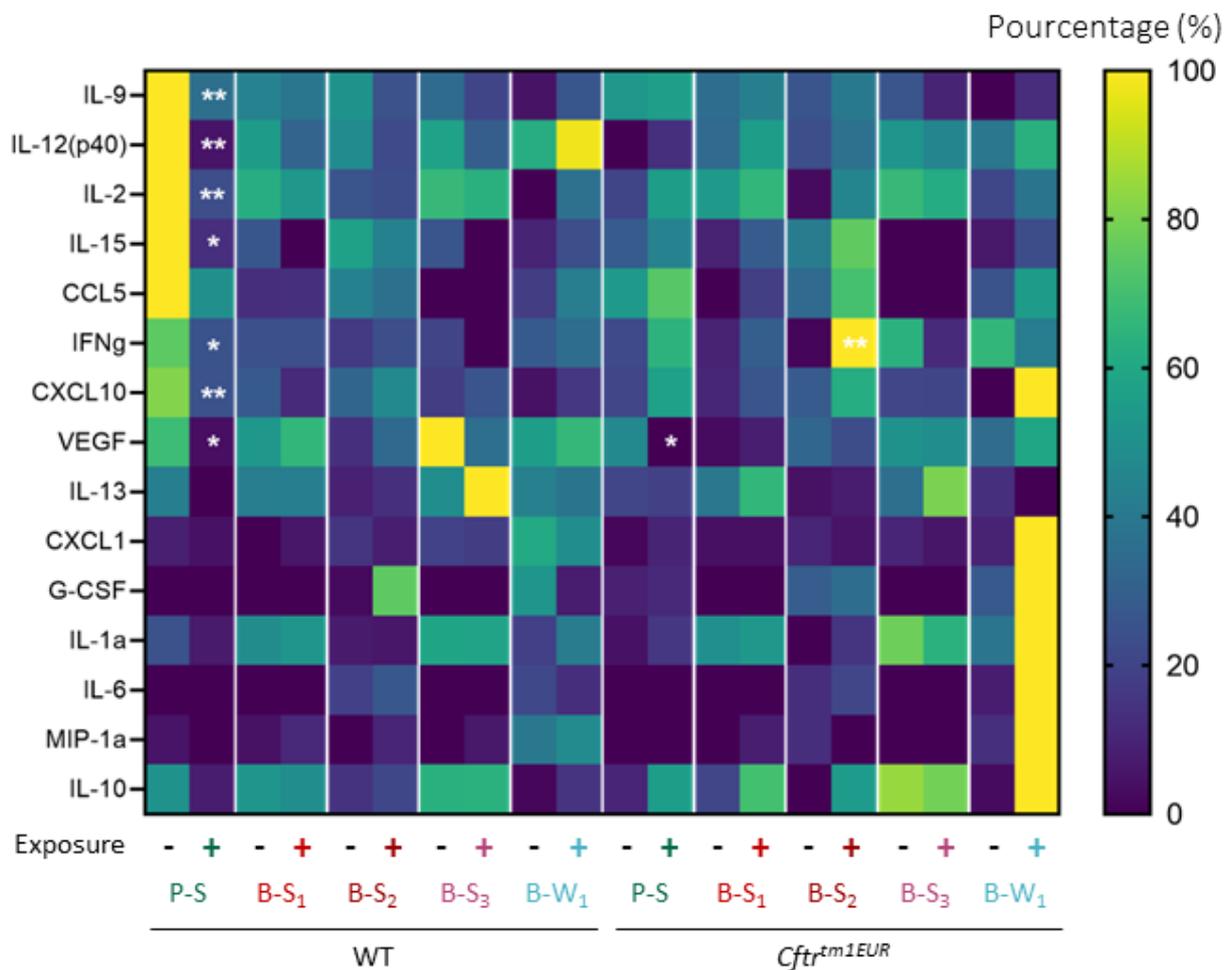


Figure 34 Profil de sécrétion cytokinique de souris WT et *Cfr^{tm1EUR}* exposées à différents types d'atmosphères urbaines. Les cytokines ont été dosées dans les surnageants de LBA par la technique du Luminex et les concentrations sont exprimées en pg/mL. La carte de chaleur a été générée à partir des valeurs de dosage normalisées et exprimées en pourcentages avec, pour chaque cytokine, 0% défini comme la petite plus valeur de dosage et 100% défini comme la plus grande valeur de dosage. * $p < 0.05$ et ** $p < 0.01$ en comparaison avec les souris exposées à une atmosphère contrôle. $n = 4-6$ souris par groupe.

2.4 Analyse de marqueurs du stress oxydant

Afin de déterminer si une exposition à des atmosphères urbaines pourrait modifier le statut oxydatif des individus, les expressions de la myéloperoxydase (MPO), une enzyme dont l'activité participe à la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO), et de la glutathion peroxydase (GPX1), une enzyme impliquée dans les défenses antioxydantes, ont été étudiées. Les analyses n'ont pas permis de montrer de modification significative de l'expression de la MPO et de la GPX1 chez les souris exposées aux atmosphères urbaines par rapport aux souris exposées à une atmosphère contrôle (Figure 35). Néanmoins, l'expression de la MPO tend à diminuer chez les souris WT exposées aux atmosphères Paris-s et Beijing-S₂ et semble

s'accompagner d'une augmentation non significative de l'expression de la GPX1. Au contraire, l'expression de la MPO pourrait être stimulée chez les souris *Cftr^{tm1EUR}* exposées à l'atmosphère Paris-S ainsi que chez les souris WT et les souris *Cftr^{tm1EUR}* à la suite d'une exposition à l'atmosphère Beijing-S₁ sans modification apparente de l'expression de la GPX1. Cette tendance à l'augmentation de l'expression de la MPO peut être mise en relation avec l'augmentation de la proportion des neutrophiles chez ces mêmes souris.

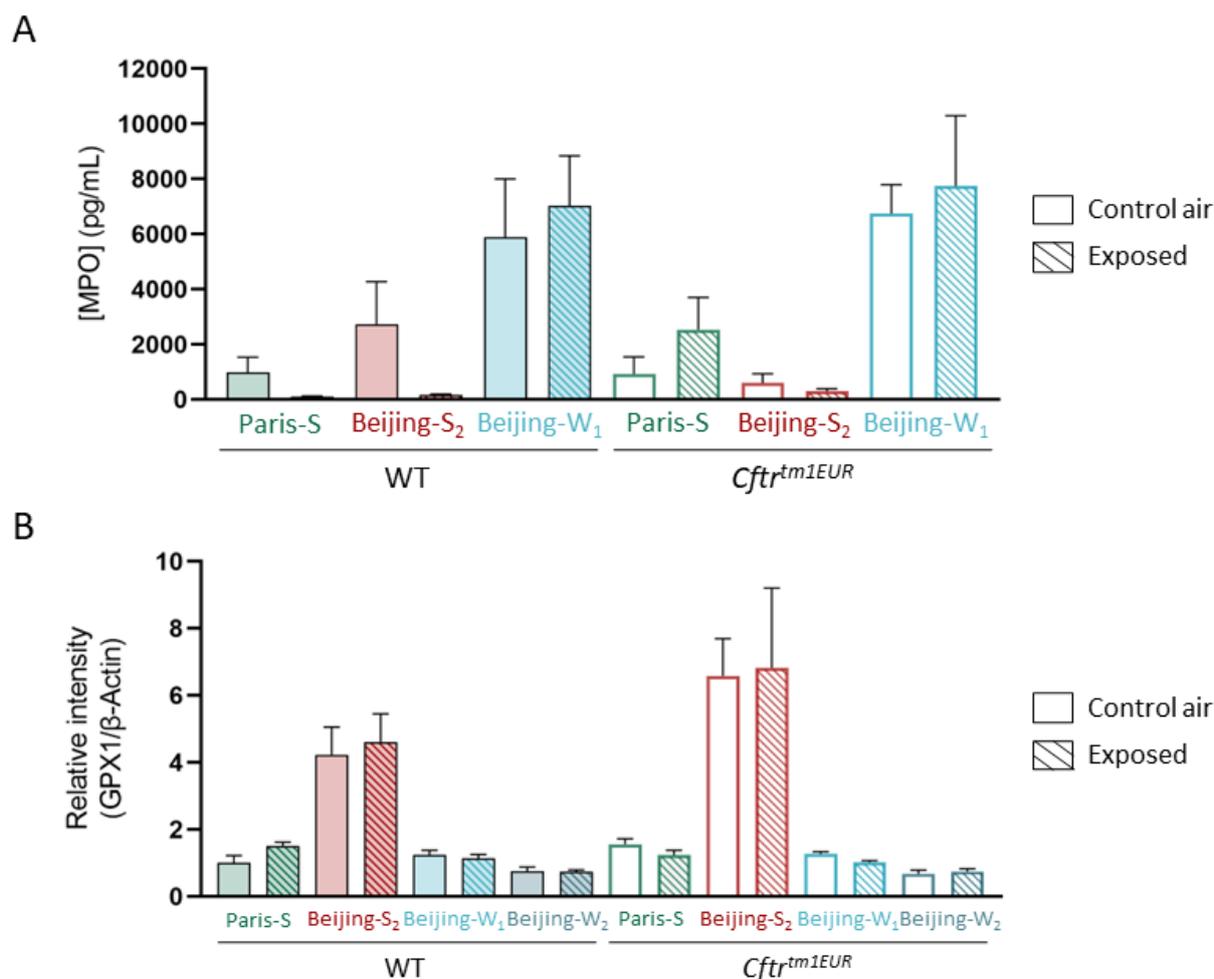


Figure 35 Mesure de marqueurs du stress oxydant chez des souris exposées à des différents types d'atmosphères urbaines. **(A)** Dosage de la myéloperoxydase (MPO) dans les surnageants de LBA de souris WT et de souris *Cftr^{tm1EUR}* exposées ou non aux atmosphères Paris-S, Beijing-S₂, Beijing-W₁ et Beijing-W₂. n = 4-5 souris par groupe. Le dosage a été réalisé par la méthode de l'ELISA et la concentration est exprimée en pg/mL. **(B)** Expression de la glutathion peroxydase 1 (GPX1) dans les surnageants de broyats de poumons de souris WT et de souris *Cftr^{tm1EUR}* exposées à différents types d'atmosphères urbaines. L'expression de la GPX1 a été analysée par Western Blot et quantifiée relativement à la β-actine utilisée comme protéine de référence. n = 4-6 souris par groupe.

2.5 Analyse du remodelage pulmonaire

L'analyse morphométrique des poumons de souris a été réalisée par la mesure de l'intercept linéaire moyen ou MLI. A titre d'exemple, des observations histologiques provenant de souris WT et *Cftr^{tm1EUR}* exposées à une atmosphère contrôle ou exposées à l'atmosphère Beijing-S₂ sont présentées en Figure 36A. La quantification du MLI est présentée en Figure 36B. Aucune variation du MLI n'a pu être observée après exposition à chacune des atmosphères urbaines étudiées tant chez les souris WT que chez les souris *Cftr^{tm1EUR}*.

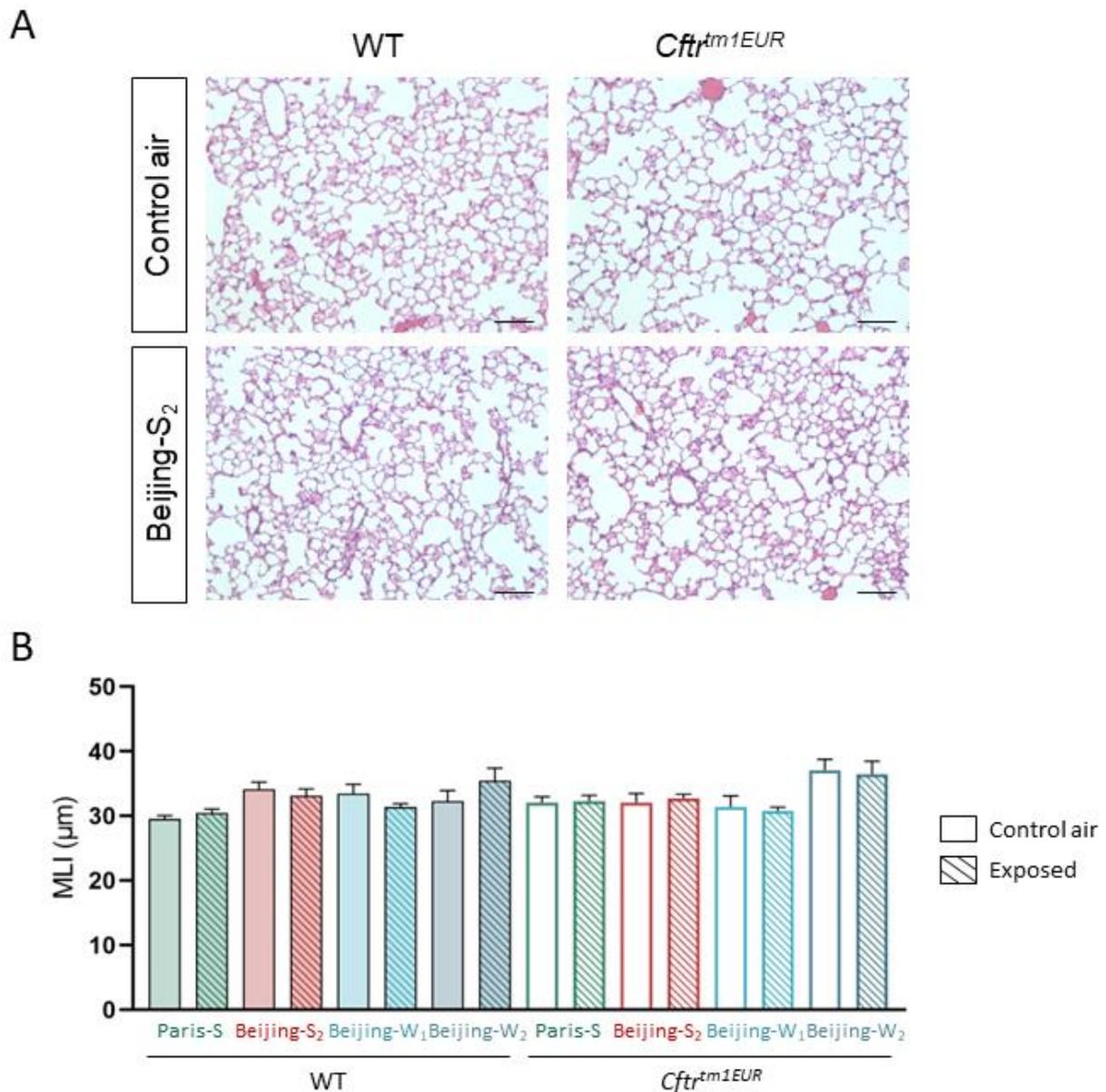


Figure 36 Analyse morphométrique réalisée chez des souris exposées à différents types d’atmosphères urbaines. **(A)** Photos histologiques des régions alvéolaires de poumons provenant de souris WT et *Cfr^{tm1EUR}* exposées à une atmosphère contrôle et exposées à l’atmosphère Beijing-S₂. Barre d’échelle = 100 μm. **(B)** Mesure de l’intercept linéaire moyen (MLI) dans les poumons de souris WT et *Cfr^{tm1EUR}* témoins et exposées à différents types d’atmosphères urbaines. n = 4-6 souris par groupe.

Dans un second temps, l’expression protéique de protéases impliquées dans le remodelage pulmonaire telles que l’élastase des neutrophiles (ELANE) ainsi que les métalloprotéases matricielles 9 et 12 (MMP9 et MMP12) a été quantifiée (Figure 37). Aucune variation significative du niveau d’ELANE n’a pu être observée quelle que soit l’atmosphère considérée tant chez les individus WT que chez les individus *Cfr^{tm1EUR}* (Figure 37A).

L'atmosphère Beijing-W₁ semble cependant augmenter de manière non significative les niveaux d'ELANE chez les souris WT et *Cftr*^{tm1EUR}. D'autre part, si l'expression de MMP9 n'a pas été modifiée à la suite d'une exposition à l'ensemble des atmosphères urbaines étudiées, l'expression de MMP12 augmente significativement après exposition à l'atmosphère Beijing-W₁ et tend à augmenter en réponse à une exposition à l'atmosphère Beijing-S₂ chez les 2 génotypes de souris (Figure 37B).

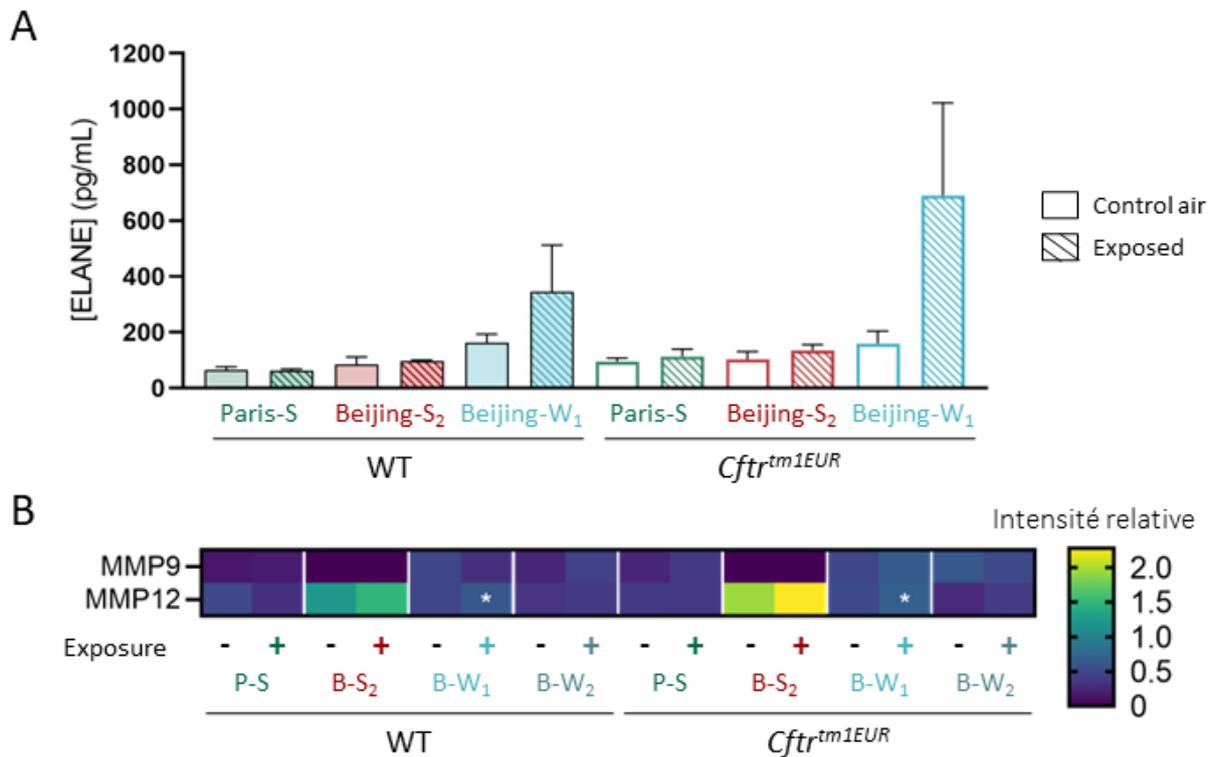


Figure 37 Analyse de l'expression de protéases impliquées dans le remodelage pulmonaire à la suite d'une exposition à différents types d'atmosphères urbaines. **(A)** Dosage de l'élastase des neutrophiles (ELANE) dans les surnageants de LBA de souris WT et *Cftr*^{tm1EUR} exposées à une atmosphère contrôle et exposées à différents types d'atmosphères urbaines. Le dosage a été réalisé par la technique de l'ELISA et la concentration est exprimée en pg/mL. **(B)** Expression des métalloprotéases matricielles 9 et 12 (MMP9 et MMP12) dans les surnageants de broyats de poumons de souris WT et *Cftr*^{tm1EUR} exposées à une atmosphère contrôle et exposées à différents types d'atmosphères urbaines. L'expression des MMP a été analysée par Western Blot et quantifiée relativement à la β -actine utilisée comme protéine de référence. Cette quantification relative a été utilisée pour générer la carte de chaleur. * $p < 0.05$ en comparaison avec les souris exposées à une atmosphère contrôle. $n = 4-6$ souris par groupe.

2.6 Étude la fonction pulmonaire

La fonction pulmonaire a été étudiée grâce au système flexiVentTM. Les paramètres de volume pulmonaire, compliance statique, élastance tissulaire et résistance du système respiratoire des souris *Cftr^{tm1EUR}* témoins ne diffèrent pas statistiquement de ceux des souris WT témoins indiquant que la fonction pulmonaire basale n'est pas altérée chez ces souris (Figure 38). Seule une exposition à l'atmosphère Beijing-S₂ a entraîné, chez les souris WT uniquement, une diminution significative du volume pulmonaire et de la compliance statique associée à une augmentation significative de l'élastance tissulaire (Figure 38). Ce schéma de variation semble être retrouvé chez les souris *Cftr^{tm1EUR}* sans que la significativité ne soit atteinte. En revanche, une augmentation de la résistance du système respiratoire après exposition à l'atmosphère Beijing-S₂ a été observée uniquement chez les souris *Cftr^{tm1EUR}*.

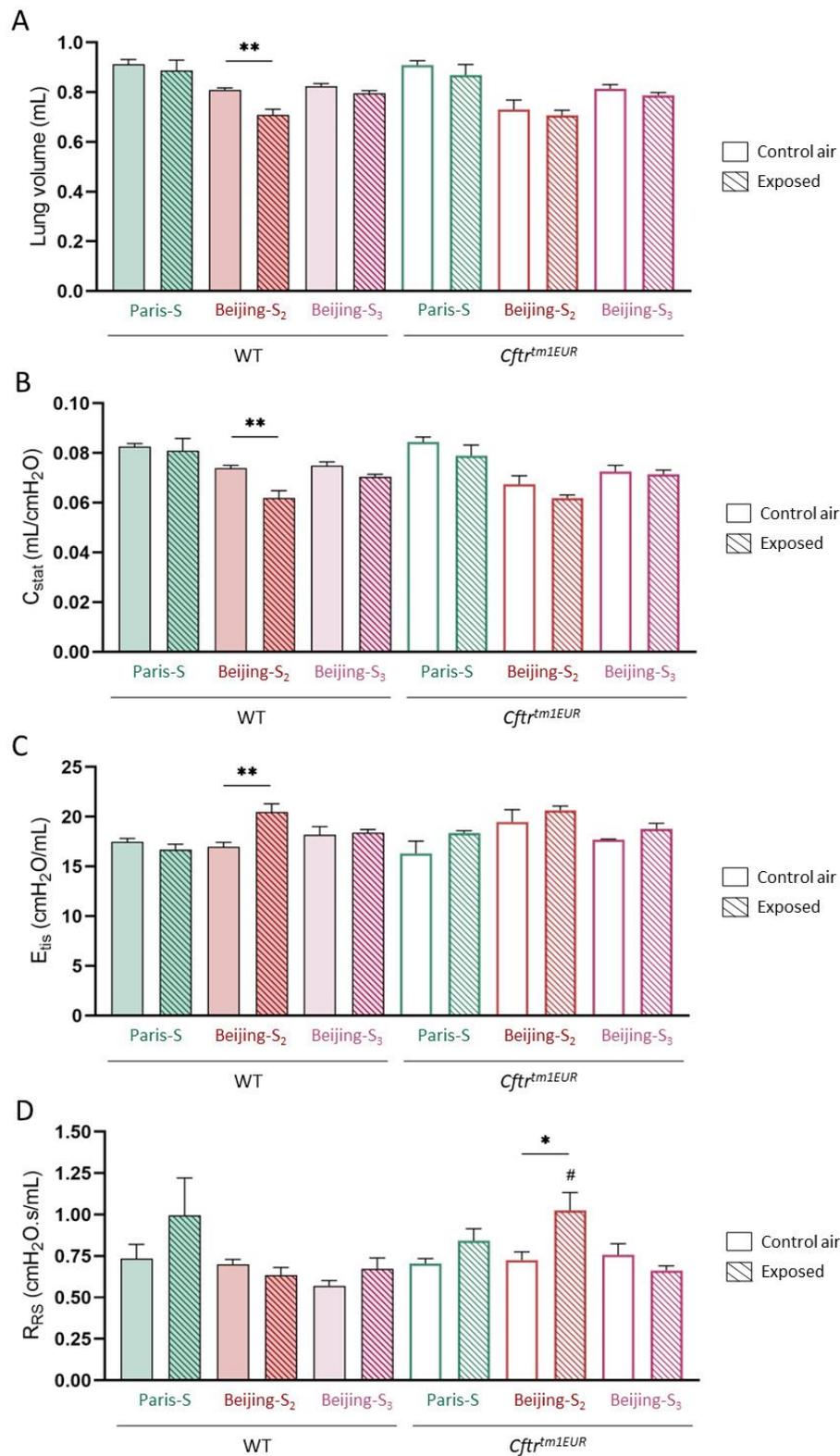


Figure 38 Étude de la fonction pulmonaire chez des souris exposées à différents types d'atmosphères urbaines. Mesure du volume pulmonaire (A), de la compliance statique (B), de l'élastance tissulaire (C) et de la résistance du système respiratoire (D) chez des souris WT et *Cfr^{tm1EUR}* exposées à une atmosphère contrôle et exposées aux atmosphères Paris-S, Beijing-S₂ et Beijing-S₃. # $p < 0.05$ en comparaison avec les souris WT ; * $p < 0.05$ et ** $p < 0.01$ en comparaison avec les souris exposées à une atmosphère contrôle. $n = 4-5$ souris par groupe.

Cette modification des paramètres ventilatoires est confirmée par le tracé des courbes de pression-volume sur lequel on observe un décalage des courbes vers le bas pour les souris WT exposées à l'atmosphère Beijing-S₂ et en moindre mesure pour les souris *Cftr*^{tm1EUR} (Figure 39). Par ailleurs, si une exposition aux atmosphères Paris-S et Beijing-S₃ n'a pas entraîné de modification du volume pulmonaire, de la compliance statique et de l'élastance tissulaire, les courbes de pression-volume pourraient suggérer une atteinte de la fonction pulmonaire allant dans le même sens que celle observée après exposition à l'atmosphère Beijing-S₂.

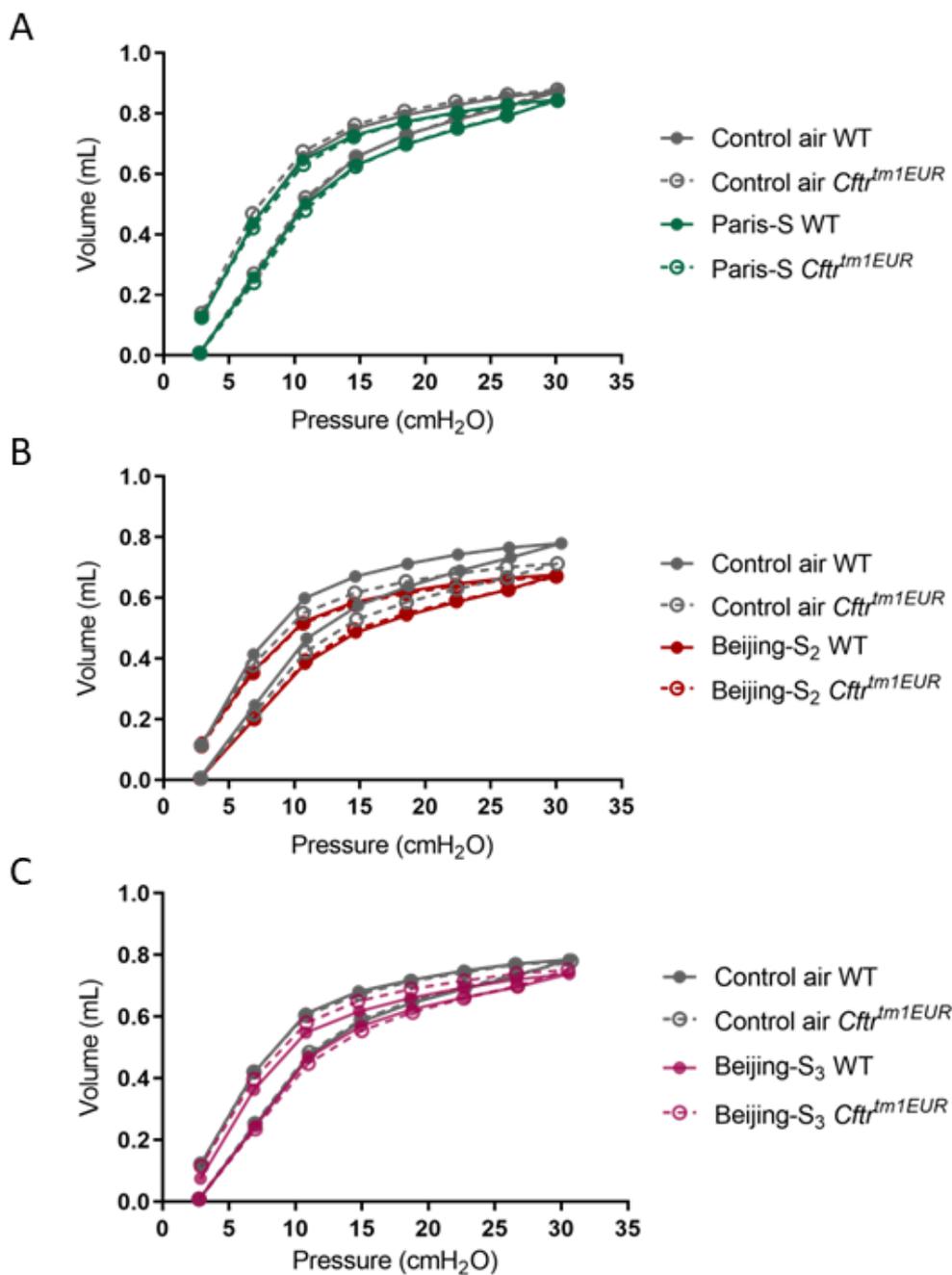


Figure 39 Courbes de pression-volume tracées chez des souris WT et *Cftr*^{tm1EUR} exposées à une atmosphère contrôle et exposées aux atmosphères Paris-S (A), Beijing-S₂ (B) et Beijing-S₃ (C). n = 5 souris par groupe.

2.7 Analyse de l'expression génique

Afin d'identifier les mécanismes impliqués dans les effets mis en évidence à la suite d'une exposition à des atmosphères urbaines, un total de 26 gènes a été étudié par RT-qPCR chez les souris WT et *Cftr^{tm1EUR}*. Les résultats de quantification de l'expression génique sont présentés en Figure 40. Ainsi, une exposition à l'atmosphère Paris-S tend à augmenter l'expression de gènes impliqués dans la réponse inflammatoire (*Il1b*, *Tnf*, *Il6*) chez les souris WT par rapport aux souris WT exposées à une atmosphère contrôle. Chez les souris *Cftr^{tm1EUR}* exposées, on observe cette même tendance avec une augmentation qui devient significative pour les gènes *Il1b*, *Tnf* et *Cxcl15*. De même, les gènes *Cat* et *Mmp9* voient leur expression être augmentée à la fois chez les souris WT et les souris *Cftr^{tm1EUR}* après une exposition à l'atmosphère Paris-S. L'expression de *Timp4* est en plus régulée à la hausse uniquement chez les souris *Cftr^{tm1EUR}*. Une exposition à l'atmosphère Beijing-S₂ induit une augmentation de l'expression de l'*Il1b* chez les souris WT. De façon intéressante, l'expression de gènes codant pour des cytokines pro-inflammatoires, et notamment *Cxcl2* et *Tgfb1*, diminue chez les souris *Cftr^{tm1EUR}* en réponse à une exposition à l'atmosphère Beijing-S₂. Une exposition à cette même atmosphère diminue par ailleurs l'expression de *Cat* chez les souris WT et de *Sod2* chez les souris *Cftr^{tm1EUR}*. Ces observations concernant la réponse inflammatoire et la réponse antioxydante sont en cohérence avec la tendance à la diminution de l'expression de *Rela* et de *Nfe2l2* chez les souris exposées à l'atmosphère Beijing-S₂ par rapport aux souris témoins. D'autre part, une exposition à l'atmosphère Beijing-W₁ induit une augmentation de l'expression de *Tgfb1* chez les 2 génotypes de souris. Bien que non significative, l'augmentation de l'expression des gènes codant pour les autres cytokines pro-inflammatoires semble être majorée chez les souris *Cftr^{tm1EUR}* par rapport aux souris WT. Une exposition à l'atmosphère Beijing-W₁ tend également à augmenter l'expression de *Cat* chez les souris WT et de *Elane*, *Mmp12* et *Timp1* chez les souris *Cftr^{tm1EUR}*. Une exposition à l'atmosphère Beijing-W₂ semble, en moindre mesure que l'atmosphère Beijing-W₁, stimuler l'expression de gènes codant pour les cytokines pro-inflammatoires mais uniquement chez les souris *Cftr^{tm1EUR}*. Cependant, si cette atmosphère semble comme l'atmosphère Beijing-W₁ induire l'expression de *Cat* chez les souris WT elle ne tend pas à augmenter les protéases *Elane* et *Mmp12* chez les souris *Cftr^{tm1EUR}*. Enfin, l'expression de *Cftr* ne semble être altérée par aucune des expositions aux atmosphères urbaines tant chez les souris WT que chez les souris *Cftr^{tm1EUR}*.

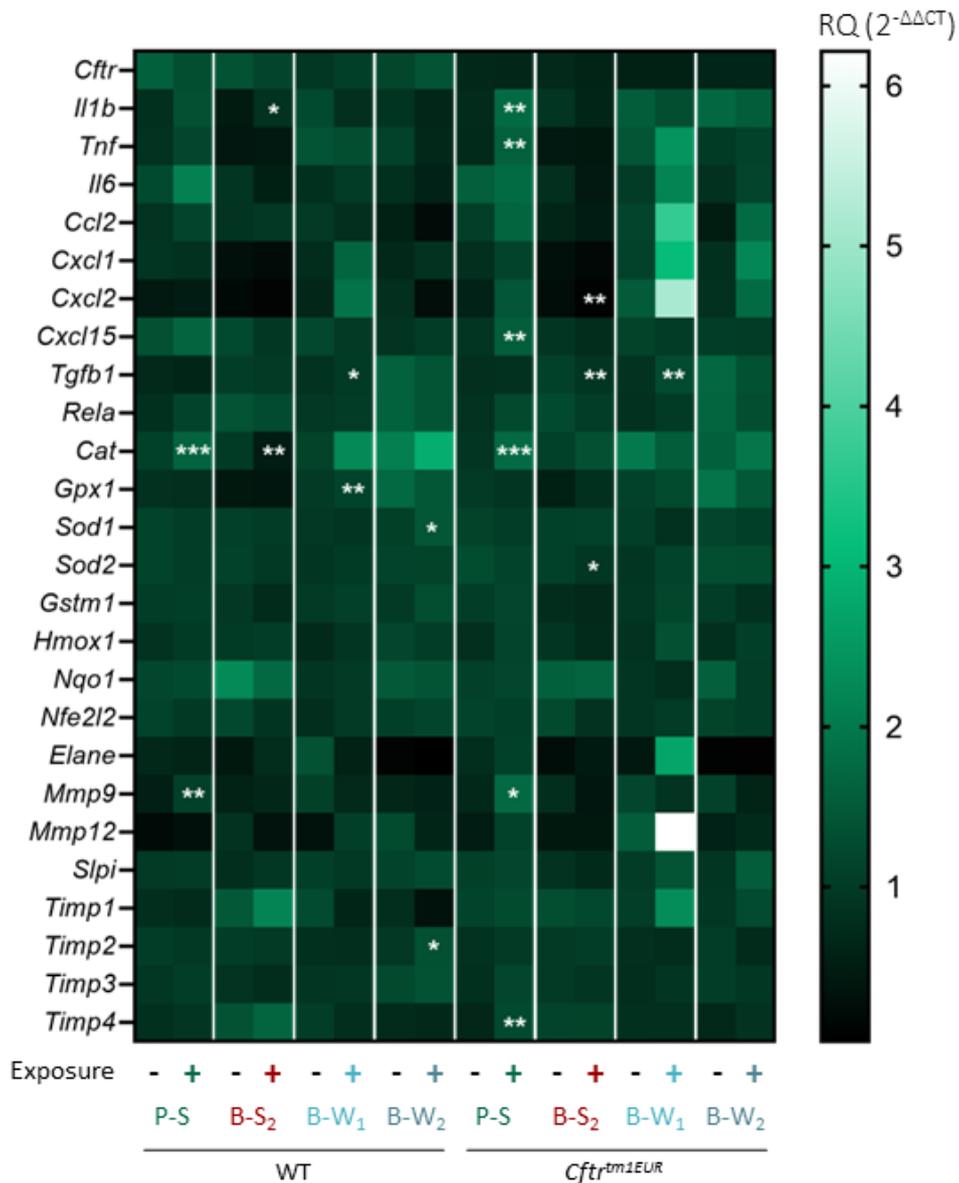


Figure 40 Profil d'expression génique de souris WT et *Cfr^{tm1EUR}* exposées à différents types d'atmosphères urbaines réalistes. La quantification relative de l'expression génique a été réalisée par la méthode du $2^{-\Delta\Delta CT}$ en utilisant *Hprt* comme gène de ménage. La carte de chaleur a été générée à partir des quantifications relatives des expressions géniques. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ et *** $p < 0.001$ en comparaison avec les souris exposées à une atmosphère contrôle. $n = 4-6$ souris par groupe.

2.8 Étude cinétique : analyse des réponses induites après 18h et 72h d'exposition

Afin d'évaluer la cinétique d'apparition des effets induits par une exposition à des atmosphères urbaines, un lot de souris WT et *Cfr^{tm1EUR}* a également été prélevé au bout de 18H

d'exposition. Cette étude cinétique s'est limitée à une exposition à l'atmosphère Beijing-W₁ et le même plan d'analyse que celui suivi lors des expositions de 72H a été respecté.

L'expression génique et protéique des mucines MUC5AC et MUC5B n'est pas modifiée chez les souris WT et *Cftr*^{tm1EUR} après une exposition de 18H et 72H à l'atmosphère Beijing-W₁ (Figure 41). Néanmoins, une exposition de 72H à l'atmosphère Beijing-W₁ permet de faire ressortir une différence significative dans l'expression de *Muc5ac* entre les souris WT et les souris *Cftr*^{tm1EUR} qui n'existe pas chez les souris exposées à une atmosphère contrôle.

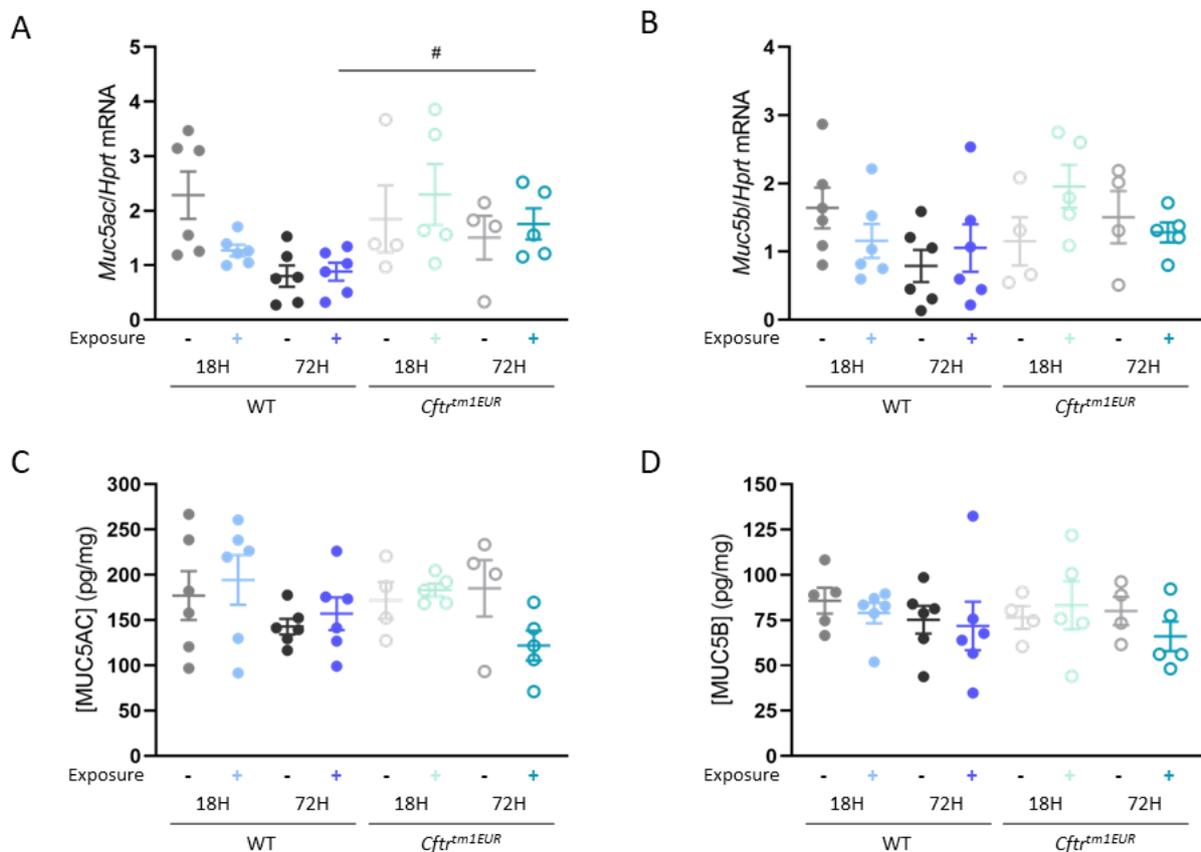


Figure 41 Expression des mucines dans les poumons de souris WT et *Cftr*^{tm1EUR} exposées à l'atmosphère Beijing-W₁ pendant 18H et 72H. (A-B) Expression génique des mucines *Muc5ac* (A) et *Muc5b* (B) L'expression des gènes a été quantifiée par la méthode du $2^{-\Delta\Delta CT}$ en considérant le gène *Hprt* comme gène de ménage. (C-D) Expression protéique des mucines MUC5AC (C) et MUC5B (D) Les mucines ont été dosées par ELISA et rapportées à la quantité totale de protéines dosées dans les poumons. # p < 0.05 en comparaison avec les souris WT. n = 4-6 souris par groupe.

Une exposition de 18H ne modifie pas le nombre de cellules totale dans les LBA de souris WT (Figure 42A). Si la composition cellulaire n'est statistiquement pas modifiée, la proportion de lymphocytes et de neutrophiles dans les LBA de ces souris tend à diminuer par rapport aux souris exposées à l'atmosphère contrôle (Figure 42B-D). On observe par ailleurs

dans les LBA de ces mêmes souris une diminution des concentrations de cytokines telles que TNF α , CXCL1, G-CSF ou encore CCL5 (Figure 42E). Une exposition de 72H semble au contraire augmenter les concentrations de cytokines dans les LBA des souris WT sans affecter la cellularité du LBA. Chez les souris *Cftr^{tm1EUR}*, une exposition de 18H à l'atmosphère Beijing-W₁ entraîne une augmentation de la cellularité totale dans les LBA qui semble se poursuivre à 72H (Figure 42A). Le différentiel cellulaire n'est quant à lui pas altéré aux deux temps d'exposition. Le dosage des cytokines dans les LBA des souris *Cftr^{tm1EUR}* montre par ailleurs une stimulation de la sécrétion de cytokines pro et anti-inflammatoires en réponse à l'atmosphère Beijing-W₁ dès 18H d'exposition et qui semble être majorée par une exposition de 72H (Figure 42E). D'autre part, les niveaux de MPO et de GPX1 tendent à diminuer conjointement après 18H d'exposition chez les souris WT quand seul le niveau de GPX1 tend à diminuer chez les souris *Cftr^{tm1EUR}*, le niveau de MPO tendant à augmenter. Si le sens de variation s'inverse chez les souris WT après 72H d'exposition (la MPO et la GPX1 tendent conjointement à augmenter), il reste le même chez les souris *Cftr^{tm1EUR}*.

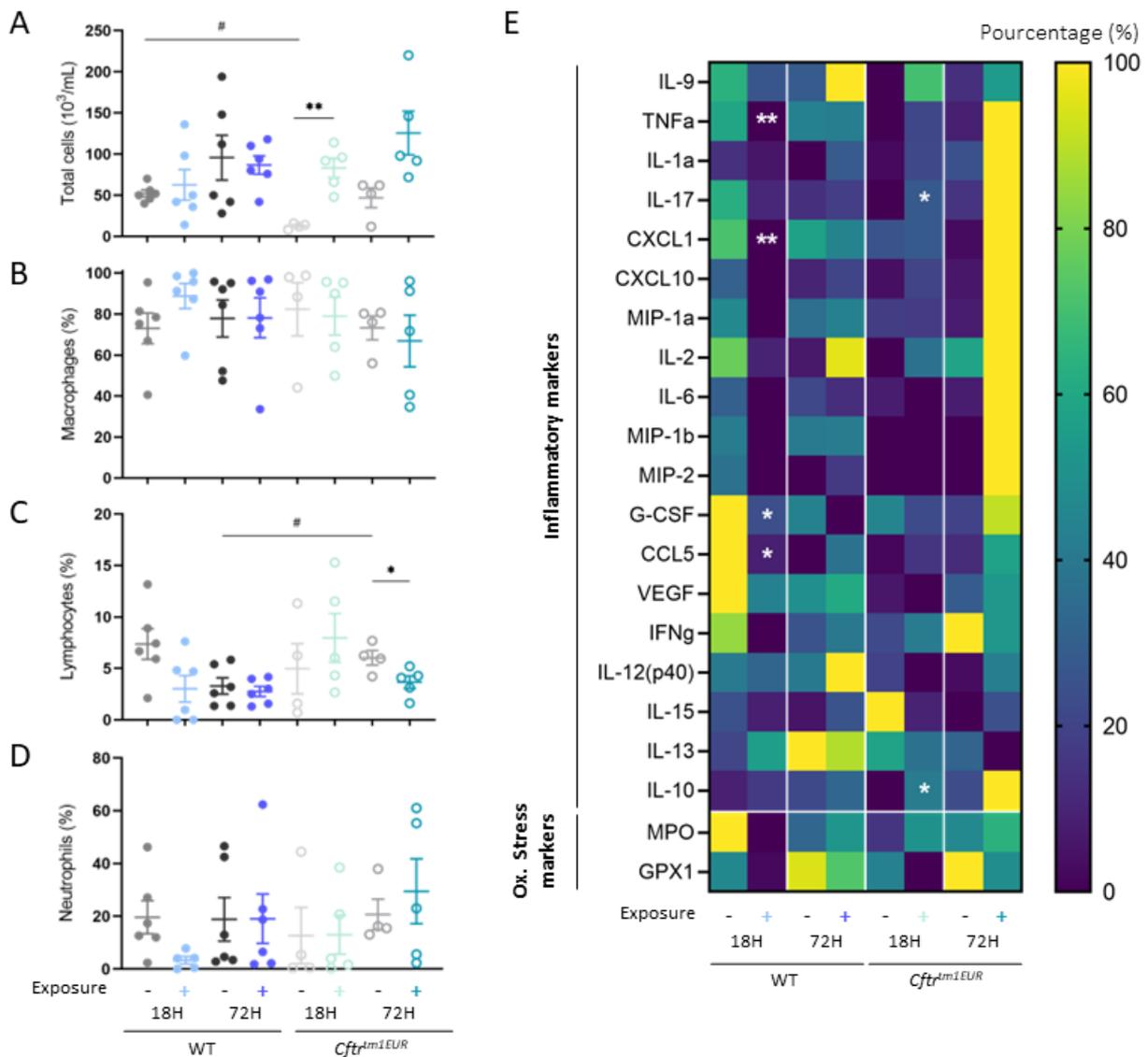


Figure 42 Effets d'une exposition de 18H et 72H à l'atmosphère Beijing-W₁ sur l'inflammation pulmonaire et le stress oxydant. (A-D) Analyse des LBA. Cellularité totale (A) et pourcentages de macrophages (B), de lymphocytes (C) et de neutrophiles (D) dans les LBA de souris WT et de souris *Cft^{tm1EUR}* exposées à une atmosphère contrôle et exposées 18H et 72H à l'atmosphère Beijing-W₁. (E) Profil de sécrétion cytokinique et d'expression de marqueurs du stress oxydant. Les cytokines ont été dosées par la méthode du Luminex, la MPO par la méthode ELISA et la GPX1 par western blot. La carte de chaleur a été générée à partir des expressions protéiques normalisées et exprimées en pourcentages avec, pour chaque protéine, 0% défini comme la plus petite valeur de dosage et 100% défini comme la plus grande valeur de dosage. # p < 0.05 en comparaison avec les souris WT ; * p < 0.05 et ** p < 0.01 en comparaison avec les souris exposées à une atmosphère contrôle. n = 4-6 souris par groupe.

L'analyse de l'histologie pulmonaire et la quantification du MLI n'ont révélé aucune altération majeure de la structure pulmonaire chez les souris exposées durant 18H et 72H à l'atmosphère Beijing-W₁ (Figure 43A-B). Si l'expression protéasique de MMP12, et en moindre mesure d'ELANE, n'est stimulée qu'à partir d'une exposition de 72H chez les souris

WT, une tendance à l'augmentation d'expression d'ELANE et de MMP12 semble débuter dès 18H d'exposition chez les souris *Cftr^{tm1EUR}* pour perdurer jusqu'à 72H d'exposition avec de surcroît une tendance à l'augmentation de l'expression de MMP9 (Figure 43C).

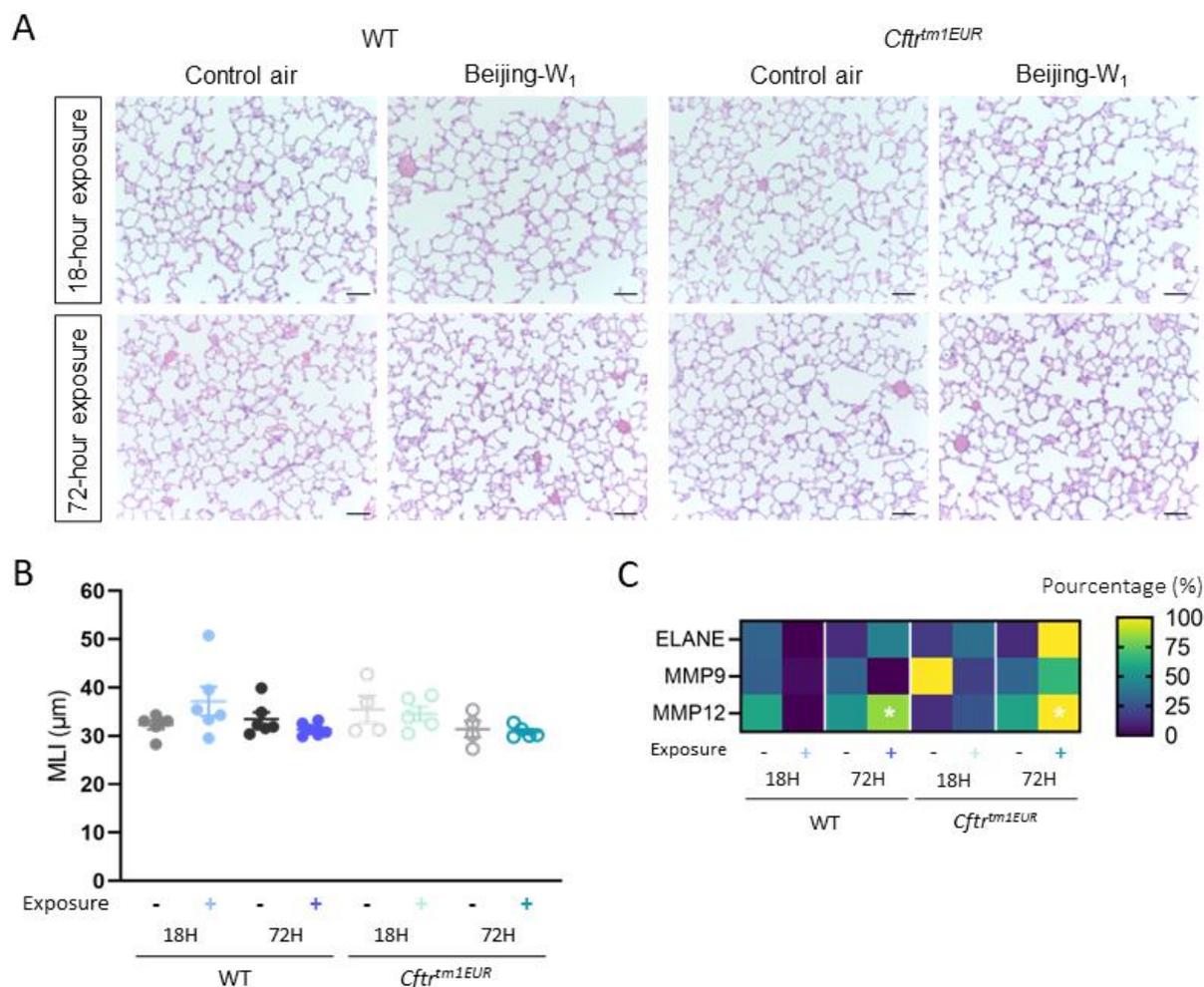


Figure 43 Analyse morphométrique et expression d'acteurs du remodelage pulmonaire chez des souris exposées 18H et 72H à l'atmosphère Beijing-W₁. **(A)** Histologie des régions alvéolaires de poumons provenant de souris WT et *Cftr^{tm1EUR}* exposées 18H et 72H à une atmosphère Beijing-W₁. Barre d'échelle = 50 µm. **(B)** Quantification du MLI. **(C)** Expression des protéases ELANE, MMP9 et MMP12. L'expression d'ELANE a été dosée par ELISA dans les surnageants de LBA. L'expression des MMP a été quantifiée par WB dans les broyats de poumons. La carte de chaleur a été générée à partir des expressions protéiques normalisées et exprimées en pourcentages avec, pour chaque protéine, 0% défini comme la plus petite valeur de dosage et 100% défini comme la plus grande valeur de dosage. * p < 0.05 en comparaison avec les souris exposées à une atmosphère contrôle. n = 4-6 souris par groupe.

Finalement, l'étude de l'expression génique n'a montré qu'une augmentation significative de l'expression d'*Elane* chez les souris WT et une diminution significative d'*Il6* chez les souris *Cftr^{tm1EUR}* après 18H d'exposition comparé aux souris exposées à une atmosphère contrôle (Figure 44). Bien que les variations d'expression observées ne soient pas

toutes significatives, une exposition de 72H semble davantage augmenter l'expression de gènes impliqués dans la réponse inflammatoire (*Tnf*, *Il6*, *Ccl2*, *Cxcl1*, *Cxcl2* et *Tgfb1*) et la réponse antioxydante (*Cat*, *Gpx1* et *Sod2*) qu'une exposition de 18H à la fois chez les souris WT et *Cftr^{tm1EUR}*. De plus, après 72H d'exposition, le nombre de gènes tendant à être régulés à la hausse ainsi que l'amplitude de ces variations semblent être plus élevés chez les souris *Cftr^{tm1EUR}* par rapport aux souris WT (Figure 44).

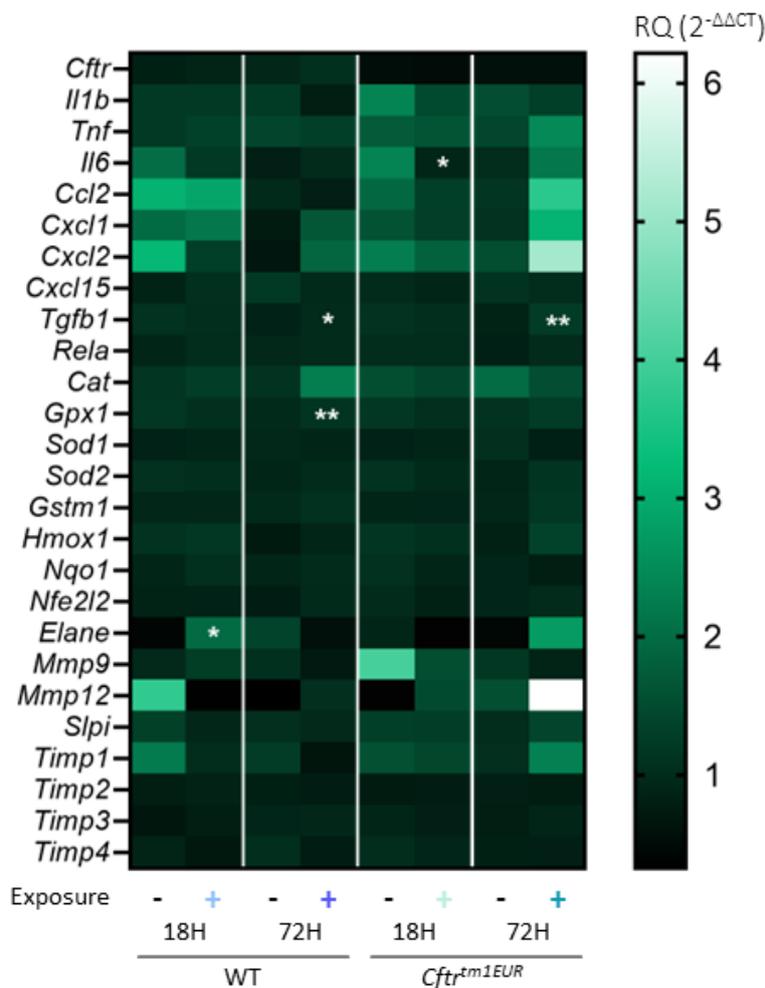


Figure 44 Profil d'expression génique de souris WT et *Cftr^{tm1EUR}* exposées pendant 18H et 72H à l'atmosphère Beijing-W₁. La quantification relative de l'expression génique a été réalisée par la méthode du 2^{-ΔΔCT} en utilisant *Hprt* comme gène de ménage. La carte de chaleur a été générée directement à partir des données de quantification relative. * p < 0.05 et ** p < 0.01 en comparaison avec les souris exposées à une atmosphère contrôle. n = 4-6 souris par groupe.

2.9 Synthèse des effets globaux

Afin d'avoir une vue globale des effets induits sur l'ensemble des paramètres étudiés après exposition à différents types d'atmosphères urbaines, des graphiques en radar ont été

tracés (Figure 45). Le détail des données à partir desquelles ont été construits ces radars est présenté en Annexes 2 et 3. Ces radars permettent de mettre en relief les effets spécifiques de chacune des atmosphères étudiées. Ainsi, seule une exposition à l'atmosphère Paris-S chez les souris WT semble augmenter l'expression des mucines. Une exposition aux atmosphères Paris-S et Beijing-S₂ diminue les stress oxydant chez les souris WT tandis qu'une exposition à l'atmosphère Beijing-W₁ augmente celui-ci. Chez les souris *Cftr^{tm1EUR}*, une exposition aux atmosphères Paris-S, et en moindre mesure Beijing-W₁, augmente le stress oxydant. La quantification des marqueurs pro et anti-inflammatoires révèle chez les souris WT une augmentation de l'état pro-inflammatoire associée à une légère stimulation de la protection anti-inflammatoire à la suite d'une exposition aux atmosphères Beijing-S₂ et Beijing-W₁. Au contraire, une exposition à l'atmosphère Paris-S diminue à la fois les niveaux des marqueurs pro et anti-inflammatoires. Chez les souris *Cftr^{tm1EUR}*, une exposition à l'ensemble des trois atmosphères d'étude induit une augmentation de l'état pro-inflammatoire ainsi que des défenses anti-inflammatoires selon une gradation croissante Paris-S, Beijing-S₂ et Beijing-W₁. Enfin, les souris WT seraient plus sujettes à une destruction des tissus pulmonaires en réponse à une exposition à l'atmosphère Beijing-W₁ qu'aux atmosphères Beijing-S₂ et Paris-S. Chez les souris *Cftr^{tm1EUR}*, les atmosphères Paris-S et Beijing-S₂ prédisposeraient à niveau égal à une destruction des tissus pulmonaires alors que cette prédisposition serait majorée suite à une exposition à l'atmosphère Beijing-W₁.

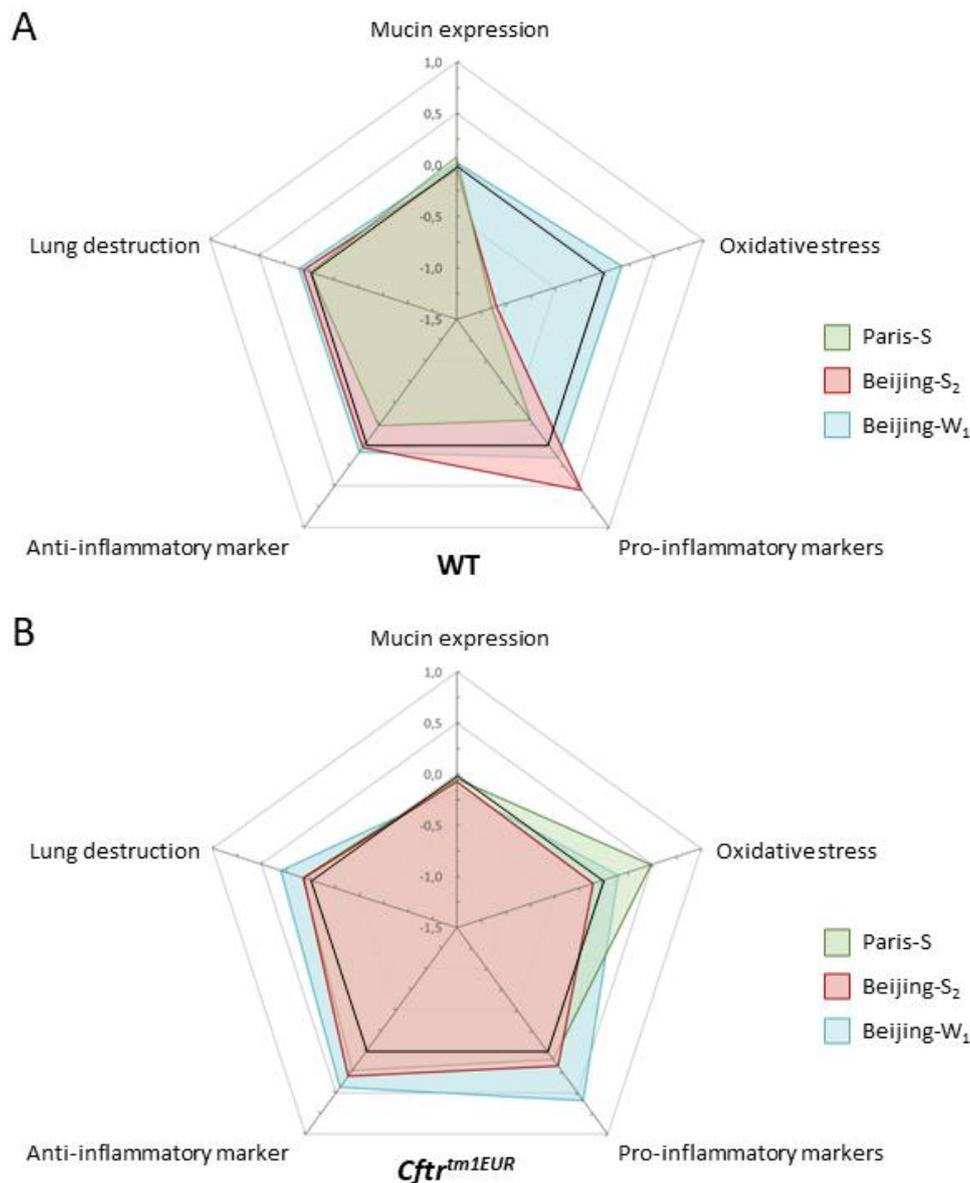


Figure 45 Synthèse des effets observés chez des souris WT et *Cftr^{tm1EUR}* à la suite d'une exposition à des atmosphères urbaines réalistes. Graphiques radar de l'ensemble des effets observés chez des souris WT (**A**) et des souris *Cftr^{tm1EUR}* (**B**) exposées à différents types d'atmosphères urbaines. La ligne noire correspond à l'absence d'effet.

Le même travail de synthèse a été réalisé afin d'intercomparer les effets induits après 18H et 72H d'exposition à l'atmosphère Beijing-W₁ (Figure 46). Chez les souris WT exposées 18H, on observe une diminution du stress oxydant, des marqueurs pro-inflammatoires et de destruction des tissus pulmonaires associée à une augmentation du marqueur anti-inflammatoire. Ces variations indiqueraient la mise en place d'une réponse protectrice chez ces souris après 18H d'exposition. Après 72H d'exposition, le stress oxydant, l'état inflammatoire et l'expression protéasique prédisposant à une destruction des tissus pulmonaires sont au contraire augmentés. Chez les souris *Cftr^{tm1EUR}*, une exposition de 18H à l'atmosphère

Beijing-W₁ augmente l'expression des mucines, le niveau de stress oxydant ainsi que le niveau de marqueurs pro et anti-inflammatoires mais est sans effet sur la destruction des tissus pulmonaires. Ces effets décrits après 18H d'exposition perdurent après 72H d'exposition et semblent même être augmentés notamment sur les marqueurs pro-inflammatoires et sur les acteurs impliqués dans la destruction des tissus pulmonaires. Une protection antioxydante pourrait se mettre en place au vu de la diminution du niveau de stress oxydant après 72H d'exposition en comparaison à 18H d'exposition.

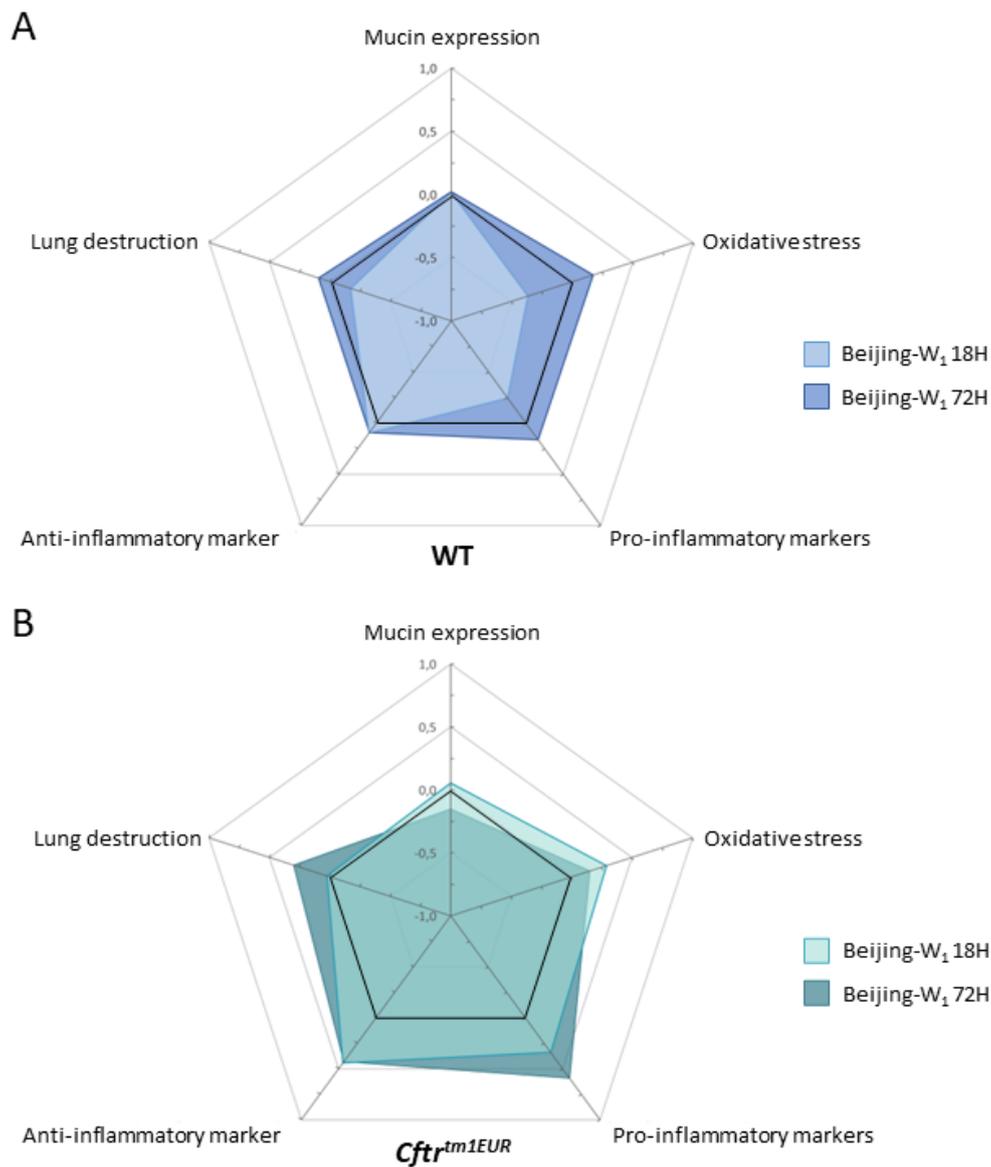


Figure 46 Synthèse des effets observés chez des souris WT et *Cftr^{tm1EUR}* à la suite d'une exposition de 18H et 72H à l'atmosphère Beijing-W₁. Graphiques radar de l'ensemble des effets observés chez des souris WT (**A**) et des souris *Cftr^{tm1EUR}* (**B**) exposées pendant 18H et 72H à l'atmosphère Beijing-W₁. La ligne noire correspond à l'absence d'effet.

3 Partie 3 : Etude de la fonction de CFTR – Résultats préliminaires des tests de salivation

Les résultats présentés dans cette troisième et dernière partie concernent l'étude de la fonction de CFTR chez le modèle $Cftr^{tm1EUR}$ par le test de salivation que j'ai développé au laboratoire. Ce test permet l'évaluation répétée, sur le même animal, de l'activité de la protéine CFTR afin d'en avoir un suivi longitudinal. Les résultats préliminaires obtenus lors de ces tests feront l'objet de la publication d'un article sous la forme de protocole expérimental.

3.1 Analyse de la fonction de CFTR avant exposition à la pollution atmosphérique

La fonction de CFTR a pu être évaluée grâce à un test de salivation considéré comme l'équivalent du test de la sueur chez l'Homme. Ce test a été réalisé sur deux lots de souris différents : un premier lot de souris femelles destiné à être exposé à l'atmosphère Beijing-S₃ et un second lot de souris mâles destiné à être exposé à l'atmosphère Beijing-W₂. Les résultats du test de salivation sont présentés en Figure 47. Ces résultats correspondent à des mesures réalisées avant toute exposition et représentent donc une mesure de l'activité basale de CFTR chez les souris. Les souris $Cftr^{tm1EUR}$ femelles présentent un pH et une concentration salivaire en bicarbonates inférieurs à ceux mesurés chez les souris femelles WT. Cette différence de pH et de concentration en bicarbonates entre les souris WT et $Cftr^{tm1EUR}$ n'est plus observée chez les souris mâles. Chez les femelles, comme chez les mâles, aucune différence dans les concentrations en ions chlorure et sodium n'a pu être observée entre les souris WT et $Cftr^{tm1EUR}$.

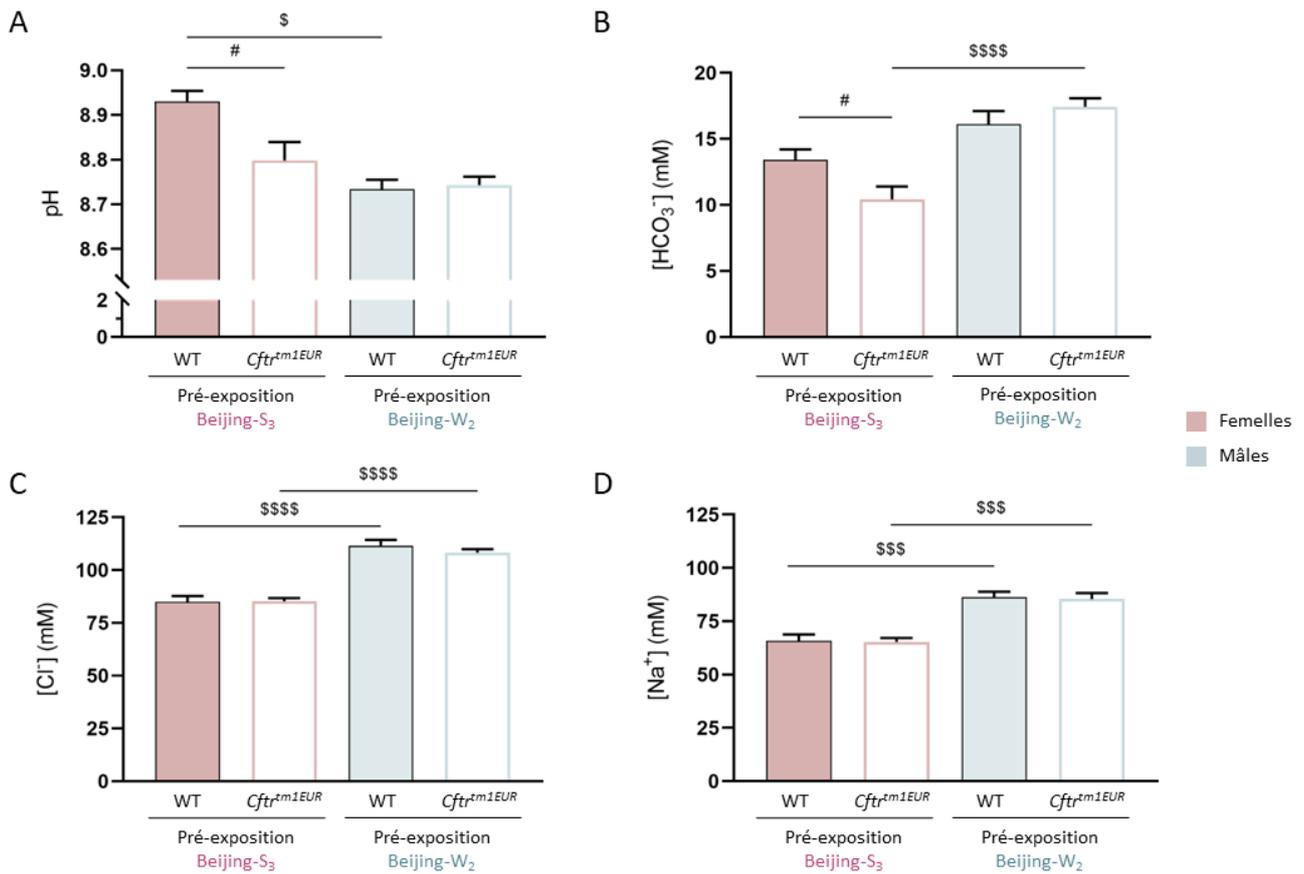


Figure 47 Evaluation de l'activité de CFTR grâce au test de salivation. Mesure du pH (A) et dosage des ions bicarbonate (B), chlorures (C) et sodium (D) dans la salive de souris WT et *Cftr^{tm1EUR}*. # $p < 0.05$ en comparaison avec les souris WT ; \$ $p < 0.05$, \$\$\$ $p < 0.001$ et \$\$\$\$ $p < 0.0001$ en comparaison avec les souris mâles. $n = 6-10$ souris par groupe.

3.2 Analyse de la fonction de CFTR après exposition à la pollution atmosphérique

Le test de salivation a été réalisé une seconde fois sur les mêmes souris après que celles-ci aient été exposées à deux types d'atmosphères urbaines. La répétition de ce test en sortie d'exposition permet ainsi d'évaluer l'impact d'une exposition à des atmosphères urbaines sur la fonction de CFTR. Les résultats du second test de salivation montrent une augmentation significative de la concentration salivaire en ions bicarbonate chez les souris WT exposées à l'atmosphère Beijing-S₃ et une diminution de la concentration salivaire en ions chlorure chez les souris WT exposées à l'atmosphère Beijing-W₂ (Figure 48). Aucune modification significative du pH salivaire ainsi que des concentrations en électrolytes n'a pu être relevée chez les souris *Cftr^{tm1EUR}* exposées aux atmosphères Beijing-S₃ et Beijing-W₂.

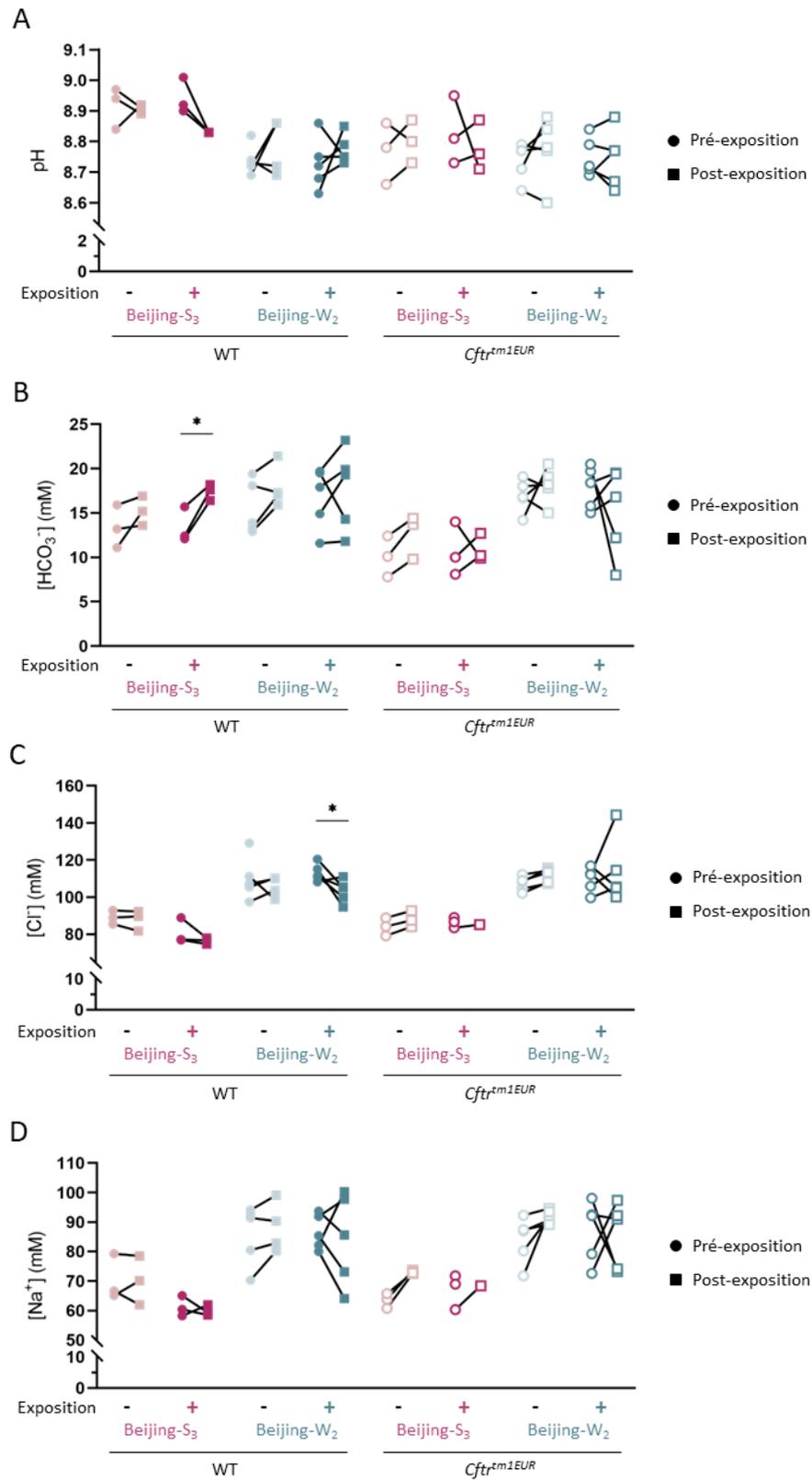


Figure 48 Mesure longitudinale de l'activité de CFTR à l'aide du test de salivation réalisé avant et après exposition à des atmosphères urbaines. Mesure du pH (A) et dosage des ions bicarbonate (B), chlorures (C) et sodium (D) dans la salive de souris WT et *Cfr^{tm1EUR}* exposées aux atmosphères Beijing-S₃ et Beijing-W₂. * $p < 0.05$ en comparaison avec les mesures réalisées en pré-exposition. $n = 3-5$ souris par groupe.

CHAPITRE V

V. Discussion

1 Discussion méthodologique

1.1 Modèles *in vivo*

1.1.1 Modèle *Cftr^{tm1EUR}*

Le modèle *Cftr^{tm1EUR}* est muté dans le gène *Cftr* et présente la mutation F508del, mutation la plus fréquente chez les patients atteints de mucoviscidose. Ce modèle reproduit correctement les atteintes intestinales de la maladie ainsi que les anomalies bioélectriques liées à l'altération des transports ioniques (sécrétion réduite de chlore associée à une hyperabsorption de sodium) uniquement au niveau de l'épithélium nasal (391). En revanche, ces souris n'expriment pas de phénotype pulmonaire. Plusieurs hypothèses ont été formulées quant à l'absence de phénotype pulmonaire. L'expression génique et protéique de CFTR est faible dans les poumons de souris par rapport aux intestins (196,392). Le transport d'ions chlorure et la régulation du transport d'ions sodium pourraient passer par d'autre(s) canal(aux) que CFTR. En particulier, un canal chlorure activé par le calcium serait une voie alternative pour la sécrétion d'ions chlorure dans le poumon chez la souris (393,394). La perte de CFTR serait donc mieux compensée chez la souris. D'autre part, les souris *Cftr^{tm1EUR}* présentent une activité résiduelle de CFTR qui pourrait être liée à une maturation partielle de la protéine (199). Des différences morphologiques inter-espèces sont également à considérer dans la difficulté à reproduire un phénotype pulmonaire semblable à celui observé chez l'Homme. En effet, chez la souris la présence de glandes sous-muqueuses est confinée à la trachée alors qu'elle s'étend jusqu'aux bronches chez l'Homme (395). Toujours chez la souris, les cellules sécrétrices de mucus ne se retrouvent que jusqu'aux voies respiratoires proximales. Ceci limite quelque peu la possibilité d'étudier l'obstruction des voies respiratoires par le mucus qui constitue pourtant un élément physiopathologique central de la mucoviscidose.

L'absence de phénotype pulmonaire chez le modèle *Cftr^{tm1EUR}* ne fait pas exception parmi l'ensemble des modèles murins de mucoviscidose qui existent. La description bibliographique initiale de ces modèles fait état de l'absence d'un phénotype pulmonaire notable caractérisé par une histologie normale associée à l'absence d'obstruction des voies respiratoires par le mucus (196,199,396). Une caractérisation plus fine de ces modèles a permis de pointer la présence de certaines anomalies telles qu'une inflammation excessive observée par histologie chez le modèle *Cftr^{tm1Hgu}* ainsi qu'une augmentation du nombre des cellules à gobelet associée à une réduction du volume de l'ASL à l'épithélium nasal des souris *Cftr^{tm1Unc}*, deux modèles inactivés pour *Cftr* (397). Une altération de la fonction pulmonaire caractérisée

par une diminution de la compliance, une augmentation de la résistance et une augmentation de la fréquence respiratoire a également été décrite chez des souris présentant des mutations de *Cftr* (346,398–400). Spécifiquement au modèle *Cftr*^{tm1EUR}, une hyperréactivité bronchique en réponse à des doses croissantes de méthacholine a également été mise en évidence (401). La réalisation de challenges infectieux avec *P.aeruginosa* chez des souris CF révèle une augmentation de la mortalité de ces souris et une diminution de la clairance bactérienne par rapport aux souris WT ainsi que la mise en place d'une réponse inflammatoire persistante dans le cas d'une exposition chronique à *P.aeruginosa* (402–404). Wellmerling et al. sont également parvenus à mettre en évidence un élargissement des alvéoles semblable à de l'emphysème chez des souris *Cftr* KO vieillissantes (14-20 mois) (405). Une seconde étude a par ailleurs montré chez des souris *Cftr*^{tm1Hgu} âgées de 12 mois une altération de l'homéostasie du surfactant ainsi qu'une clairance alvéolaire et muco-ciliaire anormale (406). L'ensemble de ces observations témoigne finalement d'une susceptibilité des souris CF à développer un phénotype pulmonaire de mucoviscidose. Chez ces modèles, les atteintes pulmonaires sont moins évidentes que chez l'Homme ce qui permet d'étudier des stades plus précoces de la maladie.

Le modèle *Cftr*^{tm1EUR} possède la mutation F508del, soit une mutation de classe II : si la synthèse d'ARNm est normale c'est la maturation de la protéine qui n'est pas correcte. Pourtant de façon intéressante, nous avons observé une expression significativement plus faible de *Cftr* dans les poumons de souris *Cftr*^{tm1EUR} par rapport aux poumons de souris WT (Figure 40) alors que la description bibliographique du modèle fait état de niveaux de transcrits de *Cftr* identiques entre les souris homozygotes F508del et les souris WT dans les glandes salivaires, le caecum et le jéjunum (407). Ceci pourrait s'expliquer par une altération de l'activité de l'ARN polymérase inhérente à la présence de la mutation comme reportée dans d'autres modèles F508del (407,408). On peut également présupposer une variabilité inter-individuelle dans l'expression de *Cftr* chez les individus fondateurs de la lignée. L'origine exacte et la signification biologique de cette sous-expression de *Cftr* chez les individus F508del de façon spécifique au tissu pulmonaire restent inconnues. Pour autant, ces faibles niveaux d'ARNm ne sont pas nécessairement incohérents avec une fonction résiduelle de la protéine CFTR. En effet, dans le modèle *Cftr*^{tm1Hgu}, modèle « knock-out » de *Cftr*, un contournement de la mutation par épissage alternatif et saut d'exon permet aux individus mutés de produire jusqu'à 10% d'ARNm normaux, des niveaux suffisants pour que la protéine soit exprimée et acheminée à la membrane et permettre de réduire la sévérité de la maladie (345,409).

1.1.2 Modèle *Scnn1b*-Tg

La construction du modèle *Scnn1b*-Tg est basée sur l'insertion d'un transgène dans la séquence du gène *Scnn1b* codant pour la sous-unité β du canal ENaC. L'insertion de ce transgène entraîne une surexpression de cette sous-unité responsable d'une hyper-absorption de sodium à l'origine d'une déshydratation de l'ASL, d'une obstruction des voies respiratoires par le mucus, d'infections bactériennes spontanées et d'une inflammation neutrophilique de façon semblable à ce qui est observé chez les patients atteints de mucoviscidose (200,410,411). Il s'agit actuellement du modèle le plus complet dans la reproduction du phénotype pulmonaire de la mucoviscidose chez la souris. Au vu de la stratégie de construction de ce modèle, il apparaît donc que l'hyper-absorption de sodium est déterminante dans le développement de ce phénotype et que CFTR jouerait un rôle mineur au contraire de ce qui se passe chez l'Homme. Chez l'Homme, des mutations du gène *Scnn1b* sont associées au syndrome de Liddle caractérisé par une hypertension artérielle liée à une réabsorption rénale excessive de sodium et d'eau mais semble avoir des impacts pulmonaires mineurs (412–414). Dans le modèle *Scnn1b*-Tg la base génétique de la mucoviscidose est ainsi « détournée » : le transport d'ions chlorure est normal car le gène *Cftr* n'est pas atteint. De plus, l'expression du transgène étant ciblée aux cellules pulmonaires, les souris ne présentent pas de phénotype intestinal. L'étude d'effets secondaires résultant de la mutation du gène *Cftr* est ainsi limitée. Ceci est appuyé par le développement d'un modèle double mutant F508del/*Scnn1b*-Tg, combinant sécrétion réduite de chlore et hyper-absorption de sodium et chez qui le phénotype pulmonaire mis en place est plus sévère que celui observé chez les animaux présentant chacune des mutations séparément (415). Ceci suggère une complémentarité des atteintes des gènes *Scnn1b* et *Cftr* dans la mise en place d'un phénotype pulmonaire de mucoviscidose chez la souris.

Une des particularités du modèle *Scnn1b*-Tg est le développement, en parallèle d'un phénotype inflammatoire et obstructif, d'un phénotype emphysémateux observé dès l'âge de 3 semaines et qui persiste à l'âge adulte. Cet emphysème serait en partie la conséquence d'un remodelage pulmonaire secondaire à l'inflammation et à l'obstruction par le mucus (416). Jusqu'à peu, quelques études seulement avaient montré la présence d'un emphysème mineur dans un contexte de mucoviscidose chez l'Homme (417–419). Des études plus récentes indiquent le développement d'un phénotype emphysémateux chez des patients atteints de mucoviscidose dès le début de l'adolescence. Ce développement progresse avec l'âge et corrèle avec la sévérité de la maladie (420,421). Ainsi, au contraire du modèle *Cftr*^{tm1EUR}, le modèle transgénique permet d'étudier la maladie à un stade avancé.

Finalement, il est à rappeler que nous avons travaillé sur une souche congénique du modèle *Scnn1b*-Tg et établie sur un fond génétique homogène C57BL/6NJ. Il a été montré que le fond génétique influe sur la sévérité de la maladie pulmonaire observée dans ce modèle (383). Si notre lignée congénique présente une survie augmentée par rapport à la lignée originale, en grande partie due à une diminution du nombre des bouchons muqueux asphyxiant dans la trachée (80% de survie à 20 jours post-natal contre 45% dans la lignée originale), elle ne perd pas pour autant les caractéristiques inflammatoires et muco-sécrétantes fondamentales du modèle.

1.2 Génération des atmosphères et protocole d'exposition

1.2.1 Réalisme des simulations

La chambre de simulation atmosphérique CESAM permet de simuler des atmosphères réalistes, aussi bien en terme de diversité des polluants présents qu'en terme de gammes de concentrations.

Le protocole d'exposition ici mis en place a permis d'exposer des souris à des atmosphères constituées d'un mélange de particules, NO_x, SO₂, CO et COV (Figure 31). Ceci constitue un réel avantage en comparaison avec la majorité des études *in vivo* et *in vitro* réalisées à ce jour qui ne réalisent des expositions qu'à un seul polluant. Si certaines particules, les NO_x et le SO₂ font partie des polluants directement injectés dans CESAM, le CO s'est formé secondairement, témoin de la mise en place de processus chimiques secondaires, ainsi que de nouveaux types de particules (AOS notamment). De même, un mélange constitué de seulement 7 COV a été injecté dans la chambre alors que 36 COV ont pu être identifiés et quantifiés dans l'isolateur exposé. Avec une concentration de NO_x et de SO₂ de moins de 100 µg/m³, une concentration de COV allant de quelques µg à plusieurs centaines de µg/m³ et une concentration de particules de 25 à 250 µg/m³, ces polluants ont été mesurés à des concentrations équivalentes à celles réellement observées lors de pics de pollution ayant affecté les villes de Paris et de Pékin (372,374,377,379). Il s'agit là d'un second point fort de notre protocole d'exposition. Qui nous permet d'exposer les souris à des doses réalistes en comparaison avec la majorité des études qui utilisent des doses non réalistes. Ces doses, beaucoup trop élevées au regard de la période d'exposition sur laquelle elles sont administrées posent question alors même que de plus en plus d'études montrent des effets de la pollution même à de faibles concentrations situées en-dessous des valeurs limites de l'OMS (251). Toutefois, si les atmosphères simulées

tentent de s'approcher au plus près de la réalité, elles ne reproduisent pas actuellement la diversité des polluants présents dans les atmosphères urbaines. A titre d'exemple, nos atmosphères ne contiennent pas de particules « modèles » de la combustion du diesel. Un modèle reste un modèle et n'est pas une atmosphère réelle.

Si nous considérons l'O₃, un polluant dont les effets sont parmi les plus étudiés dans les études épidémiologiques et expérimentales, ses concentrations de fond automnales et hivernales sont d'une dizaine à une trentaine de µg/m³ dans des environnements urbains comme Paris et Pékin (373,422,423). En période estivale, les concentrations moyennes d'O₃ sont égales à 60-80 µg/m³ à Paris et à 100 µg/m³ à Pékin mais peuvent atteindre des pics compris entre 120 et 160 µg/m³ (373,424,425). Dans nos atmosphères simulées, bien que les processus photochimiques aient lieu, l'O₃ n'est mesuré qu'à de très faibles niveaux (1 à 2 ppb soit 2 à 4 µg/m³). En effet, la formation d'O₃ dépend des concentrations de ses précurseurs et notamment des oxydes d'azote (NO_x) et des composés organiques volatils (COV). L'O₃ est issu de la réaction du NO avec le dioxygène de l'air. A l'état d'équilibre, l'O₃ réagit de nouveau avec le NO pour reformer du NO₂ (Figure 8). Les concentrations d'O₃ sont stables. Ce cycle peut être perturbé par la présence de COV qui, une fois oxydés, entrent en compétition avec l'O₃ pour la transformation du NO en NO₂. Ceci résulte en une accumulation d'O₃ qui aboutit, dans les conditions propices de fort ensoleillement et températures élevées, à des pics de pollution à l'O₃. En milieux urbains, les concentrations de NO_x sont très élevées à cause des activités industrielles et du trafic routier important. Cependant, la quantité de COV y est faible. Le NO constitue alors un puits d'O₃ ce qui ne permet pas l'accumulation de ce dernier. Au contraire, en milieux ruraux la quantité de COV est plus élevée par la présence de la végétation qui émet d'importantes quantités de COV biogéniques. Les NO_x sont quant à eux moins concentrés car le trafic routier et les activités industrielles sont moins importantes. Dans ces milieux, la formation d'O₃ est limitée par la quantité de NO_x. Il a ainsi été montré que la formation d'O₃ est maximum à des concentrations de NO_x et de COV correspondant à un ratio COV/NO_x égal à 8 (Figure 49) (426). Ces concentrations optimales pour la formation d'O₃ sont généralement celles retrouvées en zones périurbaines. L'objectif de nos simulations est de simuler des atmosphères urbaines. A cet égard, les quantités de NO et de NO₂ introduites dans la chambre sont beaucoup plus importantes que celles des COV. La formation d'O₃ est ainsi limitée par la

faible quantité de COV injectée. Une fois formé, l'O₃ réagit immédiatement avec les NO_x présents en excès, ce qui empêche ainsi toute accumulation d'O₃ dans notre système.

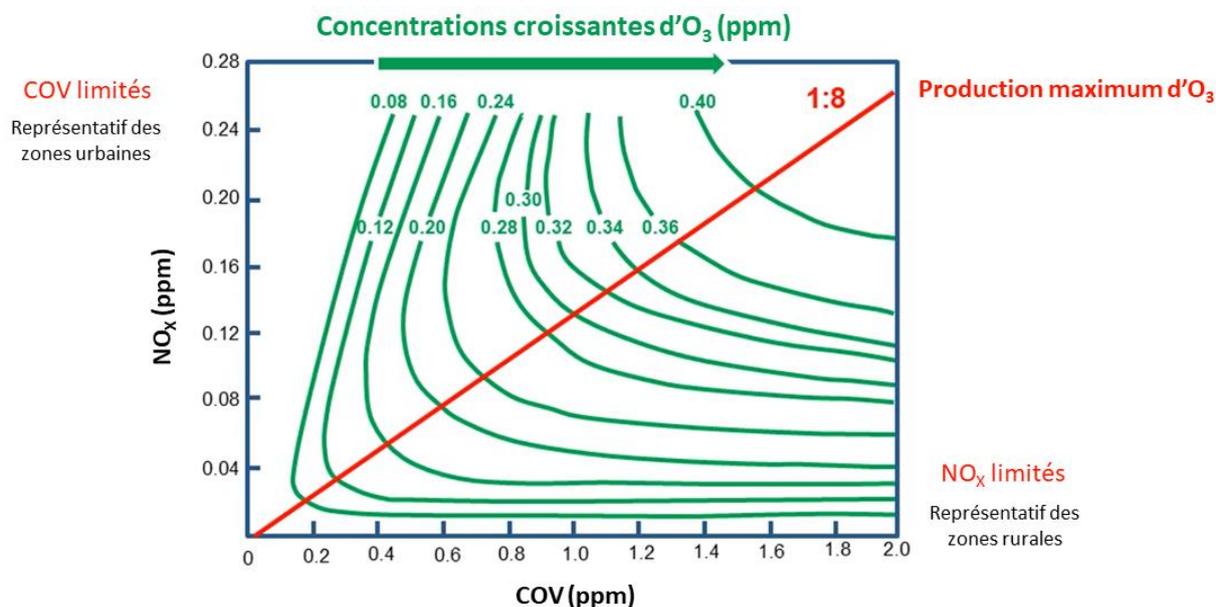


Figure 49 Production d'ozone en fonction des concentrations de composés organiques volatils (COV) et d'oxydes d'azote (NO_x). (Adapté du MOOC Air pollution : causes and Impacts – Photochemical smog).

D'autre part, si les NO_x sont en excès par rapport aux COV dans la chambre CESAM, ce n'est pas le cas dans l'isolateur exposé. En effet, la concentration totale de COV mesurée dans l'isolateur exposé est supérieure à celle de NO₂ avec un ratio se rapprochant de 8 pour certaines des simulations réalisées (Figure 31). On pourrait donc supposer la formation d'O₃ *in situ* dans l'isolateur exposé. Pourtant, les mesures d'O₃ réalisées dans cet isolateur montrent des quantités très faibles de ce gaz. Il est à noter que l'O₃ est un gaz particulièrement réactif avec tous types de surface du fait de son fort pouvoir oxydant (427). Ainsi, la non-accumulation de l'O₃ dans l'isolateur exposé, malgré la présence de ses précurseurs à des concentrations qui le permettrait, s'explique par une réaction de l'O₃ avec les parois métalliques de l'isolateur et toutes autres surfaces présentes à l'intérieur de ces derniers (grille métallique des cages, embout métallique des biberons, bouteilles d'eau, nourriture ...).

L'analyse de la composition chimique de la phase particulaire a été réalisée à l'aide de prélèvements de filtres réalisés sur la chambre CESAM. Les conditions thermodynamiques d'humidité, de température et de pression étant semblables entre la chambre et les isolateurs, les aérosols prélevés et analysés sur CESAM peuvent être considérés comme étant représentatifs de ceux transférés dans l'isolateur exposé et auxquels ont été exposés les souris.

Trois types de particules sont introduits dans la chambre : 1) des particules inorganiques de sulfate et d'ammonium, 2) des particules de suies et 3) des particules minérales (uniquement pour les simulations de type « Pékin »). L'analyse de la phase particulaire montre que le sulfate et l'ammonium représentent en moyenne 80 à 85 % en masse de la composition chimique des aérosols de nos atmosphères simulées (Figure 31) alors qu'ils contribuent en général de l'ordre de 30% à la composition des panaches particulaires (378,379,428). De même, les nitrates constituent habituellement 10 à 30% en masse de la composition des aérosols alors qu'ils restent peu présents dans nos simulations. Cette divergence est en grande partie due à l'injection directe de sulfate et d'ammonium dans la chambre. Ces précurseurs inorganiques servent par ailleurs de surface d'adsorption pour la formation des aérosols organiques secondaires (AOS). La quantité d'AOS formée ne dépasse pas les 10% en masse sur l'ensemble des simulations réalisées jusqu'à présent (Figure 31). D'autre part, la quantité de carbone suie ne dépasse quant à elle pas les 3%. A titre de comparaison, les AOS et le carbone élémentaire représentent 25 à 50% et 5 à 10% respectivement de la masse totale des aérosols d'atmosphères urbaines de type Pékin et Paris (372,379,428,429). A la lumière de ces comparaisons, nos atmosphères apparaissent qualitativement satisfaisantes mais trop faiblement « chargées » en AOS et en suies vis-à-vis de nos objectifs. Cette composition moins carbonée de la phase aérosol de nos simulations actuelles est d'autre part étayée par l'absence de composés hydrocarbures aromatiques polycycliques provenant de la combustion de biomasse, d'éléments traces métalliques ou encore de composés halogénés. Enfin, la distribution granulométrique des particules est également réduite. En effet, les particules détectées dans l'isolateur exposé sont à 99% des PM₁, soit des particules dont le diamètre est inférieur à 1 µm, le reste étant des PM_{2.5}. Si un pic de PM₁₀ est effectivement détecté dans la chambre CESAM à la suite de l'injection des particules minérales, celles-ci sédimentent rapidement avant d'avoir le temps d'être transférées dans l'isolateur exposé. Ce dernier élément était anticipé, la présence de particules minérales de fort diamètre visant à simuler leur contribution à la chimie multiphasique ayant lieu dans la chambre.

1.2.2 Isolateur témoin

La chambre CESAM ne pouvant simuler qu'une atmosphère à la fois, notre plan d'expérience implique la multiplication des groupes témoins à chaque campagne d'exposition. Deux stratégies différentes ont au final été adoptées afin de constituer la condition témoin. Dans la première, l'isolateur témoin a reçu de l'air en provenance de la chambre CESAM

préalablement épuré des gaz et des particules à l'aide d'un dénudeur (dispositif de piège à gaz par du charbon actif) et d'un filtre à particules. Ces dispositifs de filtration assurent un abattement de 96.99% du NO₂ et de 99.98% des polluants particulaires par rapport à CESAM, soit une très bonne efficacité de filtration. Cette stratégie pour l'isolateur témoin n'a été appliquée que lors de la première campagne d'exposition (atmosphère Paris hiver) lorsque les isolateurs ont été mis en place pour la première fois. Pour les campagnes ultérieures, afin de s'affranchir d'une éventuelle fuite des polluants de CESAM vers l'isolateur témoin, ce dernier a été totalement découplé de la chambre CESAM pour ne recevoir que de l'air ambiant. Si l'élimination des particules par les filtres HEPA équipant les isolateurs est très efficace (moins de 2 µg/m³ de particules ont été mesurées en moyenne dans l'isolateur témoin au cours des différentes campagnes), les isolateurs ne sont pas étanches à l'infiltration de certains polluants gazeux présents dans l'air ambiant (Figure 50). A ce jour, seul un transfert limité de panaches urbains de NO en cas de pics de pollution a été observé. Ainsi, les niveaux de NO₂ ont régulièrement atteint les 10 µg/m³ dans l'isolateur témoin. Ces niveaux ont pu être corrélés à des pics de pollution aux NO_x sur la ville de Créteil. En outre, il n'est pas non plus à exclure qu'une augmentation des concentrations de composés azotés dans l'isolateur témoin soit liée à des émissions produites par les souris. Il est en revanche peu probable que la présence de traces de SO₂ puisse être expliquée par des panaches de pollution, ce type de pollution n'existant plus dans la région parisienne. La détection de SO₂ dans le compartiment témoin pourrait ainsi être artéfactuelle (offset de l'instrumentation), voire liée à une diffusion résiduelle du SO₂ dans le réservoir de prélèvement de mesures commun à la chambre CESAM et aux 2 isolateurs, ou en lien avec des interférences dont les souris seraient à l'origine. Malgré ces considérations, la concentration totale de polluants mesurée dans l'isolateur témoin à chacune des campagnes réalisées était de 20 à 100 fois plus faible que dans l'isolateur exposé (Figure 50). Finalement, il est à noter qu'au vu de la réalisation des campagnes à des saisons différentes soumises de surcroît à l'influence de phénomènes de pollution, et la variabilité intrinsèque de certains paramètres environnementaux des simulations, les atmosphères témoins ne peuvent être considérées comme strictement identiques entre les différentes campagnes.

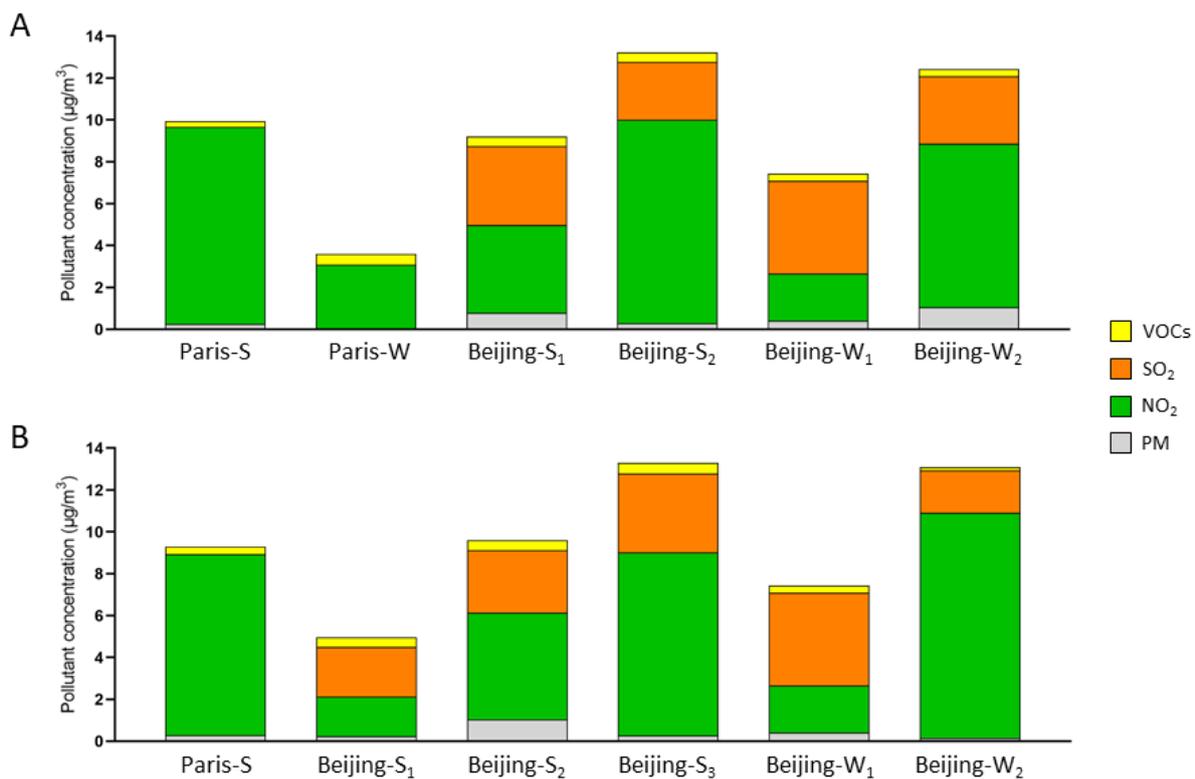


Figure 50 Composition chimique de l'atmosphère de l'isolateur témoin au cours des différentes campagnes réalisées. **(A)** Atmosphères témoins lors des expositions du modèle *Scnn1b*-Tg. **(B)** Atmosphères témoins lors des expositions du modèle *Cftr*^{im1EUR}.

2 Discussion des résultats

2.1 Modèle *Scnn1b*-Tg

La discussion des résultats concernant le modèle *Scnn1b*-Tg est à retrouver dans l'article en cours de finalisation (Partie IV.1 – p.104-109).

2.2 Modèle *Cftr^{tm1EUR}*

De façon générale, nous avons montré chez les souris *Cftr^{tm1EUR}* exposées aux différentes atmosphères urbaines la mise en place d'une réponse inflammatoire caractérisée par un profil de sécrétion cytokinique de type Th₁ (IL12, IL-2, CCL5, IFN γ et CXCL10) (Figure 34) (430,431). La réponse inflammatoire s'accompagne d'une augmentation des sécrétions régulatrices anti-inflammatoires et d'une augmentation de l'expression des protéases pulmonaires. Cette réponse protéique est en outre associée à une augmentation des transcrits des gènes correspondants. De plus, uniquement après exposition aux atmosphères Paris-S et Beijing-W₁, nous avons également constaté le recrutement et l'activation de neutrophiles médiés entre autres par la sécrétion macrophagique de cytokines telles que CXCL1, G-CSF et MIP-1a (Figure 34) (432,433). Globalement, les éléments de discussion étant les mêmes que ceux discutés précédemment pour la lignée transgénique, nous ne discuterons dans cette partie que des résultats qui font la spécificité de la lignée *Cftr^{tm1EUR}*.

Pour commencer, la stimulation de la sécrétion cytokinique observée à 72H chez les souris *Cftr^{tm1EUR}* exposées à une atmosphère Beijing-W₁ constitue la continuité d'une réponse inflammatoire déclenchée dès 18H d'exposition (Figure 42). Cette dépendance temporelle de la réponse inflammatoire n'est pas anormale. En effet, de nombreuses études réalisées chez des modèles *in vitro* ont fréquemment rapporté une variation de la réponse avec la durée d'exposition. Par exemple, une exposition à des particules PM₁₀, PM_{2.5} et des particules de diesel induit une réponse maximale entre 8 heures et 24 heures après exposition (434,435). Chez un modèle de souris *Cftr*, Geiser et al. ont évalué la réponse inflammatoire 24 heures, 3 jours et 7 jours suivant une exposition à des nanoparticules de carbone. Ils ont ainsi montré un pic de réponse au bout de 24 heures d'exposition à la différence de nos résultats qui suggèrent une réponse croissante entre 18 heures et 72 heures d'exposition (346). Pour autant nous n'avons pas évalué la réponse à 24 heures et nous ne pouvons donc pas savoir si la réponse à 24 heures est supérieure à celle observée à 72 heures. Cependant, d'éventuelles différences

observées dans la cinétique des effets pourraient s'expliquer d'une part, par l'utilisation d'un modèle de souris différent de celui que nous avons utilisé (*Cftr^{tm1Hgu}*) et d'autre part, par la méthode d'exposition qui a eu lieu par instillation intratrachéale et non pas par exposition corps entier qui pourrait permettre une induction plus rapide des effets au niveau pulmonaire. Nos résultats se rapprochent plutôt de ceux décrits par Gao et al. qui ont observé des maxima sur la sécrétion cytokinique entre 4 à 7 jours après une exposition aux PM_{2.5} et PM₁₀, NO₂, SO₂ et CO chez des patients BPCO (436). Dans le même temps dans notre étude, la réponse anti-inflammatoire, évaluée par la sécrétion d'IL-10 (437), est également stimulée dès 18H d'exposition et se poursuit après 72H d'exposition. Cette augmentation des niveaux d'IL-10 a été décrite suite à une exposition à des PM_{2.5}, PM₁₀ et au NO₂ (438,439). De plus, la pollution serait capable d'induire une méthylation des régions codantes pour l'IL-10 et ainsi modifier son expression (440,441).

Au contraire des souris *Cftr^{tm1EUR}*, une exposition aux différentes atmosphères urbaines ne semble pas induire de polarisation spécifique de la réponse inflammatoire chez les souris WT. Un fait particulier est même, chez ces souris WT, une diminution significative des niveaux de cytokines dans les LBA des souris exposées à l'atmosphère Paris-S par rapport aux souris exposées à une atmosphère contrôle (Figure 34). Ceci s'accompagne d'une diminution du stress oxydant fortement influencée par une diminution des niveaux de MPO plutôt que par une augmentation de l'expression de la GPX1 (Figure 35). Des résultats similaires ont été observés chez les souris WT exposées pendant 18H à l'atmosphère Beijing-W₁ (Figure 42). Ces résultats suggérant un effet « protecteur » anti-inflammatoire et anti-oxydant de la pollution pourrait être biaisés par un contexte inflammatoire préexistant des souris témoins. En effet, nous avons observé sur les coupes de tissus de ces souris des alvéolites macrophagiques diffuses associées ou non à la présence de tissu lymphoïde et d'infiltrats neutrophiliques dans les capillaires sanguins et l'interstitium pulmonaire (Figure 51). Si la quantité d'infiltrats inflammatoires et de tissu lymphoïde n'était pas homogène entre les individus, avec une inflammation particulièrement diffuse et importante chez les souris témoins de la condition Beijing-W₁ (18H), ils ont été observés chez l'ensemble des souris des campagnes Paris-S et Beijing-W₁.

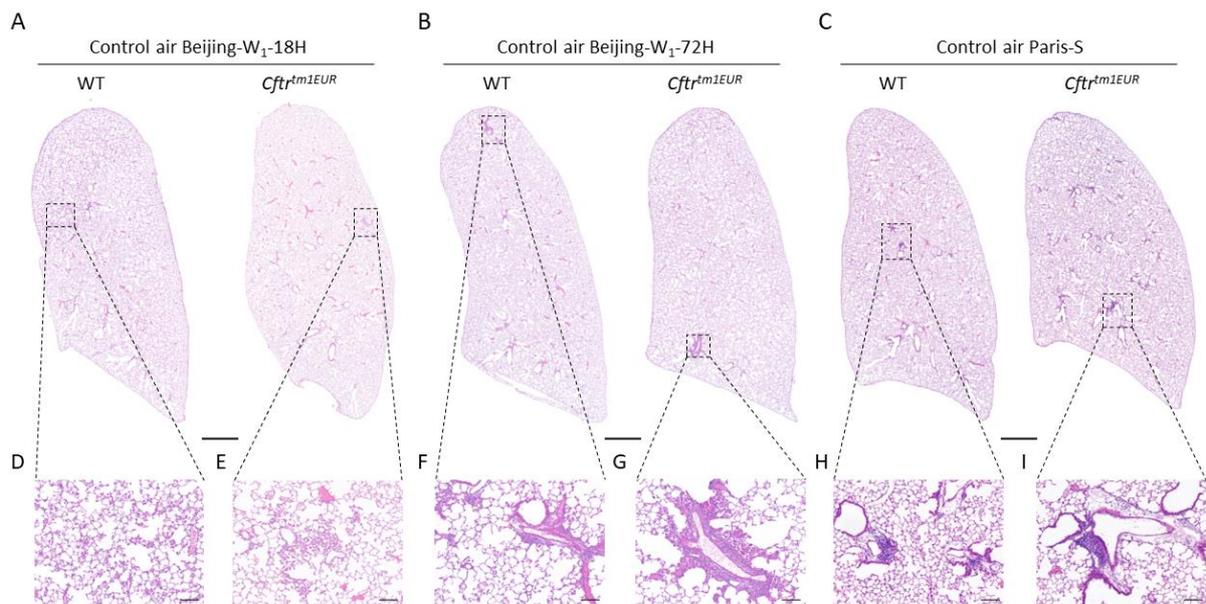


Figure 51 Histologie de souris témoins. (A-C) Coupes de poumons de souris WT et *Cfr^{tm1EUR}* témoins exposées à l’atmosphère contrôle des campagnes Beijing-W₁-18H (A), Beijing-W₁-72H (B) et Paris-S (C). Barre d’échelle = 1 000 μm. (D-E) Infiltrats alvéolaires macrophagiques inflammatoires et tissu lymphoïde observés à plus fort grossissement. Barre d’échelle = 100 μm. n = 4-6 souris par groupe.

De plus, une infiltration neutrophilique anormale dans les LBA des souris de la campagne Beijing-W₁ uniquement a également été constatée (Figure 52, Figure 33). La présence de neutrophiles dans les LBA de ces souris suggère une phase aigüe de l’inflammation.

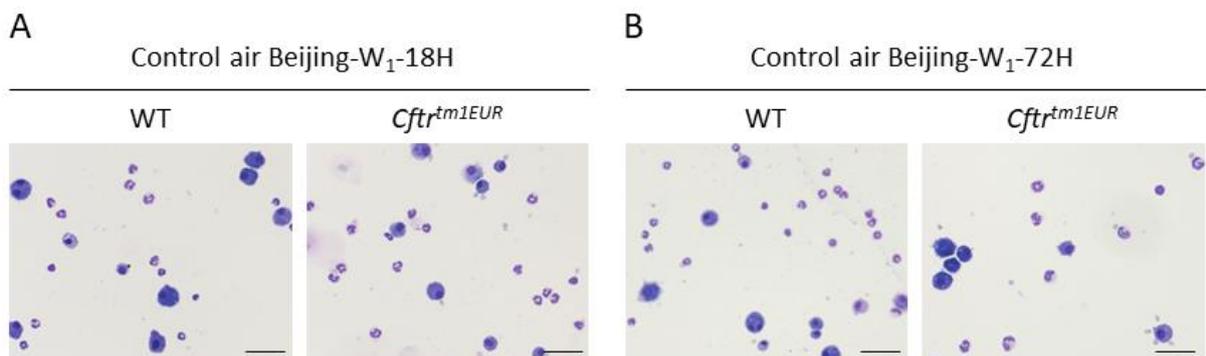


Figure 52 Photographies de LBA de souris témoins exposées à l’atmosphère contrôle de la campagne Beijing-W₁. (A) LBA de souris témoins pour la condition 18H. (B) LBA de souris témoins pour la condition 72H. Barre d’échelle = 10 μm.

La cause de cette réaction inflammatoire n'a pas été identifiée avec certitude. Cependant, la nature de la réponse (fort influx neutrophilique) évoque la présence d'un agent infectieux. Nous avons de plus constaté un effet cage qui conforte l'hypothèse d'une transmission de cet agent entre les souris d'une même cage. Le pathogène impliqué ainsi que la source et le moment exact de la contamination restent pour l'heure inconnus. Il est néanmoins probable que l'infection ait eu lieu avant l'entrée en exposition des souris. Ainsi, si la préexistence de ce contexte inflammatoire à l'exposition complique l'interprétation des résultats dans le cadre de notre problématique initiale, elle permet finalement chez les souris *Cftr^{m1EUR}* de se rapprocher de ce qui se passe réellement chez les patients atteints de mucoviscidose. Comme indiqué plus haut, les modèles de souris *Cftr* déclenchent un phénotype pulmonaire entre autres après une infection par *P.aeruginosa* (396). Dans notre cas, l'infection des souris par un agent pathogène inconnu a pu également prédisposer les souris au développement d'un phénotype pulmonaire. Les souris témoins comme les souris exposées ayant été infectées, la différence observée dans la réponse neutrophilique après exposition pourrait donc être le fait d'un effet de la pollution chez des souris déjà sensibilisées. Un contexte infectieux pourrait ainsi potentialiser les effets d'une exposition à des atmosphères urbaines réalistes chez des souris *Cftr^{m1EUR}* et ainsi valider notre hypothèse initiale.

Une altération de la fonction pulmonaire a été décrite chez différents modèles de souris *Cftr* (346,398,400). Cette altération se caractérise par une diminution du volume pulmonaire et de la compliance statique associée à une augmentation de l'élastance tissulaire signant une atteinte pro-fibrosante. Bien que non significative, une altération semblable de la fonction pulmonaire chez les souris *Cftr^{m1EUR}* témoins de la campagne Beijing-S₂ par rapport aux souris WT témoins a été observée mais n'a pas été reproduite lors des deux autres campagnes (Figure 38, Figure 39). La non-reproductibilité de l'altération de la fonction pulmonaire chez les souris par rapport à ce qui a été rapporté dans la littérature d'une part, et entre les différentes campagnes d'autre part, peut être expliquée respectivement par une différence de modèle utilisé et de fond génétique et un problème de variabilité inter-individus et de composition de l'atmosphère des isolateurs témoins. Chez l'Homme, les effets de la pollution atmosphérique sur la fonction pulmonaire ont été majoritairement montrés au travers une diminution du VEMS y compris dans un contexte de mucoviscidose (242,335,442). Bien que possible par des manœuvres réalisées en pression négative, la mesure du VEMS, ou plutôt l'estimation qui en est faite, reste peu réalisée chez la souris et n'a jamais été effectuée dans le cadre d'une exposition à la pollution atmosphérique. Une exposition à l'atmosphère Beijing-S₂ a entraîné, uniquement chez les souris WT, une diminution significative du volume pulmonaire total et de

la compliance statique (associée à une augmentation de l'élastance tissulaire), traduisant une diminution de la capacité du poumon à se distendre et donc une augmentation de sa rigidité. Des résultats comparables ont été décrits chez la souris dans le cadre d'expositions répétées à des PM_{2.5} et à des particules de diesel (443–445). De plus, bien qu'elles ne soient pas significatives, les variations des paramètres respiratoires chez les souris *Cftr*^{tm1EUR} exposées aux atmosphères Paris-S, Beijing-S₂ et Beijing-S₃ suivent cette même tendance. Ces résultats indiquent qu'une exposition aigüe à la pollution atmosphérique pourrait constituer les prémices de la mise en place d'un trouble ventilatoire. Ces modifications des paramètres respiratoires témoignent par ailleurs d'une atteinte du parenchyme pulmonaire plutôt que des grosses voies respiratoires (400). Au vu de l'absence d'obstruction des voies respiratoires par le mucus dans notre modèle, la nature restrictive du trouble ventilatoire semble être privilégiée. Cette hypothèse est confortée par une augmentation du dépôt de collagène associée à une augmentation du score de fibrose dans des poumons de souris et de rats exposés à des PM_{2.5} et des particules de diesel (444,446–448). Toutefois, l'augmentation de la résistance du système respiratoire chez les souris *Cftr*^{tm1EUR} après exposition à l'atmosphère Beijing-S₂ pourrait également suggérer la mise en jeu d'une composante obstructive dans le trouble ventilatoire développé après exposition à la pollution.

Nous avons finalement évalué la fonction de la protéine CFTR par l'adaptation d'un test de salivation initialement développé par Quinton et Best (387) puis modifié par Droebner et Sandner pour en faire l'équivalent du test de la sueur (388). Au niveau des glandes salivaires, c'est la fonction de réabsorption de CFTR qui fait défaut (449). Chez les souris mutées pour *Cftr*, la salive est ainsi plus concentrée en ions chlorure (388). Afin d'assurer la neutralité électrique, les ions sodium sont retenus et la salive se retrouve également plus concentrée en ions sodium (450). De plus, les fonctions sécrétrices de CFTR étant abolies, la sécrétion d'ions bicarbonate n'est plus assurée et leur concentration s'en retrouve diminuée et est associée à une diminution du pH salivaire (451). Dans sa version adaptée, notre protocole permet l'évaluation longitudinale de la fonction de CFTR avant et après exposition à la pollution. Ainsi, à la lumière des informations précédentes l'augmentation de concentration salivaire en ions bicarbonate et la diminution de la concentration en ions chlorure observées chez les souris WT exposées aux atmosphères Beijing-S₂ et Beijing-S₃ indiquent une stimulation des fonctions sécrétrices et des fonctions de réabsorption de CFTR (Figure 48). Cela suggère une augmentation de l'activité de CFTR chez les souris WT uniquement. Une seule étude a pour l'instant rapporté une activation semblable de CFTR dans des cellules épithéliales bronchiques humaines exposées à de faibles concentrations de fumée de cigarette (452). L'activation transitoire de CFTR a été observée

uniquement dans des cellules normales (pas dans des cellules exprimant la mutation F508del) et pourrait constituer un mécanisme de protection afin de faciliter l'élimination des polluants. De façon intéressante, l'augmentation de la concentration salivaire en bicarbonates chez les souris WT exposées à l'atmosphère Beijing-S₂ semble être associée à une diminution du pH. Ceci suggérerait que les ions bicarbonate ne sont pas les seuls à tamponner la salive. D'autre part, la pollution pourrait avoir un effet acidifiant sur la salive comme cela a été montré sur des condensats d'air exhalé (453–456). Par le design longitudinal du test de salivation, chaque souris constitue son propre contrôle. Cependant, l'analyse des données par des tests appariés ne permet plus de mettre en évidence les différences relevées dans les concentrations de chlore et de bicarbonate. Ce manque de puissance statistique est probablement lié aux faibles effectifs de chacun des groupes. Il convient donc de confirmer ces résultats préliminaires par la réalisation d'autres tests avec des effectifs plus importants. D'autre part et de façon plus surprenante, si nous avons effectivement reproduit une diminution du pH salivaire et de la concentration en ions bicarbonate (uniquement chez les femelles), nous n'avons pas réussi à reproduire l'augmentation de la concentration en ions chlorure et sodium dans la salive des souris *Cftr*^{tm1EUR} (Figure 47). Afin d'expliquer ces observations, nous avons initialement pensé à une influence du movicol présent dans l'eau de boisson des souris. En effet, celui-ci contient du chlorure de potassium, du chlorure de sodium et du bicarbonate de sodium parmi ses principes actifs ainsi que de l'acide citrique comme excipient. L'ensemble de ces composés peuvent directement influencer la composition et le pH de la salive et ainsi interférer avec les mesures réalisées. Pour ne pas risquer d'occlusions intestinales des souris *Cftr*^{tm1EUR} nous n'avons pas pu vérifier cette hypothèse. Néanmoins, il a été montré que des souris *Cftr* KO (*Cftr*^{tm1Unc}), recevant par leur eau de boisson un médicament à la composition identique à celui que nous avons utilisé présentaient une concentration salivaire en ions chlorure supérieure à celle des souris WT (388). Il apparaît donc que l'utilisation du movicol ne serait pas la cause de l'absence de différence dans les concentrations salivaires ioniques chez nos souris *Cftr*^{tm1EUR}. Le protocole de Droebner et Sandner décrit par ailleurs une récolte de salive pendant 30 minutes après injection de la pilocarpine. Nous avons au contraire réalisé la récolte pendant 15 minutes à partir de l'apparition de la première goutte de salive au niveau de la bouche, soit environ 5 à 10 minutes après injection de la pilocarpine. Or, plusieurs études ont montré que le flux de sécrétion salivaire maximum était atteint entre 10 à 20 minutes après injection de l'agent pharmacologique, la sécrétion ionique augmentant avec le flux salivaire (450,457,458). Il est donc possible qu'avec un temps de récolte moyennement plus court nous ayons sous-concentré nos échantillons en ions. De plus, les méthodes de dosage utilisées sont différentes. Nous avons

en effet dosé les différents ions au moyen d'une mesure potentiométrique alors que cela a été réalisé par spectrophotométrie dans les autres études. Enfin, nous avons injecté la pilocarpine par voie intrapéritonéale alors celle-ci a été injectée par voie sous-cutanée au niveau de la joue chez Droebner et Sandner. La pilocarpine stimule la sécrétion salivaire par deux mécanismes d'action : une action directe via les récepteurs muscariniques des glandes salivaires et une action indirecte via activation du système nerveux central (459). Il n'est donc pas à exclure que la stimulation de la sécrétion salivaire par voie systémique puisse activer d'autres voies compensatrices permettant la réabsorption des ions chlorure, tel que cela a été montré avec le co-transporteur NKCC1 (460).

2.3 Discussion générale

Pour commencer, nous souhaitons préciser que nous avons constaté de manière systématique une perte de poids de 1g en moyenne (< 5% du poids corporel) de l'ensemble des animaux en sortie d'exposition. Celle-ci n'était toutefois statistiquement pas différente entre les animaux exposés aux différentes atmosphères urbaines et les animaux exposés à une atmosphère contrôle ainsi qu'entre les animaux WT et les animaux CF. Cette perte de poids pourrait être imputée à un stress généré par le transport des animaux entre l'animalerie et le lieu d'exposition ainsi que par l'environnement bruyant des isolateurs. Le suivi de poids constitue généralement un indicateur de l'état de santé global des individus. De ce fait, il n'est donc pas à exclure que ce stress généré lors de l'exposition puisse influencer en partie sur les réponses que nous avons observées.

Nous avons fait le choix d'étudier les effets d'une exposition aigüe sur le phénotype pulmonaire de la mucoviscidose. Ce choix a été motivé par le fait que la progression de la maladie est conditionnée par la survenue d'épisode d'exacerbations, épisodes aigus et soudains de détérioration de l'état de santé des patients. Dans ce contexte d'aggravation aigüe des symptômes, la stratégie était donc de mimer une exposition à un pic de pollution afin d'en déterminer les effets potentiels sur l'état de santé global des souris. D'autre part, des résultats préliminaires acquis lors de mon Master 2, ont montré dans le modèle *Cftr^{tm1EUR}* des effets plus importants pour une exposition aigüe de 48H plutôt que pour une exposition de 7 jours. Pour diverses raisons techniques, nous avons été contraints de ne pouvoir réaliser des expositions que de 18H et de 72H.

L'ensemble des souris WT exposées aux différentes atmosphères urbaines ont développé essentiellement une réponse pro-inflammatoire et pro-oxydante classiquement décrite dans le cadre d'une exposition à la pollution. Nous avons au contraire observé des réponses plus diversifiées et plus importantes chez les souris *Scnn1b*-Tg ainsi que chez les souris *Cftr*^{tm1EUR}. Plus spécifiquement, nous avons montré chez ces souris le développement d'une réponse inflammatoire de type Th₁ après exposition aux différentes atmosphères urbaines. De plus, et de façon spécifique aux atmosphères Paris-S et Beijing-W₁, nous avons observé l'activation d'une réponse neutrophilique. En parallèle de cette réponse pro-inflammatoire nous avons observé la mise en place d'une réponse protectrice anti-inflammatoire mais une augmentation du niveau de stress oxydant et une stimulation des expressions protéasiques. L'augmentation de l'accumulation de mucus dans les voies respiratoires semble être le fait des souris *Scnn1b*-Tg alors qu'une diminution de la fonction pulmonaire semble être spécifique des souris *Cftr*^{tm1EUR}. Ainsi, exceptée l'altération de la clairance mucociliaire et de la fonction pulmonaire, nos résultats attestent d'un motif de réponse commun entre les 2 modèles de souris de mucoviscidose exposées à des atmosphères urbaines. Si ces mécanismes de réponse sont déclenchés dans les deux modèles de mucoviscidose par les différentes atmosphères simulées, l'intensité de la réponse induite est quant à elle atmosphère et modèle dépendante. Par exemple, l'atmosphère Paris hiver a des effets prépondérants sur le déclenchement d'un stress oxydant et la stimulation de l'expression des protéases pulmonaires. L'atmosphère Beijing-S₂ est l'atmosphère la plus oxydante chez le modèle *Scnn1b*-Tg alors qu'il s'agit de l'atmosphère Paris-S qui a ces mêmes effets chez les souris *Cftr*^{tm1EUR}. Toutefois en global et dans les deux modèles, les effets les plus importants ont été observés pour une exposition aux atmosphères Paris-S et Beijing-W₁. Plutôt que par la quantité totale en masse des polluants, les études épidémiologiques suggèrent que ces effets seraient conditionnés par la composition chimique fine des particules. En effet, ces atmosphères se démarquent par une forte abondance de carbone organique primaire. Les transformations photochimiques que subissent les aérosols primaires aboutissent à la formation d'aérosols organiques secondaires de tailles, de formes et de compositions différentes (461–463). De par ces propriétés physico-chimiques différentes, plusieurs études ont ainsi montré un potentiel oxydant et inflammatoire plus important des aérosols secondaires en comparaison aux aérosols primaires (464–467). Ceci est à relier aux effets que nous avons observés, quel que soit le modèle de mucoviscidose utilisé, pour les atmosphères Paris-S et Beijing-W₁, atmosphères les plus concentrées en espèces secondaires.

Nous avons par ailleurs pu constater une susceptibilité accrue des souris *Cftr^{tm1EUR}* par rapport aux souris *Scnn1b-Tg*. Pour une exposition à une même atmosphère (Beijing-W₁), les souris *Cftr^{tm1EUR}* ont déclenché une réponse pro-inflammatoire et pro-oxydante dès 18H d'exposition quand l'apparition de cette même réponse était différée après 72H d'exposition chez les souris *Scnn1b-Tg*. Cette différence dans la précocité de la réponse induite pourrait s'expliquer par une inertie plus importante des souris *Scnn1b-Tg* du fait d'un phénotype pulmonaire déjà existant et la nécessité d'un stimulus plus long pour déclencher une réponse de même ampleur. D'autre part, la susceptibilité accrue des souris *Cftr^{tm1EUR}* pourrait aussi en partie être liée à une fréquence respiratoire augmentée comme cela a été observé chez un autre modèle de souris présentant la mutation F508del (399). Nous ne disposons pas des données de fréquence respiratoire car celle-ci n'est pas mesurable par le flexiVentTM. Cette augmentation de la fréquence respiratoire a également été rapportée chez des patients atteints de mucoviscidose (468,469). Les variations dans la fréquence respiratoire sont importantes à prendre en considération car elles modifient le niveau d'exposition en modulant la dose de polluants inhalés. Ces variations dans la fréquence respiratoire seraient d'autant plus importantes à considérer que la fréquence respiratoire est plus élevée chez les patients mucoviscidosiques en période d'exacerbation (470). Ces exacerbations se caractérisent par une augmentation des expectorations et un déclin de la fonction pulmonaire le plus souvent due à des infections bactériennes. Dans ce contexte d'exacerbation, la réponse inflammatoire mise en place pourrait être aggravée par une exposition concomitante à la pollution atmosphérique qui possède elle-même des effets inflammatoires. Ainsi, les patients atteints de mucoviscidose pourraient être encore plus sensibles aux effets de la pollution en période d'exacerbations comme le suggère les résultats observés chez nos souris infectées. Enfin, le fond génétique des souris pourrait également jouer un rôle sur la sensibilité des souris à la pollution. Wang et al ont en effet montré des atteintes pulmonaires lignée dépendantes chez des souris exposées à des nanotubes de carbone (471). D'autre part, différentes lignées congéniques de souris *Scnn1b-Tg* construites sur des fonds génétiques différents présentent des différences dans la sévérité du phénotype pulmonaire (383). Plus particulièrement, la mortalité néonatale due à une obstruction des voies respiratoires par le mucus est la plus élevée dans la lignée congénique FVB, de fond génétique identique à celui du modèle *Cftr^{tm1EUR}*, alors qu'elle est la plus faible dans la lignée congénique C57BL/6NJ, fond génétique du modèle *Scnn1b-Tg* que nous utilisons. L'hétérogénéité génétique entre les modèles pourrait donc conditionner la précocité de la réponse déclenchée.

Nous rappelons que les souris *Scnn1b*-Tg constituent un modèle de stade avancé de la mucoviscidose alors que les souris *Cftr*^{m1EUR} en constituent un stade précoce. Remis dans leur contexte, mes résultats suggèrent tout d'abord une plus grande susceptibilité des patients atteints de mucoviscidose par rapport à des patients sains dans le déclenchement d'une réponse suite à une exposition à la pollution. Dans un second temps, la précocité de la réponse observée dans le modèle *Cftr*^{m1EUR} pourrait suggérer une plus grande sensibilité des patients pour lesquels les atteintes pulmonaires ne sont pas encore installées. Cette plus grande sensibilité ne serait observée que lors des premières heures d'exposition à la pollution. Passé cette période, au cours de laquelle des réponses protectrices tenteraient de se mettre en place, les patients auraient tous la même sensibilité mais ceux avec un phénotype pulmonaire déjà installé seraient plus sujets à une obstruction de leurs voies respiratoires par le mucus et donc possiblement à des épisodes d'exacerbations.

CHAPITRE VI

VI. Conclusions et perspectives

L'objectif de cette thèse était d'étudier, par une approche expérimentale, les effets d'une exposition à la pollution atmosphérique chez deux modèles murins de mucoviscidose. Par l'utilisation de deux modèles différents, nous tentions de répondre à deux problématiques distinctes : la pollution atmosphérique aggrave-t-elle un phénotype pulmonaire déjà existant d'une part, et la pollution atmosphérique participe-t-elle à la mise en place d'un phénotype pulmonaire d'autre part ?

L'utilisation de la chambre CESAM pour la simulation en laboratoire des différentes atmosphères d'étude visait à placer les modèles pré-cliniques dans un contexte d'exposition réaliste. Le but de ce travail était ensuite d'établir un inventaire des effets engendrés par une exposition aiguë à des atmosphères urbaines réalistes, cet inventaire étant établi sur les éléments caractéristiques de la physiopathologie de la mucoviscidose.

Nous avons ainsi pu montrer chez les souris exposées le **développement d'une réponse commune pro-inflammatoire, pro-oxydante et pro-protéasique**. La présence d'un phénotype pulmonaire caractéristique de mucoviscidose est par ailleurs responsable d'une susceptibilité accrue des souris dans le déclenchement de cette réponse. De même, la présence d'une mutation sur le gène *Cftr* est suffisante pour sensibiliser les souris pour la mise en place de cette réponse. Finalement, ces résultats indiquent que **la pollution atmosphérique contribue à la physiopathologie de la mucoviscidose en augmentant la sévérité de la maladie par l'exacerbation d'un phénotype pulmonaire déjà en place, mais également en participant à l'instauration d'un contexte favorable préfigurant la mise en place d'atteintes pulmonaires**. L'intensité de ces effets est toutefois influencée par la composition chimique des différentes atmosphères urbaines simulées, les effets les plus intenses étant observés pour les atmosphères les plus denses en composés secondaires. Ceci souligne l'importance de considérer la pollution atmosphérique dans son ensemble dans ce type d'études ainsi que dans les études épidémiologiques (c'est-à-dire comme un mélange multiphasique dynamique de plusieurs milliers de polluants), et non selon une approche expérimentale ou épidémiologique centrée sur un seul polluant. La réactivité chimique induite par ce mélange multi-polluants conditionne la formation de polluants secondaires, chacun aux propriétés physico-chimiques modifiées qui lui confère une bio-réactivité propre et différente de celles des polluants primaires.

Si nous avons pu observer, voire relier les causes aux effets, nous n'avons pas pu identifier les composés responsables des effets observés, ce qui n'était cependant pas visé. Il s'agit du prochain défi à relever, l'identification de tels composés devant à l'avenir permettre

de guider les recommandations à destination des patients, et notamment les comportements à adopter lors de pics de pollution.

J'ai pu au cours des derniers mois de mes travaux envisager **plusieurs perspectives** qui m'apparaissent découler de mes conclusions. Je les ai ordonnées en 3 catégories :

1/ Améliorer les simulations en laboratoire des atmosphères

Bien évidemment, comme déjà évoqué, la simulation d'une atmosphère réelle en laboratoire est par construction une approximation, ne serait-ce que parce que le mélange complexe généré ne peut représenter qu'une seule couche de l'atmosphère (altitude), alors que les échanges entre les différentes couches de l'atmosphère influent sur les compositions de ces couches. Néanmoins nous avons montré l'intérêt de s'approcher d'une composition multiphasique réaliste, en mettant en évidence l'impact de la synergie des différents polluants sur plusieurs paramètres biologiques. Il est donc essentiel de 1/ **représenter le plus fidèlement possible** les espèces les plus réactives, et 2/ de **générer les espèces « manquantes »** du puzzle atmosphérique. Sur ces deux points les priorités sont : 1/ de mieux représenter l'Aérosol Organique Secondaire en accroissant sa part de *Primary Organic compounds* et de *Secondary Organic compounds* ce qui nécessitera de diminuer la fraction introduite de sels inorganiques au profit de COVs insaturés, aptes à produire de l'AOS, et d'augmenter le temps de résidence du mélange réactionnel dans CESAM pour aller plus loin dans la complexification du carbone, 2a/ d'introduire dans l'isolateur d'exposition à l'atmosphère polluée des aérosols primaires carbonés directement issus de combustions (combustion de biomasse, de produits pétroliers...), mais aussi 2b/ d'éventuellement dimensionner l'introduction de super-oxydant comme l'O₃ au plus près des souris aux niveaux « de fond » des atmosphères simulées.

2/ Améliorer les diagnostics biologiques afin de qualifier plus finement les effets et les mécanismes associés

Nous avons focalisé nos diagnostics biologiques sur 3 des 4 piliers physiopathologiques des atteintes pulmonaires de la mucoviscidose : obstruction des bronches, inflammation, et remodelage pulmonaire. À ces manifestations, nous avons ajouté l'étude du stress oxydant, considéré comme le point d'entrée des effets de la pollution atmosphérique sur la santé et dont l'implication dans la physiopathologie de la mucoviscidose est également bien documentée. Les graphiques de type radar élaborés pendant cette thèse, en qualité d'outils diagnostic, gagneraient en robustesse et pertinence à travers 3 perspectives majeures : 1/ des

développements expérimentaux ciblés, comme par exemple a) l'utilisation de la cytométrie en flux visant à établir une différenciation fine des différentes populations cellulaires inflammatoires pulmonaires, b) la recherche de marqueurs de stress oxydant (peroxydation lipidique, carbonylation des protéines, oxydation de l'ADN) en plus de l'étude d'une gamme plus large des protéines pro- et antioxydantes, c) la mesure de l'activité enzymatique des protéases pulmonaires afin d'évaluer la potentialisation du remodelage pulmonaire ou encore d) des tests de fonction pulmonaire longitudinaux pour mieux qualifier la mise en place des atteintes pulmonaires fonctionnelles de la maladie en réponse à des expositions à la pollution atmosphérique ; 2/ **l'étude du pilier "infection"**, élément central des épisodes d'exacerbations et de la progression de la maladie, qui n'a pas été étudié dans ma thèse car nous souhaitons nous focaliser sur les effets de la pollution *per se* sur les atteintes pulmonaires de la mucoviscidose (dans ce contexte, des stimulations infectieuses des modèles murins peuvent être envisagées) ; et 3/ des **études mécanistiques *in vitro*** (monocultures, co-cultures, organoïdes générés à partir de nos modèles murins mais aussi de patients) pour expliciter les mécanismes moléculaires impliqués dans les effets observés *in vitro*.

3/ Aller vers des expositions plus représentatives, réalistes et des simulations plus complètes de l'exposome

Le travail jusqu'ici réalisé a pour contour l'étude des effets d'une exposition aiguë sur le phénotype pulmonaire de la mucoviscidose, et avec des niveaux de pollution relativement modérés pour la plupart (ou un « bruit de fond » élevé). Trois grands axes de perspectives sont à envisager dans ce contexte : 1/ aller vers des **expositions plus représentatives** - Il s'agit ici d'améliorer la complexité des sources de polluants, en utilisant par exemple une seconde chambre de simulation permettant la combustion de biomasse afin de générer d'autres types de particules, et notamment reproduire la fraction des composés aromatiques polycycliques ; 2/ aller vers des **expositions plus réalistes** - Au vu de la baisse régulière, même si très lente, des niveaux de pollution auxquels sont soumis les populations urbaines à travers le monde, il sera d'intérêt d'investiguer les effets engendrés par une exposition chronique et répétée chez les mêmes modèles murins, plus représentative d'une exposition urbaine « moyennée ». A titre d'illustration, une exposition une semaine sur 3 pendant 6 mois peut être envisagée ; et enfin 3/ aller vers des **expositions plus complètes** - L'exposition à la pollution de l'air ne constitue qu'un seul élément des multiples expositions auxquelles nous sommes confrontés tout au long de notre vie (qu'elles soient d'origines environnementales ou liées au statut socio-économique, au mode

de vie, à l'âge, au sexe, ...). L'implémentation de ces différentes expositions, qui définissent l'exposome, dans notre montage expérimental élèverait au final le niveau de pertinence de nos recherches.

VII. Valorisation de la thèse

Participation aux congrès scientifiques - Posters et communications orales

- | | |
|--|---------------------|
| (1) Février 2020 Paris, Association Vaincre La Mucoviscidose, Colloque Français des Jeunes Chercheurs | Communication orale |
| (2) Mars 2021, Association Vaincre La Mucoviscidose, Colloque Français des Jeunes Chercheurs | Poster (en ligne) |
| (3) Octobre 2021 Brest, Société de Pneumologie de Langue Française, Journées de Recherche Respiratoire | Poster |
| (4) Décembre 2021 Paris, Colloque de restitution des actions du DIM Qi ² sur la période 2017-2021 | Communication orale |
| (5) Février 2022 Créteil, Journées Sciences de la Vie de Créteil | Poster |
| (6) Mai 2022 San Francisco Etats-Unis, Congrès de l'American Thoracic Society | Poster |
| (7) Septembre 2022 Barcelone Espagne, Congrès de l'European Respiratory Society | Communication orale |

Publications

- Revue bibliographique

The Impact of Air Pollution on the Course of Cystic Fibrosis: A Review, *Frontiers in Physiology*, Juin 2022

Marion Blayac, Patrice Coll, Valérie Urbach, Pascale Fanen, Ralph Epaud, Sophie Lanone

Autres communications

(1) Septembre 2022 Athènes Grèce, 11th International Conference

HOW TO SIMULATE AT THE LABORATORY REALISTIC EPISODES OF MULTIPHASIC ATMOSPHERIC POLLUTION FOR HEALTH IMPACT STUDIES

J.C. Macias Rodriguez, M.Cazaunau, A.Bergé, E.Pangui, **M.Blayac**, S.Lanone and P.Coll

(2) Juillet 2022 Paris, International Summer School on Environment and Planetary Health

EVALUATION OF THE COMBINED EFFECT OF EXPOSURE TO AIR POLLUTION AND SOCIAL STRESS IN PULMONARY MANIFESTATION OF CYSTIC FIBROSIS DISEASE

Yegen C-H, **Blayac M**, Buissot C, Epaud R, Coll P, Pandis S.N, Coll I, Lanone S

(3) Mai 2022 Barcelone Espagne, European Human Exposome Network (EHEN) scientific meeting

EVALUATION OF THE COMBINED EFFECT OF EXPOSOME ELEMENTS PULMONARY MANIFESTATION OF CYSTIC FIBROSIS DISEASE

Céline-Hivda Yegen, **Blayac M**, Buissot C, Epaud R, Coll P, Pandis S.N, Coll P, Lanone S

(4) Juin 2022 Thessalonique Grèce, 13th International Conference on Air Quality, Science and Applications

IMPACT OF URBAN AIR QUALITY ON HEALTH STUDIED AT THE LABORATORY: THE POLLURISK PLATFORM

Al Marj E., Coll P., Cazaunau M., Bergé A., Gratien A., Bertin T., Pangui E., Gaimoz C., **Blayac M**, Lu Z., Der Vartanian A., Jamain S., Chevaillier S., Noyalet G., Doussin J.-F., Coll I. and Lanone S.

(5) Juin 2022 Thessalonique Grèce, 13th International Conference on Air Quality, Science and Applications

IMPACT OF URBAN AIR QUALITY ON HEALTH STUDIED AT THE LABORATORY WITH THE POLLURISK PLATFORM: PRELIMINARY RESULTS OF INNOVATIVE STUDIES AT THE LABORATORY

Coll P., **Blayac M.**, Lu Z., Der Vartanian A., Jamain S., Relaix F., Derumeaux G., Cazaunau M., Bergé A., Al Marj E., Gratien A., Bertin T., Pangui E., Gaimoz C., Chevaillier S., Noyalet G., Doussin J.-F. and Lanone S.

(6) Mai 2022 Paris, Congrès Français sur les Aérosols - CFA

SIMULATION D'ATMOSPHÈRES URBAINES MULTIPHASIQUES POUR L'ÉTUDE DES EFFETS SUR LA SANTÉ : ANALYSE QUALITATIVE DES AÉROSOLS ORGANIQUES SECONDAIRES GNÉRÉS

Al Marj E., Coll P., Gratien A., Bertin T., Cazaunau M., Pangui E., Bergé A., Gaimoz C., **Blayac M.** et Lanone S.

(7) Novembre 2020 Lille, Congrès de la SFSE « Multiexpositions, conditions de vie et santé : de la connaissance à l'action »

LES CHAMBRES DE SIMULATION ATMOSPHERIQUE : UN ATOUT POUR ETUDIER LES IMPACTS DE LA POLLUTION ATMOSPHERIQUE SUR LA SANTÉ.

Al Marj E., Coll P., Cazaunau M., Doussin J.F., Gratien A., Pangui E., Bergé A., Di Biagio C., Coll I., Foret G., Coman A., **Blayac M.**, Lu Z. et Lanone S.

(8) Mai 2020 Vienne Autriche, EGU General Assembly

HOW ATMOSPHERIC SIMULATION CHAMBERS CAN HELP TO INVESTIGATE THE IMPACT OF AIR QUALITY ON HEALTH

Coll P., Cazaunau M., Doussin J.F., Pangui E., Gratien A., Formenti P., Coll I., Foret G., Gaimoz C., Michoud V., Di Biagio C., Al Marj E., **Blayac M.**, Lu Z., Der Vartanian A., Jamain S., Derumeaux G., Pini M., Relaix F., Boczkowski J. and Lanone S.

(9) Mai 2020 Thessalonique Grèce, 12th International Conference on Air Quality, Science and Applications

HOW ATMOSPHERIC SIMULATION CHAMBERS CAN HELP TO INVESTIGATE THE IMPACT OF AIR QUALITY ON HEALTH

Coll P., Cazaunau M., Doussin J.F., Pangui E., Gratien A., Formenti P., Coll I., Foret G., Gaimoz C., Michoud V., Di Biagio C., Al Marj E., **Blayac M.**, Lu Z., Der Vartanian A., Jamain S., Derumeaux G., Pini M., Hüe S., Relaix F., Boczkowski J. and Lanone S.

(10) Décembre 2019 Pretoria Afrique du Sud, South African Science and Innovation Days

ATMOSPHERIC CHEMISTRY AND AEROSOLS: HOW ATMOSPHERIC SIMULATION CHAMBERS CAN ADDRESS AIR QUALITY'S IMPACT ON HEALTH

Coll P., Cazaunau M., Doussin J.F., Pangui E., Gratien A., Formenti P., Coll I., Foret G., Gaimoz C., Michoud V., Di Biagio C., Al Marj E., **Blayac M.**, Lu Z., Der Vartanian A., Jamain S., Derumeaux G., Pini M., Hüe S., Relaix F., Boczkowski J. and Lanone S.

Références

1. Andersen DH. Cystic Fibrosis of the pancreas and its relation to celiac disease. *Am J Dis Child.* 1 août 1938;56(2):344-99.
2. Cystic Fibrosis Foundation. Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry 2020 Annual Data Report. Bethesda, Maryland; 2021.
3. Cystic Fibrosis Canada. The Canadian Cystic Fibrosis Registry 2020 Annual Data Report. Toronto, Canada; 2022.
4. Zolin A, Orenti A, Naehrlich L, van Rens J, Fox A, Krasnyk M, et al. ECFSPR Annual Report 2020. 2022.
5. Cystic Fibrosis Trust. UK Cystic Fibrosis Registry 2020 Annual Data Report. 2021.
6. Vaincre la Mucoviscidose. Registre français de la mucoviscidose – Bilan des données 2020. Paris; 2022 janv.
7. Farrell PM. The prevalence of cystic fibrosis in the European Union. *Journal of Cystic Fibrosis.* 1 sept 2008;7(5):450-3.
8. Mirtajani. Geographical distribution of cystic fibrosis; The past 70 years of data analyzis. 2017;1(2):105-12.
9. Yamashiro Y, Shimizu T, Oguchi S, Shioya T, Nagata S, Ohtsuka Y. The Estimated Incidence of Cystic Fibrosis in Japan. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* mai 1997;24(5):544-7.
10. Guo X, Liu K, Liu Y, Situ Y, Tian X, Xu KF, et al. Clinical and genetic characteristics of cystic fibrosis in Chinese patients: a systemic review of reported cases. *Orphanet J Rare Dis.* déc 2018;13(1):224.
11. De Boeck K, Wilschanski M, Castellani C, Taylor C, Cuppens H, Dodge J, et al. Cystic fibrosis: terminology and diagnostic algorithms. *Thorax.* juill 2006;61(7):627-35.
12. Farrell PM, White TB, Ren CL, Hempstead SE, Accurso F, Derichs N, et al. Diagnosis of Cystic Fibrosis: Consensus Guidelines from the Cystic Fibrosis Foundation. *The Journal of Pediatrics.* févr 2017;181:S4-S15.e1.
13. Shteinberg M, Haq IJ, Polineni D, Davies JC. Cystic fibrosis. *The Lancet.* juin 2021;397(10290):2195-211.
14. Southern KW, Munck A, Pollitt R, Travert G, Zanolla L, Dankert-Roelse J, et al. A survey of newborn screening for cystic fibrosis in Europe. *Journal of Cystic Fibrosis.* janv 2007;6(1):57-65.
15. Wagener JS, Zemanick ET, Sontag MK. Newborn screening for cystic fibrosis. *Current Opinion in Pediatrics.* juin 2012;24(3):329-35.
16. Liu Y, Wang L, Tian X, Xu KF, Xu W, Li X, et al. Characterization of gene mutations and phenotypes of cystic fibrosis in Chinese patients. *Respirology.* 2015;20(2):312-8.
17. Zheng B, Cao L. Differences in gene mutations between Chinese and Caucasian cystic fibrosis patients: Differences Between Chinese and Caucasian CF. *Pediatr Pulmonol.* mars 2017;52(3):E11-4.

18. Mei-Zahav M. The prevalence and clinical characteristics of cystic fibrosis in South Asian Canadian immigrants. *Archives of Disease in Childhood*. 1 juill 2005;90(7):675-9.
19. Singh M, Rebordosa C, Bernholz J, Sharma N. Epidemiology and genetics of cystic fibrosis in Asia: In preparation for the next-generation treatments. *Respirology*. 2015;20(8):1172-81.
20. The Cystic Fibrosis Registry of Ireland. 2020 Annual Report CF Registry of Ireland. 2020.
21. Bergeron C, Cantin AM. New Therapies to Correct the Cystic Fibrosis Basic Defect. *Int J Mol Sci*. 8 juin 2021;22(12):6193.
22. Burgel PR, Bellis G, Olesen HV, Viviani L, Zolin A, Blasi F, et al. Future trends in cystic fibrosis demography in 34 European countries. *Eur Respir J*. juill 2015;46(1):133-41.
23. Rommens J, Iannuzzi M, Kerem B, Drumm M, Melmer G, Dean M, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science*. 8 sept 1989;245(4922):1059.
24. Rommens JM. Cystic Fibrosis Mutation Database [Internet]. 2011 [cité 30 janv 2021]. Disponible sur: <http://www.genet.sickkids.on.ca/StatisticsPage.html>
25. Welsh MJ, Smith AE. Molecular mechanisms of CFTR chloride channel dysfunction in cystic fibrosis. *Cell*. 2 juill 1993;73(7):1251-4.
26. Boyle MP, De Boeck K. A new era in the treatment of cystic fibrosis: correction of the underlying CFTR defect. *The Lancet Respiratory Medicine*. avr 2013;1(2):158-63.
27. Haardt M, Benharouga M, Lechardeur D, Kartner N, Lukacs GL. C-terminal Truncations Destabilize the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator without Impairing Its Biogenesis: a novel class of mutation. *Journal of Biological Chemistry*. 30 juill 1999;274(31):21873-7.
28. Cystic Fibrosis Mutation Database [Internet]. [cité 2 avr 2020]. Disponible sur: <http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/>
29. Lao O, Andrés AM, Mateu E, Bertranpetit J, Calafell F. Spatial patterns of cystic fibrosis mutation spectra in European populations. *European Journal Of Human Genetics*. 7 mai 2003;11:385.
30. De Boeck K, Zolin A, Cuppens H, Olesen HV, Viviani L. The relative frequency of CFTR mutation classes in European patients with cystic fibrosis. *Journal of Cystic Fibrosis*. 1 juill 2014;13(4):403-9.
31. Estivill X, Bancells C, Ramos C. Geographic distribution and regional origin of 272 cystic fibrosis mutations in European populations. The Biomed CF Mutation Analysis Consortium. *Hum Mutat*. 1997;10(2):135-54.
32. Walters S, Mehta A. Epidemiology of Cystic Fibrosis. In: *Cystic Fibrosis, Third Edition*. 3rd éd. London: Edward Arnold; 2007.

33. Wang YQ, Hao CL, Jiang WJ, Lu YH, Sun HQ, Gao CY, et al. c.753_754delAG, a novel CFTR mutation found in a Chinese patient with cystic fibrosis: A case report and review of the literature. *WJCC*. 6 août 2019;7(15):2110-9.
34. Xu J, Yin Y, Zhang L, Zhang J, Yuan S, Zhang H. Four case reports of Chinese cystic fibrosis patients and literature review. *Pediatric Pulmonology*. 2017;52(8):1020-8.
35. Wang Y, Liu J, Yang X, Yan H, Zhang Y. Chinese data of the CFTR mutation: a report from West China Hospital and literature review. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*. juin 2018;9.
36. Cant N, Pollock N, Ford RC. CFTR structure and cystic fibrosis. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 1 juill 2014;52:15-25.
37. Hunt JF, Wang C, Ford RC. Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (ABCC7) Structure. *Cold Spring Harb Perspect Med*. févr 2013;3(2).
38. Csanády L, Vergani P, Gadsby DC. Structure, Gating, and Regulation of the CFTR Anion Channel. *Physiological Reviews*. 5 déc 2018;99(1):707-38.
39. Dean M, Allikmets R. Complete Characterization of the Human ABC Gene Family. *J Bioenerg Biomembr*. 1 déc 2001;33(6):475-9.
40. Gadsby DC, Vergani P, Csanády L. The ABC protein turned chloride channel whose failure causes cystic fibrosis. *Nature*. mars 2006;440(7083):477-83.
41. Miller C. CIC chloride channels viewed through a transporter lens. *Nature*. mars 2006;440(7083):484-9.
42. Linsdell P. Anion conductance selectivity mechanism of the CFTR chloride channel. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 1 avr 2016;1858(4):740-7.
43. Tang L, Fatehi M, Linsdell P. Mechanism of direct bicarbonate transport by the CFTR anion channel. *Journal of Cystic Fibrosis*. 1 mars 2009;8(2):115-21.
44. Bridges RJ. Mechanisms of Bicarbonate Secretion: Lessons from the Airways. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 8 janv 2012;2(8):a015016.
45. Vankeerberghen A, Cuppens H, Cassiman JJ. The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator: an intriguing protein with pleiotropic functions. *Journal of Cystic Fibrosis*. 1 mars 2002;1(1):13-29.
46. Stutts MJ, Canessa CM, Olsen JC, Hamrick M, Cohn JA, Rossier BC, et al. CFTR as a cAMP-dependent regulator of sodium channels. *Science*. 11 août 1995;269(5225):847-50.
47. Boucher RC. Airway surface dehydration in cystic fibrosis: pathogenesis and therapy. *Annu Rev Med*. 2007;58:157-70.
48. Matsui H, Davis CW, Tarran R, Boucher RC. Osmotic water permeabilities of cultured, well-differentiated normal and cystic fibrosis airway epithelia. *J Clin Invest*. 15 mai 2000;105(10):1419-27.

49. Tarran R, Grubb BR, Gatzky JT, Davis CW, Boucher RC. The Relative Roles of Passive Surface Forces and Active Ion Transport in the Modulation of Airway Surface Liquid Volume and Composition. *J Gen Physiol.* 1 août 2001;118(2):223-36.
50. Knowles M, Gatzky J, Boucher R. Increased Bioelectric Potential Difference across Respiratory Epithelia in Cystic Fibrosis. *New England Journal of Medicine.* 17 déc 1981;305(25):1489-95.
51. Boucher RC, Stutts MJ, Knowles MR, Cantley L, Gatzky JT. Na⁺ transport in cystic fibrosis respiratory epithelia. Abnormal basal rate and response to adenylate cyclase activation. *J Clin Invest.* nov 1986;78(5):1245-52.
52. Boucher RC. Cystic fibrosis: a disease of vulnerability to airway surface dehydration. *Trends in Molecular Medicine.* 2007;13(6):231-40.
53. Quinton PM. Chloride impermeability in cystic fibrosis. *Nature.* févr 1983;301(5899):421-2.
54. Boucher RC, Cotton CU, Gatzky JT, Knowles MR, Yankaskas JR. Evidence for reduced Cl⁻ and increased Na⁺ permeability in cystic fibrosis human primary cell cultures. *The Journal of Physiology.* 1 nov 1988;405(1):77-103.
55. Li M, McCann JD, Liedtke CM, Nairn AC, Greengard P, Welsh MJ. Cyclic AMP-dependent protein kinase opens chloride channels in normal but not cystic fibrosis airway epithelium. *Nature.* janv 1988;331(6154):358-60.
56. Matsui H, Grubb BR, Tarran R, Randell SH, Gatzky JT, Davis CW, et al. Evidence for Periciliary Liquid Layer Depletion, Not Abnormal Ion Composition, in the Pathogenesis of Cystic Fibrosis Airways Disease. *Cell.* 23 déc 1998;95(7):1005-15.
57. Bhaskar KR, Gong DH, Bansil R, Pajevic S, Hamilton JA, Turner BS, et al. Profound increase in viscosity and aggregation of pig gastric mucin at low pH. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology.* 1 nov 1991;261(5):G827-32.
58. Quinton PM. Cystic fibrosis: impaired bicarbonate secretion and mucoviscidosis. *The Lancet.* 2 août 2008;372(9636):415-7.
59. Chen EYT, Yang N, Quinton PM, Chin WC. A new role for bicarbonate in mucus formation. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology.* 6 août 2010;299(4):L542-9.
60. Gustafsson JK, Ermund A, Ambort D, Johansson MEV, Nilsson HE, Thorell K, et al. Bicarbonate and functional CFTR channel are required for proper mucin secretion and link cystic fibrosis with its mucus phenotype. *J Exp Med.* 2 juill 2012;209(7):1263-72.
61. O'Sullivan BP, Freedman SD. Cystic fibrosis. *The Lancet.* 30 mai 2009;373(9678):1891-904.
62. Elborn JS. Cystic fibrosis. *The Lancet.* 2016;388(10059):2519-31.
63. Scaparrotta A, Pillo SD, Attanasi M, Consilvio NP, Cingolani A, Rapino D, et al. Growth failure in children with cystic fibrosis. *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism*

- [Internet]. 1 janv 2012 [cité 11 août 2022];25(5-6). Disponible sur: <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/jpem-2012-0012/html>
64. Sly PD, Brennan S, Gangell C, de Klerk N, Murray C, Mott L, et al. Lung disease at diagnosis in infants with cystic fibrosis detected by newborn screening. *Am J Respir Crit Care Med*. 15 juill 2009;180(2):146-52.
 65. Khan TZ, Wagener JS, Bost T, Martinez J, Accurso FJ, Riches DWH. Early Pulmonary Inflammation in Infants with Cystic Fibrosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* [Internet]. 20 mars 2013 [cité 17 avr 2020]; Disponible sur: <https://www-atsjournals-org.proxy.insermbiblio.inist.fr/doi/pdf/10.1164/ajrccm/151.4.1075>
 66. Ranganathan SC, Hall GL, Sly PD, Stick SM. Early Lung Disease in Infants and Preschool Children with Cystic Fibrosis. What Have We Learned and What Should We Do about It? *Am J Respir Crit Care Med*. 15 juin 2017;195(12):1567-75.
 67. Ferkol T, Rosenfeld M, Milla CE. Cystic fibrosis pulmonary exacerbations. *The Journal of Pediatrics*. 2006;148(2):259-64.
 68. Stanford GE, Dave K, Simmonds NJ. Pulmonary Exacerbations in Adults With Cystic Fibrosis: A Grown-up Issue in a Changing Cystic Fibrosis Landscape. *CHEST*. 2021;159(1):93-102.
 69. Sanders DB, Bittner RCL, Rosenfeld M, Hoffman LR, Redding GJ, Goss CH. Failure to Recover to Baseline Pulmonary Function after Cystic Fibrosis Pulmonary Exacerbation. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010;182(5):627-32.
 70. Sanders DB, Bittner RC, Rosenfeld M, Redding GJ, Goss CH. Pulmonary exacerbations are associated with subsequent FEV1 decline in both adults and children with cystic fibrosis. *Pediatric Pulmonology*. 2011;46(4):393-400.
 71. de Boer K, Vandemheen KL, Tullis E, Doucette S, Fergusson D, Freitag A, et al. Exacerbation frequency and clinical outcomes in adult patients with cystic fibrosis. *Thorax*. 1 août 2011;66(8):680-5.
 72. Waters V, Stanojevic S, Atenafu EG, Lu A, Yau Y, Tullis E, et al. Effect of pulmonary exacerbations on long-term lung function decline in cystic fibrosis. *European Respiratory Journal*. 1 juill 2012;40(1):61-6.
 73. Kerem E, Reisman J, Corey M, Canny GJ, Levison H. Prediction of Mortality in Patients with Cystic Fibrosis. *N Engl J Med*. 30 avr 1992;326(18):1187-91.
 74. Raviv U, Giasson S, Kampf N, Gohy JF, Jérôme R, Klein J. Lubrication by charged polymers. *Nature*. sept 2003;425(6954):163-5.
 75. Button B, Cai LH, Ehre C, Kesimer M, Hill DB, Sheehan JK, et al. A Periciliary Brush Promotes the Lung Health by Separating the Mucus Layer from Airway Epithelia. *Science*. 24 août 2012;337(6097):937-41.
 76. Randell SH, Boucher RC. Effective Mucus Clearance Is Essential for Respiratory Health. *Am J Respir Cell Mol Biol*. juill 2006;35(1):20-8.

77. Knowles MR, Boucher RC. Mucus clearance as a primary innate defense mechanism for mammalian airways. *J Clin Invest.* mars 2002;109(5):571-7.
78. Douglas TA, Brennan S, Gard S, Berry L, Gangell C, Stick SM, et al. Acquisition and eradication of *P. aeruginosa* in young children with cystic fibrosis. *European Respiratory Journal.* 1 févr 2009;33(2):305-11.
79. Hurley MN, McKeever TM, Prayle AP, Fogarty AW, Smyth AR. Rate of improvement of CF life expectancy exceeds that of general population—Observational death registration study. *J Cyst Fibros.* juill 2014;13(4):410-5.
80. Breuer O, Schultz A, Turkovic L, de Klerk N, Keil AD, Brennan S, et al. Changing Prevalence of Lower Airway Infections in Young Children with Cystic Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* sept 2019;200(5):590-9.
81. Konstan MW, Morgan WJ, Butler SM, Pasta DJ, Craib ML, Silva SJ, et al. Risk factors for rate of decline in forced expiratory volume in one second in children and adolescents with cystic fibrosis. *J Pediatr.* août 2007;151(2):134-9, 139.e1.
82. Konstan MW, Wagener JS, Vandevanter DR, Pasta DJ, Yegin A, Rasouliyan L, et al. Risk factors for rate of decline in FEV1 in adults with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros.* sept 2012;11(5):405-11.
83. Mézinèle J, Ruffin M, Kemgang A, Guillot L, Boëlle PY, Corvol H. Risk factors for *Pseudomonas aeruginosa* airway infection and lung function decline in children with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros.* janv 2022;21(1):45-51.
84. Ganz T. Antimicrobial polypeptides in host defense of the respiratory tract. *J Clin Invest.* 15 mars 2002;109(6):693-7.
85. Worlitzsch D, Tarran R, Ulrich M, Schwab U, Cekici A, Meyer KC, et al. Effects of reduced mucus oxygen concentration in airway *Pseudomonas* infections of cystic fibrosis patients. *J Clin Invest.* 1 févr 2002;109(3):317-25.
86. Hassett DJ, Cuppoletti J, Trapnell B, Lyman SV, Rowe JJ, Sun Yoon S, et al. Anaerobic metabolism and quorum sensing by *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in chronically infected cystic fibrosis airways: rethinking antibiotic treatment strategies and drug targets. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 5 déc 2002;54(11):1425-43.
87. Yoon SS, Hennigan RF, Hilliard GM, Ochsner UA, Parvatiyar K, Kamani MC, et al. *Pseudomonas aeruginosa* Anaerobic Respiration in Biofilms: Relationships to Cystic Fibrosis Pathogenesis. *Developmental Cell.* 1 oct 2002;3(4):593-603.
88. Li Z, Kosorok MR, Farrell PM, Laxova A, West SEH, Green CG, et al. Longitudinal Development of Mucoïd *Pseudomonas aeruginosa* Infection and Lung Disease Progression in Children With Cystic Fibrosis. *JAMA.* 2 févr 2005;293(5):581-8.
89. Pritt B, O'Brien L, Winn W. Mucoïd *Pseudomonas* in Cystic Fibrosis. *American Journal of Clinical Pathology.* 1 juill 2007;128(1):32-4.
90. Matsui H, Verghese MW, Kesimer M, Schwab UE, Randell SH, Sheehan JK, et al. Reduced Three-Dimensional Motility in Dehydrated Airway Mucus Prevents Neutrophil Capture

- and Killing Bacteria on Airway Epithelial Surfaces. *J Immunol.* 15 juill 2005;175(2):1090-9.
91. Matsui H, Wagner VE, Hill DB, Schwab UE, Rogers TD, Button B, et al. A physical linkage between cystic fibrosis airway surface dehydration and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Proc Natl Acad Sci USA.* 28 nov 2006;103(48):18131-6.
 92. Garland AL, Walton WG, Coakley RD, Tan CD, Gilmore RC, Hobbs CA, et al. Molecular basis for pH-dependent mucosal dehydration in cystic fibrosis airways. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1 oct 2013;110(40):15973-8.
 93. Song Y, Salinas D, Nielson DW, Verkman AS. Hyperacidity of secreted fluid from submucosal glands in early cystic fibrosis. *Am J Physiol, Cell Physiol.* mars 2006;290(3):C741-749.
 94. Pezzulo AA, Tang XX, Hoegger MJ, Abou Alaiwa MH, Ramachandran S, Moninger TO, et al. Reduced airway surface pH impairs bacterial killing in the porcine cystic fibrosis lung. *Nature.* 4 juill 2012;487(7405):109-13.
 95. Abou Alaiwa MH, Beer AM, Pezzulo AA, Launspach JL, Horan RA, Stoltz DA, et al. Neonates with cystic fibrosis have a reduced nasal liquid pH; A small pilot study. *Journal of Cystic Fibrosis.* 1 juill 2014;13(4):373-7.
 96. Simonin J, Bille E, Crambert G, Noel S, Dreano E, Edwards A, et al. Airway surface liquid acidification initiates host defense abnormalities in Cystic Fibrosis. *Sci Rep.* 24 avr 2019;9(1):6516.
 97. Clary-Meinesz C, Mouroux J, Cosson J, Huitorel P, Blaive B. Influence of external pH on ciliary beat frequency in human bronchi and bronchioles. *European Respiratory Journal.* 1 févr 1998;11(2):330-3.
 98. Birket SE, Chu KK, Liu L, Houser GH, Diephuis BJ, Wilsterman EJ, et al. A Functional Anatomic Defect of the Cystic Fibrosis Airway. *Am J Respir Crit Care Med.* 15 août 2014;190(4):421-32.
 99. Tang XX, Ostedgaard LS, Hoegger MJ, Moninger TO, Karp PH, McMenimen JD, et al. Acidic pH increases airway surface liquid viscosity in cystic fibrosis. *The Journal of clinical investigation.* 1 mars 2016;126(3):879-91.
 100. Schlesinger RB, Fine JM, Chen LC. Interspecies Differences in the Phagocytic Activity of Pulmonary Macrophages Subjected to Acidic Challenge. *Toxicol Sci.* 1992;19(4):584-9.
 101. Di A, Brown ME, Deriy LV, Li C, Szeto FL, Chen Y, et al. CFTR regulates phagosome acidification in macrophages and alters bactericidal activity. *Nat Cell Biol.* sept 2006;8(9):933-44.
 102. Porto PD, Cifani N, Guarnieri S, Di Domenico EG, Mariggiò MA, Spadaro F, et al. Dysfunctional CFTR Alters the Bactericidal Activity of Human Macrophages against *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS One [Internet].* 18 mai 2011 [cité 10 avr 2020];6(5). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3097223/>

103. Nakayama K, Jia YX, Hirai H, Shinkawa M, Yamaya M, Sekizawa K, et al. Acid Stimulation Reduces Bactericidal Activity of Surface Liquid in Cultured Human Airway Epithelial Cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* janv 2002;26(1):105-13.
104. Berkebile AR, McCray PB. Effects of airway surface liquid pH on host defense in cystic fibrosis. *Int J Biochem Cell Biol.* juill 2014;52:124-9.
105. Dobay O, Laub K, Stercz B, Kéri A, Balázs B, Tóthpál A, et al. Bicarbonate Inhibits Bacterial Growth and Biofilm Formation of Prevalent Cystic Fibrosis Pathogens. *Front Microbiol* [Internet]. 19 sept 2018 [cité 7 avr 2020];9. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6157313/>
106. Roesch EA, Nichols DP, Chmiel JF. Inflammation in cystic fibrosis: An update. *Pediatric Pulmonology.* 2018;53(S3):S30-50.
107. Bonfield TL, Panuska JR, Konstan MW, Hilliard KA, Hilliard JB, Ghnaim H, et al. Inflammatory cytokines in cystic fibrosis lungs. *Am J Respir Crit Care Med.* déc 1995;152(6):2111-8.
108. Nichols DP, Chmiel JF. Inflammation and its genesis in cystic fibrosis. *Pediatric Pulmonology.* 2015;50(S40):S39-56.
109. Dosanjh AK, Elashoff D, Robbins RC. The Bronchoalveolar Lavage Fluid of Cystic Fibrosis Lung Transplant Recipients Demonstrates Increased Interleukin-8 and Elastase and Decreased IL-10. *Journal of Interferon & Cytokine Research.* oct 1998;18(10):851-4.
110. Bonfield TL, Konstan MW, Berger M. Altered respiratory epithelial cell cytokine production in cystic fibrosis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 1 juill 1999;104(1):72-8.
111. Briottet M, Shum M, Urbach V. The Role of Specialized Pro-Resolving Mediators in Cystic Fibrosis Airways Disease. *Front Pharmacol.* 2020;11.
112. Young RL, Malcolm KC, Kret JE, Caceres SM, Poch KR, Nichols DP, et al. Neutrophil Extracellular Trap (NET)-Mediated Killing of *Pseudomonas aeruginosa*: Evidence of Acquired Resistance within the CF Airway, Independent of CFTR. *PLOS ONE.* 1 sept 2011;6(9):e23637.
113. Law SM, Gray RD. Neutrophil extracellular traps and the dysfunctional innate immune response of cystic fibrosis lung disease: a review. *Journal of Inflammation.* 28 déc 2017;14(1):29.
114. Gray RD, Hardisty G, Regan KH, Smith M, Robb CT, Duffin R, et al. Delayed neutrophil apoptosis enhances NET formation in cystic fibrosis. *Thorax.* 1 févr 2018;73(2):134-44.
115. Sagel SD, Sontag MK, Wagener JS, Kapsner RK, Osberg I, Accurso FJ. Induced sputum inflammatory measures correlate with lung function in children with cystic fibrosis. *The Journal of Pediatrics.* 1 déc 2002;141(6):811-7.
116. Mayer-Hamblett N, Aitken ML, Accurso FJ, Kronmal RA, Konstan MW, Burns JL, et al. Association between Pulmonary Function and Sputum Biomarkers in Cystic Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 15 avr 2007;175(8):822-8.

117. Hilliard TN, Regamey N, Shute JK, Nicholson AG, Alton EFWF, Bush A, et al. Airway remodelling in children with cystic fibrosis. *Thorax*. déc 2007;62(12):1074-80.
118. Sagel SD, Wagner BD, Anthony MM, Emmett P, Zemanick ET. Sputum Biomarkers of Inflammation and Lung Function Decline in Children with Cystic Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012;186(9):857-65.
119. Witko-Sarsat V, Delacourt C, Rabier D, Bardet J, Nguyen AT, Descamps-Latscha B. Neutrophil-derived long-lived oxidants in cystic fibrosis sputum. *Am J Respir Crit Care Med*. déc 1995;152(6):1910-6.
120. Chen J, Kinter M, Shank S, Cotton C, Kelley TJ, Ziady AG. Dysfunction of Nrf-2 in CF Epithelia Leads to Excess Intracellular H₂O₂ and Inflammatory Cytokine Production. *PLOS ONE*. 10 oct 2008;3(10):e3367.
121. Kettle AJ, Turner R, Gangell CL, Harwood DT, Khalilova IS, Chapman AL, et al. Oxidation contributes to low glutathione in the airways of children with cystic fibrosis. *Eur Respir J*. 1 juill 2014;44(1):122.
122. Ziady AG, Hansen J. Redox balance in Cystic Fibrosis. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2014;52:113-23.
123. Antus B. Oxidative Stress Markers in Sputum. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2016;2016:12.
124. Brennan S, Sly PD, Gangell CL, Sturges N, Winfield K, Wikstrom M, et al. Alveolar macrophages and CC chemokines are increased in children with cystic fibrosis. *European Respiratory Journal*. 1 sept 2009;34(3):655-61.
125. Khan TZ, Wagener JS, Bost T, Martinez J, Accurso FJ, Riches DW. Early pulmonary inflammation in infants with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. avr 1995;151(4):1075-82.
126. Rosen BH, Evans TIA, Moll SR, Gray JS, Liang B, Sun X, et al. Infection Is Not Required for Mucoinflammatory Lung Disease in CFTR-Knockout Ferrets. *Am J Respir Crit Care Med*. 15 mai 2018;197(10):1308-18.
127. Balázs A, Mall MA. Mucus obstruction and inflammation in early cystic fibrosis lung disease: Emerging role of the IL-1 signaling pathway. *Pediatric Pulmonology*. 2019;54(S3):S5-12.
128. Montgomery ST, Mall MA, Kicic A, Stick SM. Hypoxia and sterile inflammation in cystic fibrosis airways: mechanisms and potential therapies. *European Respiratory Journal* [Internet]. 1 janv 2017 [cité 11 août 2022];49(1). Disponible sur: <https://erj.ersjournals.com/content/49/1/1600903>
129. Bernut A, Loynes CA, Floto RA, Renshaw SA. Deletion of cftr Leads to an Excessive Neutrophilic Response and Defective Tissue Repair in a Zebrafish Model of Sterile Inflammation. *Front Immunol*. 2020;11:1733.
130. Mickle JE, Cutting GR. Genotype-Phenotype Relationships in Cystic Fibrosis. *Medical Clinics of North America*. 1 mai 2000;84(3):597-607.

131. McKone EF, Goss CH, Aitken ML. CFTR Genotype as a Predictor of Prognosis in Cystic Fibrosis. *CHEST*. 1 nov 2006;130(5):1441-7.
132. Kerem E, Kerem B. Genotype-phenotype correlations in cystic fibrosis. *Pediatric Pulmonology*. 1996;22(6):387-95.
133. Kerem E, Corey M, Kerem B sheva, Rommens J, Markiewicz D, Levison H, et al. The Relation between Genotype and Phenotype in Cystic Fibrosis — Analysis of the Most Common Mutation ($\Delta F508$). *N Engl J Med*. 1990;323(22):1517-22.
134. Kristidis P, Bozon D, Corey M, Markiewicz D, Rommens J, Tsui LC, et al. Genetic determination of exocrine pancreatic function in cystic fibrosis. *Am J Hum Genet*. juin 1992;50(6):1178-84.
135. Cutting GR. Cystic fibrosis genetics: from molecular understanding to clinical application. *Nat Rev Genet*. janv 2015;16(1):45-56.
136. Wilschanski M, Zielenski J, Markiewicz D, Tsui LC, Corey M, Levison H, et al. Correlation of sweat chloride concentration with classes of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene mutations. *The Journal of Pediatrics*. 1 nov 1995;127(5):705-10.
137. Collaco JM, Blackman SM, Raraigh KS, Corvol H, Rommens JM, Pace RG, et al. Sources of Variation in Sweat Chloride Measurements in Cystic Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 1 déc 2016;194(11):1375-82.
138. Espel JC, Palac HL, Bharat A, Cullina J, Prickett M, Sala M, et al. The relationship between sweat chloride levels and mortality in cystic fibrosis varies by individual genotype. *Journal of Cystic Fibrosis*. 1 janv 2018;17(1):34-42.
139. Santis G, Osborne L, Knight RA, Hodson ME. Independent genetic determinants of pancreatic and pulmonary status in cystic fibrosis. *The Lancet*. 1990;336(8723):1081-4.
140. Burke W, Aitken ML, Chen SH, Scott CR. Variable Severity of Pulmonary Disease in Adults with Identical Cystic Fibrosis Mutations. *Chest*. 1992;102(2):506-9.
141. The Cystic Fibrosis Genotype-Phenotype Consortium. Correlation between Genotype and Phenotype in Patients with Cystic Fibrosis. *N Engl J Med*. 1993;329(18):1308-13.
142. Zielenski J. Genotype and phenotype in cystic fibrosis. *Respiration*. 2000;67(2):117-33.
143. Kulczycki LL, Kostuch M, Bellanti JA. A clinical perspective of cystic fibrosis and new genetic findings: Relationship of CFTR mutations to genotype–phenotype manifestations. *American Journal of Medical Genetics Part A*. 2003;116A(3):262-7.
144. Duguépéroux I, De Braekeleer M, Participating Centres to the French National Cystic Fibrosis Registry. Genotype-phenotype relationship for five CFTR mutations frequently identified in western France. *J Cyst Fibros*. 2004;3(4):259-63.
145. Mekus F, Ballmann M, Bronsveld I, Bijman J, Veeze H, Tümmler B. Categories of $\Delta F508$ homozygous cystic fibrosis twin and sibling pairs with distinct phenotypic characteristics. *twin res*. 1 déc 2000;3(4):277-93.

146. Vanscoy LL, Blackman SM, Collaco JM, Bowers A, Lai T, Naughton K, et al. Heritability of lung disease severity in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 15 mai 2007;175(10):1036-43.
147. Collaco JM, Blackman SM, McGready J, Naughton KM, Cutting GR. Quantification of the Relative Contribution of Environmental and Genetic Factors to Variation in Cystic Fibrosis Lung Function. *The Journal of Pediatrics.* 2010;157(5):802-807.e3.
148. Wright FA, Strug LJ, Doshi VK, Commander CW, Blackman SM, Sun L, et al. Genome-wide association and linkage identify modifier loci of lung disease severity in cystic fibrosis at 11p13 and 20q13.2. *Nat Genet.* juin 2011;43(6):539-46.
149. Corvol H, Blackman SM, Boëlle PY, Gallins PJ, Pace RG, Stonebraker JR, et al. Genome-wide association meta-analysis identifies five modifier loci of lung disease severity in cystic fibrosis. *Nat Commun.* 29 sept 2015;6(1):8382.
150. Dorfman R, Taylor C, Lin F, Sun L, Sandford A, Paré P, et al. Modulatory effect of the SLC9A3 gene on susceptibility to infections and pulmonary function in children with cystic fibrosis. *Pediatric Pulmonology.* 2011;46(4):385-92.
151. Sun L, Rommens JM, Corvol H, Li W, Li X, Chiang TA, et al. Multiple apical plasma membrane constituents are associated with susceptibility to meconium ileus in individuals with cystic fibrosis. *Nat Genet.* mai 2012;44(5):562-9.
152. Li W, Soave D, Miller MR, Keenan K, Lin F, Gong J, et al. Unraveling the complex genetic model for cystic fibrosis: pleiotropic effects of modifier genes on early cystic fibrosis-related morbidities. *Hum Genet.* févr 2014;133(2):151-61.
153. Pereira SVN, Ribeiro JD, Bertuzzo CS, Marson FAL. Interaction among variants in the SLC gene family (SLC6A14, SLC26A9, SLC11A1, and SLC9A3) and CFTR mutations with clinical markers of cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol.* juill 2018;53(7):888-900.
154. Aron Y, Polla BS, Bienvenu T, Dall'ava J, Dusser D, Hubert D. HLA Class II Polymorphism in Cystic Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* mai 1999;159(5):1464-8.
155. Stanke F, van Barneveld A, Hedtfeld S, Wöfl S, Becker T, Tümmler B. The CF-modifying gene EHF promotes p.Phe508del-CFTR residual function by altering protein glycosylation and trafficking in epithelial cells. *Eur J Hum Genet.* mai 2014;22(5):660-6.
156. Di Paola M, Park AJ, Ahmadi S, Roach EJ, Wu YS, Struder-Kypke M, et al. SLC6A14 Is a Genetic Modifier of Cystic Fibrosis That Regulates Pseudomonas aeruginosa Attachment to Human Bronchial Epithelial Cells. *mBio.* 19 déc 2017;8(6):e02073-17.
157. Sepahzad A, Morris-Rosendahl DJ, Davies JC. Cystic Fibrosis Lung Disease Modifiers and Their Relevance in the New Era of Precision Medicine. *Genes (Basel)* [Internet]. 13 avr 2021 [cité 11 juin 2021];12(4). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8069009/>
158. Mercier J, Calmel C, Mésinè J, Sutanto E, Merabtene F, Longchamp E, et al. SLC6A14 Impacts Cystic Fibrosis Lung Disease Severity via mTOR and Epithelial Repair Modulation. *Front Mol Biosci.* 9 mars 2022;9:850261.

159. Guillot L, Beucher J, Tabary O, Le Rouzic P, Clement A, Corvol H. Lung disease modifier genes in cystic fibrosis. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2014;52:83-93.
160. Nissim-Rafinia M, Aviram M, Randell SH, Shushi L, Ozeri E, Chiba-Falek O, et al. Restoration of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator function by splicing modulation. *EMBO Rep*. nov 2004;5(11):1071-7.
161. Nissim-Rafinia M, Kerem B. The splicing machinery is a genetic modifier of disease severity. *Trends in Genetics*. 2005;21(9):480-3.
162. Nissim-Rafinia M, Kerem B. Splicing modulation as a modifier of the CFTR function. *Prog Mol Subcell Biol*. 2006;44:233-54.
163. Wild CP. The exposome: from concept to utility. *Int J Epidemiol*. 2012;41(1):24-32.
164. Pittman JE, Calloway EH, Kiser M, Yeatts J, Davis SD, Drumm ML, et al. Age of *Pseudomonas aeruginosa* acquisition and subsequent severity of cystic fibrosis lung disease. *Pediatr Pulmonol*. 2011;46(5):497-504.
165. Nixon GM, Armstrong DS, Carzino R, Carlin JB, Olinsky A, Robertson CF, et al. Clinical outcome after early *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis. *The Journal of Pediatrics*. 1 mai 2001;138(5):699-704.
166. Emerson J, Rosenfeld M, McNamara S, Ramsey B, Gibson RL. *Pseudomonas aeruginosa* and other predictors of mortality and morbidity in young children with cystic fibrosis. *Pediatric Pulmonology*. 2002;34(2):91-100.
167. Ramsey KA, Ranganathan S, Park J, Skoric B, Adams AM, Simpson SJ, et al. Early respiratory infection is associated with reduced spirometry in children with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 15 nov 2014;190(10):1111-6.
168. Zemanick ET, Emerson J, Thompson V, McNamara S, Morgan W, Gibson RL, et al. Clinical outcomes after initial *pseudomonas* acquisition in cystic fibrosis. *Pediatric Pulmonology*. 2015;50(1):42-8.
169. Sanders DB, Emerson J, Ren CL, Schechter MS, Gibson RL, Morgan W, et al. Early Childhood Risk Factors for Decreased FEV1 at Age Six to Seven Years in Young Children with Cystic Fibrosis. *Annals ATS*. 1 août 2015;12(8):1170-6.
170. Collaco JM, McGready J, Green DM, Naughton KM, Watson CP, Shields T, et al. Effect of Temperature on Cystic Fibrosis Lung Disease and Infections: A Replicated Cohort Study. *PLOS ONE*. 2011;6(11):e27784.
171. Psoter KJ, De Roos AJ, Wakefield J, Mayer J, Rosenfeld M. Season is associated with *Pseudomonas aeruginosa* acquisition in young children with cystic fibrosis. *Clinical Microbiology and Infection*. 1 nov 2013;19(11):E483-9.
172. Goeminne PC, Nawrot TS, De Boeck K, Nemery B, Dupont LJ. Proximity to blue spaces and risk of infection with *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: A case-control analysis. *J Cyst Fibros*. nov 2015;14(6):741-7.

173. Ramsay KA, Stockwell RE, Bell SC, Kidd TJ. Infection in cystic fibrosis: impact of the environment and climate. *Expert Rev Respir Med.* 2016;10(5):505-19.
174. Psoter KJ, DE Roos AJ, Wakefield J, Mayer JD, Bryan M, Rosenfeld M. Association of meteorological and geographical factors and risk of initial *Pseudomonas aeruginosa* acquisition in young children with cystic fibrosis. *Epidemiol Infect.* avr 2016;144(5):1075-83.
175. Collaco JM, Raraigh KS, Appel LJ, Cutting GR. Respiratory pathogens mediate the association between lung function and temperature in cystic fibrosis. *Journal of Cystic Fibrosis.* 1 nov 2016;15(6):794-801.
176. Warriar R, Skoric B, Vidmar S, Carzino R, Ranganathan S. The role of geographical location and climate on recurrent *Pseudomonas* infection in young children with Cystic Fibrosis. *Journal of Cystic Fibrosis.* 1 nov 2019;18(6):817-22.
177. Campbell PW, Parker RA, Roberts BT, Krishnamani MR, Phillips JA. Association of poor clinical status and heavy exposure to tobacco smoke in patients with cystic fibrosis who are homozygous for the F508 deletion. *J Pediatr.* févr 1992;120(2 Pt 1):261-4.
178. Kopp BT, Ortega-García JA, Sadreameli SC, Wellmerling J, Cormet-Boyaka E, Thompson R, et al. The Impact of Secondhand Smoke Exposure on Children with Cystic Fibrosis: A Review. *Int J Environ Res Public Health.* 2016;13(10).
179. Rubin BK. Exposure of children with cystic fibrosis to environmental tobacco smoke. *N Engl J Med.* 1990;323(12):782-8.
180. Kovesi T, Corey M, Levison H. Passive smoking and lung function in cystic fibrosis. *Am Rev Respir Dis.* 1993;148(5):1266-71.
181. Kopp BT, Sarzynski L, Khalifoun S, Hayes D, Thompson R, Nicholson L, et al. Detrimental effects of secondhand smoke exposure on infants with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol.* 2015;50(1):25-34.
182. Smyth A, O'Hea U, Williams G, Smyth R, Heaf D. Passive smoking and impaired lung function in cystic fibrosis. *Arch Dis Child.* 1994;71(4):353-4.
183. Collaco JM, Vanscoy L, Bremer L, McDougal K, Blackman SM, Bowers A, et al. Interactions between secondhand smoke and genes that affect cystic fibrosis lung disease. *JAMA.* 2008;299(4):417-24.
184. Gilljam H, Stenlund C, Ericsson-Hollings A, Strandvik B. Passive smoking in cystic fibrosis. *Respir Med.* 1990;84(4):289-91.
185. Clunes LA, Davies CM, Coakley RD, Aleksandrov AA, Henderson AG, Zeman KL, et al. Cigarette smoke exposure induces CFTR internalization and insolubility, leading to airway surface liquid dehydration. *FASEB j.* 2012;26(2):533-45.
186. Cantin AM, Hanrahan JW, Bilodeau G, Ellis L, Dupuis A, Liao J, et al. Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Function Is Suppressed in Cigarette Smokers. *Am J Respir Crit Care Med.* 15 mai 2006;173(10):1139-44.

187. Raju SV, Jackson PL, Courville CA, McNicholas CM, Sloane PA, Sabbatini G, et al. Cigarette smoke induces systemic defects in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator function. *Am J Respir Crit Care Med.* 2013;188(11):1321-30.
188. Marklew AJ, Patel W, Moore PJ, Tan CD, Smith AJ, Sassano MF, et al. Cigarette Smoke Exposure Induces Retrograde Trafficking of CFTR to the Endoplasmic Reticulum. *Sci Rep.* 2019;9(1):13655.
189. Rasmussen LW, Stanford D, Patel K, Raju SV. Evaluation of secondhand smoke effects on CFTR function in vivo. *Respiratory Research.* 2020;21(1):70.
190. Blayac M, Coll P, Urbach V, Fanen P, Epaud R, Lanone S. The Impact of Air Pollution on the Course of Cystic Fibrosis: A Review. *Frontiers in Physiology* [Internet]. 2022;13. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fphys.2022.908230>
191. Oates GR, Schechter MS. Socioeconomic status and health outcomes: cystic fibrosis as a model. *Expert Rev Respir Med.* sept 2016;10(9):967-77.
192. Wilkes DL, Schneiderman JE, Nguyen T, Heale L, Moola F, Ratjen F, et al. Exercise and physical activity in children with cystic fibrosis. *Paediatric Respiratory Reviews.* 1 sept 2009;10(3):105-9.
193. Collaco JM, Blackman SM, Raraigh KS, Morrow CB, Cutting GR, Paranjape SM. Self-reported exercise and longitudinal outcomes in cystic fibrosis: a retrospective cohort study. *BMC Pulm Med.* 6 oct 2014;14:159.
194. Cox NS, Alison JA, Button BM, Wilson JW, Morton JM, Holland AE. Physical activity participation by adults with cystic fibrosis: An observational study. *Respirology.* 2016;21(3):511-8.
195. Cox NS, Holland AE. Current perspectives of physical activity in cystic fibrosis. *Expert Review of Respiratory Medicine.* 2 janv 2019;13(1):13-22.
196. Snouwaert JN, Brigman KK, Latour AM, Malouf NN, Boucher RC, Smithies O, et al. An Animal Model for Cystic Fibrosis Made by Gene Targeting. *Science.* 21 août 1992;257(5073):1083.
197. Wilke M, Buijs-Offerman RM, Aarbiou J, Colledge WH, Sheppard DN, Touqui L, et al. Mouse models of cystic fibrosis: phenotypic analysis and research applications. *J Cyst Fibros.* 2011;10 Suppl 2:S152-171.
198. Lavelle GM, White MM, Browne N, McElvaney NG, Reeves EP. Animal Models of Cystic Fibrosis Pathology: Phenotypic Parallels and Divergences. *BioMed Research International.* 2016;2016:1-14.
199. van Doorninck JH, French PJ, Verbeek E, Peters RH, Morreau H, Bijman J, et al. A mouse model for the cystic fibrosis delta F508 mutation. *The EMBO journal.* 1995;14(18):4403-11.
200. Mall M, Grubb BR, Harkema JR, O'Neal WK, Boucher RC. Increased airway epithelial Na⁺ absorption produces cystic fibrosis-like lung disease in mice. *Nat Med.* mai 2004;10(5):487-93.

201. Semaniakou A, Croll RP, Chappe V. Animal Models in the Pathophysiology of Cystic Fibrosis. *Front Pharmacol.* 2019;9:1475.
202. Birket SE, Davis JM, Fernandez CM, Tuggle KL, Oden AM, Chu KK, et al. Development of an airway mucus defect in the cystic fibrosis rat. *JCI Insight* [Internet]. 11 janv 2018 [cité 9 août 2022];3(1). Disponible sur: <https://insight.jci.org/articles/view/97199>
203. Seinfeld JH, Pandis SN. *Atmospheric Chemistry and Physics: From Air Pollution to Climate Change.* 3rd Edition, John-Wiley&Sons. New-York; 2016.
204. Masclet P, Cachier H. L'aérosol atmosphérique. Caractéristiques physico-chimiques. *Analisis.* nov 1998;26(9):11-6.
205. Mathieu Flonneau. *Paris et l'automobile Un siècle de passion.* Hachette; 2005. 352 p. (Histoire).
206. Laj P, Sellegri K. Les aérosols atmosphériques: Impacts locaux, effets globaux. *Revue Française des Laboratoires.* janv 2003;2003(349):23-34.
207. Ramachandran S, Jayaraman A. Spectral aerosol optical depths over Bay of Bengal and Chennai: II—sources, anthropogenic influence and model estimates. *Atmospheric Environment.* 1 mai 2003;37(14):1951-62.
208. Holton JR, Haynes PH, McIntyre ME, Douglass AR, Rood RB, Pfister L. Stratosphere-troposphere exchange. *Reviews of Geophysics.* nov 1995;33(4):403-39.
209. Jaenicke R. Chapter 1 Tropospheric Aerosols. In: Hobbs PV, éditeur. *International Geophysics* [Internet]. Academic Press; 1993 [cité 2 août 2022]. p. 1-31. (Aerosol–Cloud–Climate Interactions; vol. 54). Disponible sur: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0074614208602107>
210. Feichter J, Leisner T. Climate engineering: A critical review of approaches to modify the global energy balance. *Eur Phys J Spec Top.* 1 sept 2009;176(1):81-92.
211. Wayne RP. *Chemistry of Atmospheres: An Introduction to the Chemistry of the Atmospheres of Earth, the Planets, and their Satellites.* Third Edition. Oxford, New York: Oxford University Press; 2000. 806 p.
212. Ravishankara AR. Introduction: Atmospheric Chemistry Long-Term Issues. *Chem Rev.* 1 déc 2003;103(12):4505-8.
213. World Health Organization. *Air Quality Guidelines: Global Update 2005 : Particulate Matter, Ozone, Nitrogen Dioxide, and Sulfur Dioxide* [Internet]. World Health Organization; 2006. Disponible sur: <https://books.google.fr/books?id=7VbxUdIJE8wC>
214. World Health Organization. *WHO global air quality guidelines: particulate matter (PM2.5 and PM10), ozone, nitrogen dioxide, sulfur dioxide and carbon monoxide* [Internet]. World Health Organization; 2021 [cité 1 août 2022]. xxi, 273 p. Disponible sur: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/345329>
215. World Health Organization, éditeur. *Who guidelines for indoor air quality: selected pollutants.* Copenhagen: WHO; 2010. 454 p.

216. Citepa. Inventaire des émissions de polluants atmosphériques et de gaz à effet de serre en France – Format Secten. 2022.
217. European Environment Agency. Emissions of the main air pollutants in Europe [Internet]. 2021 [cité 3 août 2022]. Disponible sur: <https://www.eea.europa.eu/ims/emissions-of-the-main-air>
218. US EPA Office of Air and Radiation. Our Nation’s Air : Report on Status and trends through 2021 [Internet]. 2022 [cité 3 août 2022]. Disponible sur: <https://gispub.epa.gov/air/trendsreport/2022/>
219. World Health Organization. Ambient (outdoor) air pollution. 2021; Disponible sur: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/ambient-\(outdoor\)-air-quality-and-health](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/ambient-(outdoor)-air-quality-and-health)
220. Health Effects Institute. State of Global Air 2020. Boston; 2020.
221. Brunekreef B, Holgate ST. Air pollution and health. *Lancet*. 19 oct 2002;360(9341):1233-42.
222. Maynard R. Key airborne pollutants--the impact on health. *Sci Total Environ*. 1 déc 2004;334-335:9-13.
223. Curtis L, Rea W, Smith-Willis P, Fenyves E, Pan Y. Adverse health effects of outdoor air pollutants. *Environ Int*. août 2006;32(6):815-30.
224. Sanyal S, Rochereau T, Maesano CN, Com-Ruelle L, Annesi-Maesano I. Long-Term Effect of Outdoor Air Pollution on Mortality and Morbidity: A 12-Year Follow-Up Study for Metropolitan France. *Int J Environ Res Public Health*. nov 2018;15(11):2487.
225. Burnett R, Chen H, Szyszkowicz M, Fann N, Hubbell B, Pope CA, et al. Global estimates of mortality associated with long-term exposure to outdoor fine particulate matter. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 18 sept 2018;115(38):9592-7.
226. Juginović A, Vuković M, Aranza I, Biloš V. Health impacts of air pollution exposure from 1990 to 2019 in 43 European countries. *Sci Rep*. 18 nov 2021;11(1):22516.
227. Health Effects Institute. Explore the Data State of Global Air 2020 [Internet]. [cité 5 août 2022]. Disponible sur: <https://www.stateofglobalair.org/data/#/health/map>
228. Santé Publique France. Impact of ambient air pollution on mortality in metropolitan France: Reduction related to Spring 2020 lockdown and new data for total burden of impact for the period 2016-2019. 2021; Disponible sur: <http://www.santepubliquefrance>
229. Brunekreef B, Strak M, Chen J, Andersen ZJ, Atkinson R, Bauwelinck M. Mortality and Morbidity Effects of Long-Term Exposure to Low-Level PM2.5, BC, NO2, and O3: An Analysis of European Cohorts in the ELAPSE Project [Internet]. 2021 août [cité 5 août 2022]. Disponible sur: <https://www.healtheffects.org/publication/mortality-and-morbidity-effects-long-term-exposure-low-level-pm25-bc-no2-and-o3-analysis>
230. Dominici F, Zanobetti A, Schwartz J, Braun D, Sabath B, Wu X. Assessing Adverse Health Effects of Long-Term Exposure to Low Levels of Ambient Air Pollution: Implementation of Causal Inference Methods [Internet]. 2022 janv [cité 5 août 2022].

Disponible sur: <https://www.healtheffects.org/publication/assessing-adverse-health-effects-long-term-exposure-low-levels-ambient-air-pollution-0>

231. Brauer M, Brook JR, Christidis T, Chu Y, Crouse D, Erickson A. Mortality–Air Pollution Associations in Low-Exposure Environments (MAPLE): Phase 2 [Internet]. 2022 juill [cité 5 août 2022]. Disponible sur: <https://www.healtheffects.org/publication/mortality-air-pollution-associations-low-exposure-environments-maple-phase-2>
232. Hooper LG, Kaufman JD. Ambient Air Pollution and Clinical Implications for Susceptible Populations. *Annals ATS*. avr 2018;15(Supplement_2):S64-8.
233. Apte JS, Brauer M, Cohen AJ, Ezzati M, Pope CA. Ambient PM2.5 Reduces Global and Regional Life Expectancy. *Environ Sci Technol Lett*. 11 sept 2018;5(9):546-51.
234. Lelieveld J, Pozzer A, Pöschl U, Fnais M, Haines A, Münzel T. Loss of life expectancy from air pollution compared to other risk factors: a worldwide perspective. *Cardiovascular Research*. 2020;
235. Health Effects Institute. *State of Global Air 2019*. Boston; 2019.
236. Giani P, Castruccio S, Anav A, Howard D, Hu W, Crippa P. Short-term and long-term health impacts of air pollution reductions from COVID-19 lockdowns in China and Europe: a modelling study. *The Lancet Planetary Health*. 1 oct 2020;4(10):e474-82.
237. Adélaïde L, Medina S, Wagner V, de Crouy-Chanel P, Real E, Colette A, et al. Covid-19 Lockdown in Spring 2020 in France Provided Unexpected Opportunity to Assess Health Impacts of Falls in Air Pollution. *Frontiers in Sustainable Cities* [Internet]. 2021 [cité 10 août 2022];3. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/frsc.2021.643821>
238. Hernández-Paniagua IY, Valdez SI, Almanza V, Rivera-Cárdenas C, Grutter M, Stremme W, et al. Impact of the COVID-19 Lockdown on Air Quality and Resulting Public Health Benefits in the Mexico City Metropolitan Area. *Frontiers in Public Health* [Internet]. 2021 [cité 10 août 2022];9. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpubh.2021.642630>
239. Ye T, Guo S, Xie Y, Chen Z, Abramson MJ, Heyworth J, et al. Health and related economic benefits associated with reduction in air pollution during COVID-19 outbreak in 367 cities in China. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 1 oct 2021;222:112481.
240. Goel A, Saxena P, Sonwani S, Rathi S, Srivastava A, Bharti AK, et al. Health Benefits Due to Reduction in Respirable Particulates during COVID-19 Lockdown in India. *Aerosol Air Qual Res*. 2021;21(5):200460.
241. Albayati N, Waisi B, Al-Furaiji M, Kadhom M, Alalwan H. Effect of COVID-19 on air quality and pollution in different countries. *J Transp Health*. juin 2021;21:101061.
242. Rice MB, Ljungman PL, Wilker EH, Gold DR, Schwartz JD, Koutrakis P, et al. Short-Term Exposure to Air Pollution and Lung Function in the Framingham Heart Study. *Am J Respir Crit Care Med*. 7 nov 2013;188(11):1351-7.

243. U.S. Environmental Protection Agency. U.S. EPA. Integrated Science Assessment (ISA) for Particulate Matter. Washington DC; 2019.
244. U.S. Environmental Protection Agency. U.S. EPA. Integrated Science Assessment (ISA) for Ozone and Related Photochemical Oxidants. Washington DC; 2020.
245. Sunyer J. Urban air pollution and chronic obstructive pulmonary disease: a review. *European Respiratory Journal*. 1 mai 2001;17(5):1024-33.
246. Tiotiu AI, Novakova P, Nedeva D, Chong-Neto HJ, Novakova S, Steiropoulos P, et al. Impact of Air Pollution on Asthma Outcomes. *Int J Environ Res Public Health*. sept 2020;17(17):6212.
247. Stafoggia M, Oftedal B, Chen J, Rodopoulou S, Renzi M, Atkinson RW, et al. Long-term exposure to low ambient air pollution concentrations and mortality among 28 million people: results from seven large European cohorts within the ELAPSE project. *The Lancet Planetary Health*. janv 2022;6(1):e9-18.
248. Paulin L, Hansel N. Particulate air pollution and impaired lung function. *F1000Res*. 2016;5.
249. Wang M, Aaron CP, Madrigano J, Hoffman EA, Angelini E, Yang J, et al. Association Between Long-term Exposure to Ambient Air Pollution and Change in Quantitatively Assessed Emphysema and Lung Function. *JAMA*. 13 août 2019;322(6):546-56.
250. Strassmann A, de Hoogh K, Rööslı M, Haile SR, Turk A, Bopp M, et al. NO₂ and PM_{2.5} Exposures and Lung Function in Swiss Adults: Estimated Effects of Short-Term Exposures and Long-Term Exposures with and without Adjustment for Short-Term Deviations. *Environ Health Perspect*. janv 2021;129(1):17009.
251. HEI Panel on the Health Effects of Long-Term Exposure to Traffic-Related Air Pollution. Systematic Review and Meta-analysis of Selected Health Effects of Long-Term Exposure to Traffic-Related Air Pollution [Internet]. Boston; 2022 [cité 4 août 2022]. Disponible sur: <https://www.healtheffects.org/publication/systematic-review-and-meta-analysis-selected-health-effects-long-term-exposure-traffic>
252. Norbäck D, Björnsson E, Janson C, Widström J, Boman G. Asthmatic symptoms and volatile organic compounds, formaldehyde, and carbon dioxide in dwellings. *Occupational and Environmental Medicine*. 1 juin 1995;52(6):388-95.
253. Billionnet C, Gay E, Kirchner S, Leynaert B, Annesi-Maesano I. Quantitative assessments of indoor air pollution and respiratory health in a population-based sample of French dwellings. *Environmental Research*. 1 avr 2011;111(3):425-34.
254. Nurmatov UB, Tagiyeva N, Semple S, Devereux G, Sheikh A. Volatile organic compounds and risk of asthma and allergy: a systematic review. *European Respiratory Review*. 1 mars 2015;24(135):92-101.
255. Thurston GD, Balmes JR, Garcia E, Gilliland FD, Rice MB, Schikowski T, et al. Outdoor Air Pollution and New-Onset Airway Disease. An Official American Thoracic Society Workshop Report. *Annals ATS*. 2020;17(4):387-98.

256. Lu Z, Coll P, Maitre B, Epaud R, Lanone S. Air pollution as an early determinant of COPD. *European Respiratory Review* [Internet]. 30 sept 2022 [cité 12 août 2022];31(165). Disponible sur: <https://err.ersjournals.com/content/31/165/220059>
257. Schikowski T, Adam M, Marcon A, Cai Y, Vierkötter A, Carsin AE, et al. Association of ambient air pollution with the prevalence and incidence of COPD. *Eur Respir J*. sept 2014;44(3):614-26.
258. Atkinson RW, Carey IM, Kent AJ, van Staa TP, Anderson HR, Cook DG. Long-term exposure to outdoor air pollution and the incidence of chronic obstructive pulmonary disease in a national English cohort. *Occup Environ Med*. janv 2015;72(1):42-8.
259. Shin S, Bai L, Burnett RT, Kwong JC, Hystad P, van Donkelaar A, et al. Air Pollution as a Risk Factor for Incident Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Asthma. A 15-Year Population-based Cohort Study. *Am J Respir Crit Care Med*. 1 mai 2021;203(9):1138-48.
260. Park J, Kim HJ, Lee CH, Lee CH, Lee HW. Impact of long-term exposure to ambient air pollution on the incidence of chronic obstructive pulmonary disease: A systematic review and meta-analysis. *Environmental Research*. 1 mars 2021;194:110703.
261. Liu S, Jørgensen JT, Ljungman P, Pershagen G, Bellander T, Leander K, et al. Long-term exposure to low-level air pollution and incidence of asthma: the ELAPSE project. *European Respiratory Journal* [Internet]. 1 janv 2020 [cité 5 août 2022]; Disponible sur: <https://erj.ersjournals.com/content/early/2020/11/26/13993003.030992020>
262. Liu S, Jørgensen JT, Ljungman P, Pershagen G, Bellander T, Leander K, et al. Long-term exposure to low-level air pollution and incidence of chronic obstructive pulmonary disease: The ELAPSE project. *Environment International*. 1 janv 2021;146:106267.
263. Eisner MD, Anthonisen N, Coultas D, Kuenzli N, Perez-Padilla R, Postma D, et al. An Official American Thoracic Society Public Policy Statement: Novel Risk Factors and the Global Burden of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med*. sept 2010;182(5):693-718.
264. To T, Zhu J, Larsen K, Simatovic J, Feldman L, Ryckman K, et al. Progression from Asthma to Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Is Air Pollution a Risk Factor? *Am J Respir Crit Care Med*. 15 août 2016;194(4):429-38.
265. International Agency for Research on Cancer. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Volume 109. Outdoor air pollution. Lyon; 2013.
266. Raaschou-Nielsen O, Andersen ZJ, Beelen R, Samoli E, Stafoggia M, Weinmayr G, et al. Air pollution and lung cancer incidence in 17 European cohorts: prospective analyses from the European Study of Cohorts for Air Pollution Effects (ESCAPE). *The Lancet Oncology*. 2013;14(9):813-22.
267. International Agency for Research on Cancer. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans Volume 95 Household Use of Solid Fuels and High-temperature Frying [Internet]. Lyon, France; 2010 [cité 6 août 2022]. Disponible sur: <https://publications.iarc.fr/Book-And-Report-Series/Iarc-Monographs-On-The->

Identification-Of-Carcinogenic-Hazards-To-Humans/Household-Use-Of-Solid-Fuels-
And-High-temperature-Frying-2010

268. Pinkerton KE, Joad JP. The mammalian respiratory system and critical windows of exposure for children's health. *Environmental Health Perspectives*. juin 2000;108(suppl 3):457-62.
269. Stieb DM, Chen L, Eshoul M, Judek S. Ambient air pollution, birth weight and preterm birth: a systematic review and meta-analysis. *Environ Res*. 2012;117:100-11.
270. Pedersen M, Giorgis-Allemand L, Bernard C, Aguilera I, Andersen AMN, Ballester F, et al. Ambient air pollution and low birthweight: a European cohort study (ESCAPE). *The Lancet Respiratory Medicine*. 1 nov 2013;1(9):695-704.
271. Dadvand P, Parker J, Bell ML, Bonzini M, Brauer M, Darrow LA, et al. Maternal Exposure to Particulate Air Pollution and Term Birth Weight: A Multi-Country Evaluation of Effect and Heterogeneity. *Environ Health Perspect*. 2013;121(3):267-373.
272. Fleischer Nancy L., Meriardi Mario, van Donkelaar Aaron, Vadillo-Ortega Felipe, Martin Randall V., Betran Ana Pilar, et al. Outdoor Air Pollution, Preterm Birth, and Low Birth Weight: Analysis of the World Health Organization Global Survey on Maternal and Perinatal Health. *Environmental Health Perspectives*. 2014;122(4):425-30.
273. Yuan L, Zhang Y, Gao Y, Tian Y. Maternal fine particulate matter (PM_{2.5}) exposure and adverse birth outcomes: an updated systematic review based on cohort studies. *Environ Sci Pollut Res*. 1 mai 2019;26(14):13963-83.
274. Ghosh R, Causey K, Burkart K, Wozniak S, Cohen A, Brauer M. Ambient and household PM_{2.5} pollution and adverse perinatal outcomes: A meta-regression and analysis of attributable global burden for 204 countries and territories. *PLoS Med*. 28 sept 2021;18(9):e1003718.
275. Wu J, Laurent O, Li L, Hu J, Kleeman M. Adverse Reproductive Health Outcomes and Exposure to Gaseous and Particulate-Matter Air Pollution in Pregnant Women. *Res Rep Health Eff Inst*. 1 juill 2016;2016:188.
276. Goldizen FC, Sly PD, Knibbs LD. Respiratory effects of air pollution on children. *Pediatric Pulmonology*. 2016;51(1):94-108.
277. Klepac P, Locatelli I, Korošec S, Künzli N, Kukec A. Ambient air pollution and pregnancy outcomes: A comprehensive review and identification of environmental public health challenges. *Environmental Research*. 1 nov 2018;167:144-59.
278. Pope DP, Mishra V, Thompson L, Siddiqui AR, Rehfuess EA, Weber M, et al. Risk of Low Birth Weight and Stillbirth Associated With Indoor Air Pollution From Solid Fuel Use in Developing Countries. *Epidemiologic Reviews*. 1 avr 2010;32(1):70-81.
279. Dietert RR, Etzel RA, Chen D, Halonen M, Holladay SD, Jarabek AM, et al. Workshop to identify critical windows of exposure for children's health: immune and respiratory systems work group summary. *Environ Health Perspect*. juin 2000;108(Suppl 3):483-90.

280. Miller MD, Marty MA, Arcus A, Brown J, Morry D, Sandy M. Differences Between Children and Adults: Implications for Risk Assessment at California EPA. *Int J Toxicol.* sept 2002;21(5):403-18.
281. Committee on Environmental Health. Ambient Air Pollution: Health Hazards to Children. *Pediatrics.* 1 déc 2004;114(6):1699-707.
282. Gauderman WJ, Gilliland GF, Vora H, Avol E, Stram D, McConnell R, et al. Association between air pollution and lung function growth in southern California children: results from a second cohort. *Am J Respir Crit Care Med.* 1 juill 2002;166(1):76-84.
283. Gauderman WJ, Avol E, Gilliland F, Vora H, Thomas D, Berhane K, et al. The Effect of Air Pollution on Lung Development from 10 to 18 Years of Age. *N Engl J Med.* 9 sept 2004;351(11):1057-67.
284. Gauderman WJ, Vora H, McConnell R, Berhane K, Gilliland F, Thomas D, et al. Effect of exposure to traffic on lung development from 10 to 18 years of age: a cohort study. *The Lancet.* 2007;369(9561):571-7.
285. Milanzi EB, Koppelman GH, Smit HA, Wijga AH, Oldenwening M, Vonk JM, et al. Air pollution exposure and lung function until age 16 years: the PIAMA birth cohort study. *European Respiratory Journal.* 2018;52(3).
286. Hwang BF, Chen YH, Lin YT, Wu XT, Leo Lee Y. Relationship between exposure to fine particulates and ozone and reduced lung function in children. *Environmental Research.* 2015;137:382-90.
287. Dubrowski A, Kliś K, Żurawiecka M, Dereń K, Barszcz M, Nowakowski D, et al. Long-Term Exposure to Ambient Air Pollution in Childhood-Adolescence and Lung Function in Adulthood. *Adv Exp Med Biol.* 2019;1113:19-26.
288. Tzivian L. Outdoor air pollution and asthma in children. *J Asthma.* juin 2011;48(5):470-81.
289. Bowatte G, Lodge C, Lowe AJ, Erbas B, Perret J, Abramson MJ, et al. The influence of childhood traffic-related air pollution exposure on asthma, allergy and sensitization: a systematic review and a meta-analysis of birth cohort studies. *Allergy.* mars 2015;70(3):245-56.
290. Rumchev KB, Spickett JT, Bulsara MK, Phillips MR, Stick SM. Domestic exposure to formaldehyde significantly increases the risk of asthma in young children. *European Respiratory Journal.* 1 août 2002;20(2):403-8.
291. Rumchev K, Spickett J, Bulsara M, Phillips M, Stick S. Association of domestic exposure to volatile organic compounds with asthma in young children. *Thorax.* 1 sept 2004;59(9):746-51.
292. Breyse PN, Diette GB, Matsui EC, Butz AM, Hansel NN, McCormack MC. Indoor Air Pollution and Asthma in Children. *Proc Am Thorac Soc.* 1 mai 2010;7(2):102-6.
293. MacIntyre EA, Gehring U, Mölter A, Fuertes E, Klümper C, Krämer U, et al. Air pollution and respiratory infections during early childhood: an analysis of 10 European birth cohorts within the ESCAPE Project. *Environ Health Perspect.* janv 2014;122(1):107-13.

294. Brugha R, Grigg J. Urban Air Pollution and Respiratory Infections. *Paediatric Respiratory Reviews*. 2014;15(2):194-9.
295. Schraufnagel DE, Balmes JR, Cowl CT, De Matteis S, Jung SH, Mortimer K, et al. Air Pollution and Noncommunicable Diseases. *Chest*. févr 2019;155(2):417-26.
296. An Z, Jin Y, Li J, Li W, Wu W. Impact of Particulate Air Pollution on Cardiovascular Health. *Curr Allergy Asthma Rep*. mars 2018;18(3):15.
297. Wolf K, Hoffmann B, Andersen ZJ, Atkinson RW, Bauwelinck M, Bellander T, et al. Long-term exposure to low-level ambient air pollution and incidence of stroke and coronary heart disease: a pooled analysis of six European cohorts within the ELAPSE project. *The Lancet Planetary Health*. 1 sept 2021;5(9):e620-32.
298. Künzli N, Jerrett M, Mack WJ, Beckerman B, LaBree L, Gilliland F, et al. Ambient Air Pollution and Atherosclerosis in Los Angeles. *Environ Health Perspect*. févr 2005;113(2):201-6.
299. Robertson S, Miller MR. Ambient air pollution and thrombosis. *Part Fibre Toxicol*. 3 janv 2018;15:1.
300. Badman D, Jaffe E. Blood and air pollution: State of knowledge and research needs. *Otolaryngology - Head and Neck Surgery*. févr 1996;114(2):205-8.
301. Power MC, Adar SD, Yanosky JD, Weuve J. Exposure to air pollution as a potential contributor to cognitive function, cognitive decline, brain imaging, and dementia: a systematic review of epidemiologic research. *Neurotoxicology*. sept 2016;56:235-53.
302. Chen H, Kwong JC, Copes R, Tu K, Villeneuve PJ, van Donkelaar A, et al. Living near major roads and the incidence of dementia, Parkinson's disease, and multiple sclerosis: a population-based cohort study. *The Lancet*. 18 févr 2017;389(10070):718-26.
303. Guxens M, Garcia-Esteban R, Giorgis-Allemand L, Fornes J, Badaloni C, Ballester F, et al. Air pollution during pregnancy and childhood cognitive and psychomotor development: six European birth cohorts. *Epidemiology*. sept 2014;25(5):636-47.
304. Donzelli G, Llopis-Gonzalez A, Llopis-Morales A, Cioni L, Morales-Suárez-Varela M. Particulate Matter Exposure and Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder in Children: A Systematic Review of Epidemiological Studies. *Int J Environ Res Public Health*. 20 déc 2019;17(1):E67.
305. Lam J, Sutton P, Kalkbrenner A, Windham G, Halladay A, Koustaas E, et al. A Systematic Review and Meta-Analysis of Multiple Airborne Pollutants and Autism Spectrum Disorder. *PLOS ONE*. 21 sept 2016;11(9):e0161851.
306. Guxens M, Lubczyńska MJ, Muetzel RL, Dalmau-Bueno A, Jaddoe VWV, Hoek G, et al. Air Pollution Exposure During Fetal Life, Brain Morphology, and Cognitive Function in School-Age Children. *Biol Psychiatry*. 15 août 2018;84(4):295-303.
307. Eze IC, Hemkens LG, Bucher HC, Hoffmann B, Schindler C, Künzli N, et al. Association between ambient air pollution and diabetes mellitus in Europe and North America: systematic review and meta-analysis. *Environ Health Perspect*. mai 2015;123(5):381-9.

308. Raaschou-Nielsen O, Sørensen M, Ketznel M, Hertel O, Loft S, Tjønneland A, et al. Long-term exposure to traffic-related air pollution and diabetes-associated mortality: a cohort study. *Diabetologia*. janv 2013;56(1):36-46.
309. Jerrett M, McConnell R, Wolch J, Chang R, Lam C, Dunton G, et al. Traffic-related air pollution and obesity formation in children: a longitudinal, multilevel analysis. *Environmental Health*. 9 juin 2014;13(1):49.
310. Guo J, Kauppinen T, Kyyrönen P, Heikkilä P, Lindbohm ML, Pukkala E. Risk of esophageal, ovarian, testicular, kidney and bladder cancers and leukemia among Finnish workers exposed to diesel or gasoline engine exhaust. *International Journal of Cancer*. 2004;111(2):286-92.
311. Castaño-Vinyals G, Cantor KP, Malats N, Tardon A, Garcia-Closas R, Serra C, et al. Air pollution and risk of urinary bladder cancer in a case-control study in Spain. *Occupational and Environmental Medicine*. 1 janv 2008;65(1):56-60.
312. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Cancer of the urinary bladder [Internet]. Outdoor air pollution. International Agency for Research on Cancer; 2016 [cité 5 août 2022]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK368013/>
313. Turner MC, Gracia-Lavedan E, Cirac M, Castaño-Vinyals G, Malats N, Tardon A, et al. Ambient air pollution and incident bladder cancer risk: Updated analysis of the Spanish Bladder Cancer Study. *International Journal of Cancer*. 2019;145(4):894-900.
314. Chen J, Rodopoulou S, Strak M, de Hoogh K, Taj T, Poulsen AH, et al. Long-term exposure to ambient air pollution and bladder cancer incidence in a pooled European cohort: the ELAPSE project. *Br J Cancer*. juin 2022;126(10):1499-507.
315. Yu P, Guo S, Xu R, Ye T, Li S, Sim MR, et al. Cohort studies of long-term exposure to outdoor particulate matter and risks of cancer: A systematic review and meta-analysis. *Innovation (Camb)*. 28 août 2021;2(3):100143.
316. Raaschou-Nielsen O, Andersen ZJ, Hvidberg M, Jensen SS, Ketznel M, Sørensen M, et al. Air pollution from traffic and cancer incidence: a Danish cohort study. *Environ Health*. 19 juill 2011;10:67.
317. Josyula S, Lin J, Xue X, Rothman N, Lan Q, Rohan TE, et al. Household air pollution and cancers other than lung: a meta-analysis. *Environmental Health*. 15 mars 2015;14(1):24.
318. Jørgensen JT, Johansen MS, Ravnskjer L, Andersen KK, Bräuner EV, Loft S, et al. Long-term exposure to ambient air pollution and incidence of brain tumours: The Danish Nurse Cohort. *Neurotoxicology*. juill 2016;55:122-30.
319. Andersen ZJ, Pedersen M, Weinmayr G, Stafoggia M, Galassi C, Jørgensen JT, et al. Long-term exposure to ambient air pollution and incidence of brain tumor: the European Study of Cohorts for Air Pollution Effects (ESCAPE). *Neuro Oncol*. 19 févr 2018;20(3):420-32.

320. Nagel G, Stafoggia M, Pedersen M, Andersen ZJ, Galassi C, Munkenast J, et al. Air pollution and incidence of cancers of the stomach and the upper aerodigestive tract in the European Study of Cohorts for Air Pollution Effects (ESCAPE). *Int J Cancer*. 1 oct 2018;143(7):1632-43.
321. Weinmayr G, Pedersen M, Stafoggia M, Andersen ZJ, Galassi C, Munkenast J, et al. Particulate matter air pollution components and incidence of cancers of the stomach and the upper aerodigestive tract in the European Study of Cohorts of Air Pollution Effects (ESCAPE). *Environ Int*. nov 2018;120:163-71.
322. So R, Chen J, Mehta AJ, Liu S, Strak M, Wolf K, et al. Long-term exposure to air pollution and liver cancer incidence in six European cohorts. *International Journal of Cancer*. 2021;149(11):1887-97.
323. Pritchett N, Spangler EC, Gray GM, Livinski AA, Sampson JN, Dawsey SM, et al. Exposure to Outdoor Particulate Matter Air Pollution and Risk of Gastrointestinal Cancers in Adults: A Systematic Review and Meta-Analysis of Epidemiologic Evidence. *Environ Health Perspect*. mars 2022;130(3):36001.
324. Oberdörster G, Oberdörster E, Oberdörster J. Nanotoxicology: An Emerging Discipline Evolving from Studies of Ultrafine Particles. *Environ Health Perspect*. juill 2005;113(7):823-39.
325. Nemmar A, Hoet PHM, Vanquickenborne B, Dinsdale D, Thomeer M, Hoylaerts MF, et al. Passage of inhaled particles into the blood circulation in humans. *Circulation*. 29 janv 2002;105(4):411-4.
326. Oberdörster G, Sharp Z, Atudorei V, Elder A, Gelein R, Kreyling W, et al. Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain. *Inhal Toxicol*. juin 2004;16(6-7):437-45.
327. Elder A, Gelein R, Silva V, Feikert T, Opanashuk L, Carter J, et al. Translocation of Inhaled Ultrafine Manganese Oxide Particles to the Central Nervous System. *Environmental Health Perspectives*. août 2006;114(8):1172-8.
328. Oberdörster G, Elder A, Rinderknecht A. Nanoparticles and the Brain: Cause for Concern? *J Nanosci Nanotechnol*. août 2009;9(8):4996-5007.
329. Lochhead JJ, McCaffrey G, Quigley CE, Finch J, DeMarco KM, Nametz N, et al. Oxidative stress increases blood–brain barrier permeability and induces alterations in occludin during hypoxia–reoxygenation. *J Cereb Blood Flow Metab*. sept 2010;30(9):1625-36.
330. Qi Y, Wei S, Xin T, Huang C, Pu Y, Ma J, et al. Passage of exogenous fine particles from the lung into the brain in humans and animals. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 28 juin 2022;119(26):e2117083119.
331. Johnson NM, Hoffmann AR, Behlen JC, Lau C, Pendleton D, Harvey N, et al. Air pollution and children’s health—a review of adverse effects associated with prenatal exposure from fine to ultrafine particulate matter. *Environ Health Prev Med*. 2021;26:72.
332. Thompson JE. Airborne Particulate Matter: Human Exposure and Health Effects. *Journal of Occupational & Environmental Medicine*. mai 2018;60(5):392-423.

333. Zerboni A, Bengalli R, Fiandra L, Catelani T, Mantecca P. Cellular Mechanisms Involved in the Combined Toxic Effects of Diesel Exhaust and Metal Oxide Nanoparticles. *Nanomaterials* (Basel). 29 mai 2021;11(6):1437.
334. Lakey PSJ, Berkemeier T, Tong H, Arangio AM, Lucas K, Pöschl U, et al. Chemical exposure-response relationship between air pollutants and reactive oxygen species in the human respiratory tract. *Sci Rep.* 8 sept 2016;6:32916.
335. Goss CH, Newsom SA, Schildcrout JS, Sheppard L, Kaufman JD. Effect of ambient air pollution on pulmonary exacerbations and lung function in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 1 avr 2004;169(7):816-21.
336. Jassal MS, Yu AM, Bhatia R, Keens TG, Davidson Ward SL. Effect of residential proximity to major roadways on cystic fibrosis exacerbations. *Int J Environ Health Res.* 2013;23(2):119-31.
337. Psoter KJ, De Roos AJ, Mayer JD, Kaufman JD, Wakefield J, Rosenfeld M. Fine Particulate Matter Exposure and Initial *Pseudomonas aeruginosa* Acquisition in Cystic Fibrosis. *Annals ATS.* 16 janv 2015;12(3):385-91.
338. Psoter KJ, De Roos AJ, Wakefield J, Mayer JD, Rosenfeld M. Air pollution exposure is associated with MRSA acquisition in young U.S. children with cystic fibrosis. *BMC Pulmonary Medicine.* 27 juill 2017;17(1):106.
339. Carson SW, Psoter K, Koehler K, Siklosi KR, Montemayor K, Toporek A, et al. Indoor air pollution exposure is associated with greater morbidity in cystic fibrosis. *Journal of Cystic Fibrosis.* 1 mars 2022;21(2):e129-35.
340. Goeminne PC, Kiciński M, Vermeulen F, Fierens F, De Boeck K, Nemery B, et al. Impact of Air Pollution on Cystic Fibrosis Pulmonary Exacerbations: A Case-Crossover Analysis. *Chest.* 1 avr 2013;143(4):946-54.
341. Farhat SCL, Almeida MB, Silva-Filho LVRF, Farhat J, Rodrigues JC, Braga ALF. Ozone is associated with an increased risk of respiratory exacerbations in patients with cystic fibrosis. *Chest.* oct 2013;144(4):1186-92.
342. Roca-Barcelo A, Douglas P, Fecht D, Sterrantino AF, Williams B, Blangiardo M, et al. Risk of respiratory hospital admission associated with modelled concentrations of *Aspergillus fumigatus* from composting facilities in England. *Environmental Research.* janv 2020;108949.
343. Geiser M, Quaile O, Wenk A, Wigge C, Eigeldinger-Berthou S, Hirn S, et al. Cellular uptake and localization of inhaled gold nanoparticles in lungs of mice with chronic obstructive pulmonary disease. *Part Fibre Toxicol.* 16 mai 2013;10:19.
344. Dorin JR, Dickinson P, Alton EFW, Smith SN, Geddes DM, Stevenson BJ, et al. Cystic fibrosis in the mouse by targeted insertional mutagenesis. *Nature.* 1992;359(6392):211-5.
345. Dorin JR, Stevenson BJ, Fleming S, Alton EW, Dickinson P, Porteous DJ. Long-term survival of the exon 10 insertional cystic fibrosis mutant mouse is a consequence of low level residual wild-type *Cftr* gene expression. *Mamm Genome.* 1994;5(8):465-72.

346. Geiser M, Stoeger T, Casaulta M, Chen S, Semmler-Behnke M, Bolle I, et al. Biokinetics of nanoparticles and susceptibility to particulate exposure in a murine model of cystic fibrosis. *Part Fibre Toxicol.* 2014;11:19.
347. Liu NM, Miyashita L, Sanak M, Barratt B, Grigg J. Prostaglandin E2 and phagocytosis of inhaled particulate matter by airway macrophages in cystic fibrosis. *Journal of Cystic Fibrosis.* 2020;S1569-1993(20)30913-9.
348. Qu F, Qin XQ, Cui YR, Xiang Y, Tan YR, Liu HJ, et al. Ozone stress down-regulates the expression of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in human bronchial epithelial cells. *Chem Biol Interact.* 2009;179(2-3):219-26.
349. Shi R, Su WW, Zhu ZT, Guan MY, Cheng KL, Fan WY, et al. Regulation effects of naringin on diesel particulate matter-induced abnormal airway surface liquid secretion. *Phytomedicine.* 2019;63:153004.
350. Harkema JR, Hotchkiss JA, Barr EB, Bennett CB, Gallup M, Lee JK, et al. Long-Lasting Effects of Chronic Ozone Exposure on Rat Nasal Epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1999;20(3):517-29.
351. Cho HY, Hotchkiss JA, Harkema JR. Inflammatory and epithelial responses during the development of ozone-induced mucous cell metaplasia in the nasal epithelium of rats. *Toxicol Sci.* 1999;51(1):135-45.
352. Sueyoshi S, Miyata Y, Masumoto Y, Ishibashi Y, Matsuzawa S, Harano N, et al. Reduced airway inflammation and remodeling in parallel with mucin 5AC protein expression decreased by s-carboxymethylcysteine, a mucoregulant, in the airways of rats exposed to sulfur dioxide. *Int Arch Allergy Immunol.* 2004;134(4):273-80.
353. Huang L, Pu J, He F, Liao B, Hao B, Hong W, et al. Positive feedback of the amphiregulin-EGFR-ERK pathway mediates PM2.5 from wood smoke-induced MUC5AC expression in epithelial cells. *Sci Rep.* 2017;7.
354. Saldiva PH, King M, Delmonte VL, Macchione M, Parada MA, Daliberto ML, et al. Respiratory alterations due to urban air pollution: an experimental study in rats. *Environ Res.* 1992;57(1):19-33.
355. Leni Z, Cassagnes LE, Daellenbach KR, Haddad IE, Vlachou A, Uzu G, et al. Oxidative stress-induced inflammation in susceptible airways by anthropogenic aerosol. *PLoS ONE.* 2020;15(11).
356. Krapf M, Künzi L, Allenbach S, Bruns EA, Gavarini I, El-Haddad I, et al. Wood combustion particles induce adverse effects to normal and diseased airway epithelia. *Environ Sci: Processes Impacts.* 2017;19(4):538-48.
357. Künzi L, Krapf M, Daher N, Dommen J, Jeannet N, Schneider S, et al. Toxicity of aged gasoline exhaust particles to normal and diseased airway epithelia. *Sci Rep.* 2015;5(1):1-10.
358. Jeannet N, Fierz M, Schneider S, Künzi L, Baumlin N, Salathe M, et al. Acute toxicity of silver and carbon nanoaerosols to normal and cystic fibrosis human bronchial epithelial cells. *Nanotoxicology.* 2016;10(3):279-91.

359. Ahmad S, Nichols DP, Strand M, Rancourt RC, Randell SH, White CW, et al. SERCA2 Regulates Non-CF and CF Airway Epithelial Cell Response to Ozone. *PLOS ONE*. 2011;6(11):e27451.
360. Ahmad S, Raemy DO, Loader JE, Kailey JM, Neeves KB, White CW, et al. Interaction and Localization of Synthetic Nanoparticles in Healthy and Cystic Fibrosis Airway Epithelial Cells: Effect of Ozone Exposure. *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv*. 2012;25(1):7-15.
361. Kamdar O, Le W, Zhang J, Ghio AJ, Rosen GD, Upadhyay D. Air pollution induces enhanced mitochondrial oxidative stress in cystic fibrosis airway epithelium. *FEBS Letters*. 29 oct 2008;582(25-26):3601-6.
362. Nguyen JP, Huff RD, Cao QT, Tiessen N, Carlsten C, Hirota JA. Effects of environmental air pollutants on CFTR expression and function in human airway epithelial cells. *Toxicology in Vitro*. 1 déc 2021;77:105253.
363. Bayram H, Devalia JL, Sapsford RJ, Ohtoshi T, Miyabara Y, Sagai M, et al. The effect of diesel exhaust particles on cell function and release of inflammatory mediators from human bronchial epithelial cells in vitro. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1998;18(3):441-8.
364. Park IH, Kang JH, Kim JA, Shin JM, Lee HM. Diesel Exhaust Particles Enhance MUC4 Expression in NCI-H292 Cells and Nasal Epithelial Cells via the p38/CREB Pathway. *Int Arch Allergy Immunol*. 2016;171(3-4):209-16.
365. Val S, Belade E, George I, Boczkowski J, Baeza-Squiban A. Fine PM induce airway MUC5AC expression through the autocrine effect of amphiregulin. *Arch Toxicol*. déc 2012;86(12):1851-9.
366. Delfino RJ, Staimer N, Tjoa T, Arhami M, Polidori A, Gillen DL, et al. Associations of Primary and Secondary Organic Aerosols With Airway and Systemic Inflammation in an Elderly Panel Cohort. *Epidemiology*. 2010;21(6).
367. Gaschen A, Lang D, Kalberer M, Savi M, Geiser T, Gazdhar A, et al. Cellular responses after exposure of lung cell cultures to secondary organic aerosol particles. *Environ Sci Technol*. 2010;44(4):1424-30.
368. Rager JE, Lichtveld K, Ebersviller S, Smeester L, Jaspers I, Sexton KG, et al. A Toxicogenomic Comparison of Primary and Photochemically Altered Air Pollutant Mixtures. *Environ Health Perspect*. 2011;119(11):1583-9.
369. Diaz EA, Chung Y, Papapostolou V, Lawrence J, Long MS, Hatakeyama V, et al. Effects of Fresh and Aged Vehicular Exhaust Emissions on Breathing Pattern and Cellular Responses – Pilot Single Vehicle Study. *Inhal Toxicol*. 2012;24(5):288-95.
370. Künzi L, Mertes P, Schneider S, Jeannet N, Menzi C, Dommen J, et al. Responses of lung cells to realistic exposure of primary and aged carbonaceous aerosols. *Atmospheric Environment*. 2013;68:143-50.
371. Di Biagio C, Formenti P, Balkanski Y, Caponi L, Cazaunau M, Pangui E, et al. Global scale variability of the mineral dust long-wave refractive index: a new dataset of in situ

- measurements for climate modeling and remote sensing. *Atmospheric Chemistry and Physics*. 9 févr 2017;17(3):1901-29.
372. Gros V, Sciare J, Yu T. Air-quality measurements in megacities: Focus on gaseous organic and particulate pollutants and comparison between two contrasted cities, Paris and Beijing. *Comptes Rendus Geoscience*. 1 oct 2007;339(11):764-74.
373. von der Weiden-Reinmüller SL, Drewnick F, Crippa M, Prévôt ASH, Meleux F, Baltensperger U, et al. Application of mobile aerosol and trace gas measurements for the investigation of megacity air pollution emissions: the Paris metropolitan area. *Atmos Meas Tech*. 28 janv 2014;7(1):279-99.
374. Baudic A, Gros V, Sauvage S, Locoge N, Sanchez O, Sarda-Estève R, et al. Seasonal variability and source apportionment of volatile organic compounds (VOCs) in the Paris megacity (France). *Atmos Chem Phys*. 26 sept 2016;16(18):11961-89.
375. Zhang H, Li H, Zhang Q, Zhang Y, Zhang W, Wang X, et al. Atmospheric Volatile Organic Compounds in a Typical Urban Area of Beijing: Pollution Characterization, Health Risk Assessment and Source Apportionment. *Atmosphere*. 2017;8(3):61.
376. Du W, Zhao J, Wang Y, Zhang Y, Wang Q, Xu W, et al. Simultaneous measurements of particle number size distributions at ground level and 260 m on a meteorological tower in urban Beijing, China. *Atmospheric Chemistry and Physics*. 9 juin 2017;17(11):6797-811.
377. Shi Z, Vu T, Kotthaus S, Harrison RM, Grimmond S, Yue S, et al. Introduction to the special issue “In-depth study of air pollution sources and processes within Beijing and its surrounding region (APHH-Beijing)”. *Atmospheric Chemistry and Physics*. 5 juin 2019;19(11):7519-46.
378. Gu Y, Huang RJ, Li Y, Duan J, Chen Q, Hu W, et al. Chemical nature and sources of fine particles in urban Beijing: Seasonality and formation mechanisms. *Environment International*. 1 juill 2020;140:105732.
379. Sun Y, Jiang Q, Wang Z, Fu P, Li J, Yang T, et al. Investigation of the sources and evolution processes of severe haze pollution in Beijing in January 2013. *Journal of Geophysical Research: Atmospheres*. 2014;119(7):4380-98.
380. Ji D, Li L, Wang Y, Zhang J, Cheng M, Sun Y, et al. The heaviest particulate air-pollution episodes occurred in northern China in January, 2013: Insights gained from observation. *Atmospheric Environment*. 1 août 2014;92:546-56.
381. Han B, Wang Y, Zhang R, Yang W, Ma Z, Geng W, et al. Comparative statistical models for estimating potential roles of relative humidity and temperature on the concentrations of secondary inorganic aerosol: Statistical insights on air pollution episodes at Beijing during January 2013. *Atmospheric Environment*. 1 sept 2019;212:11-21.
382. Clarke LL, Gawenis LR, Franklin CL, Harline MC. Increased survival of CFTR knockout mice with an oral osmotic laxative. *Lab Anim Sci*. déc 1996;46(6):612-8.

383. Livraghi-Butrico A, Grubb BR, Kelly EJ, Wilkinson KJ, Yang H, Geiser M, et al. Genetically determined heterogeneity of lung disease in a mouse model of airway mucus obstruction. *Physiol Genomics*. 15 avr 2012;44(8):470-84.
384. Hsia CCW, Hyde DM, Ochs M, Weibel ER. An Official Research Policy Statement of the American Thoracic Society/European Respiratory Society: Standards for Quantitative Assessment of Lung Structure. *Am J Respir Crit Care Med*. 15 févr 2010;181(4):394-418.
385. Crowley G, Kwon S, Caraher EJ, Haider SH, Lam R, Batra P, et al. Quantitative lung morphology: semi-automated measurement of mean linear intercept. *BMC Pulm Med*. 9 nov 2019;19:206.
386. Radermecker C, Hego A, Delvenne P, Marichal T. Identification and Quantitation of Neutrophil Extracellular Traps in Human Tissue Sections. *Bio-protocol*. 20 sept 2021;11(18):e4159-e4159.
387. Best JA, Quinton PM. Salivary secretion assay for drug efficacy for cystic fibrosis in mice. *Experimental Physiology*. 2005;90(2):189-93.
388. Droebner K, Sandner P. Modification of the salivary secretion assay in F508del mice — The murine equivalent of the human sweat test. *Journal of Cystic Fibrosis*. 1 déc 2013;12(6):630-7.
389. Bagavant H, Trzeciak M, Papinska J, Biswas I, Dunkleberger ML, Sosnowska A, et al. A Method for the Measurement of Salivary Gland Function in Mice. *J Vis Exp [Internet]*. 25 janv 2018 [cité 9 mars 2020];(131). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5828684/>
390. Varghese JJ, Schmale IL, Hansen ME, Newlands SD, Benoit DSW, Ovitt CE. Murine Salivary Functional Assessment via Pilocarpine Stimulation Following Fractionated Radiation. *J Vis Exp [Internet]*. 4 mai 2018 [cité 9 mars 2020];(135). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5999332/>
391. Grubb BR, Boucher RC. Pathophysiology of Gene-Targeted Mouse Models for Cystic Fibrosis. *Physiological Reviews*. 1 janv 1999;79(1):S193-214.
392. Boucher RC. Evidence for airway surface dehydration as the initiating event in CF airway disease. *Journal of Internal Medicine*. 1 janv 2007;261(1):5-16.
393. Clarke LL, Grubb BR, Yankaskas JR, Cotton CU, McKenzie A, Boucher RC. Relationship of a non-cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-mediated chloride conductance to organ-level disease in *Cftr*(-/-) mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 18 janv 1994;91(2):479-83.
394. Grubb BR, Paradiso AM, Boucher RC. Anomalies in ion transport in CF mouse tracheal epithelium. *Am J Physiol*. juill 1994;267(1 Pt 1):C293-300.
395. Borthwick DW, West JD, Keighren MA, Flockhart JH, Innes BA, Dorin JR. Murine Submucosal Glands Are Clonally Derived and Show a Cystic Fibrosis Gene-Dependent Distribution Pattern. *Am J Respir Cell Mol Biol*. juin 1999;20(6):1181-9.
396. Guilbault C, Saeed Z, Downey GP, Radzioch D. Cystic Fibrosis Mouse Models. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1 janv 2007;36(1):1-7.

397. Scholte BJ, Davidson DJ, Wilke M, de Jonge HR. Animal models of cystic fibrosis. *Journal of Cystic Fibrosis*. 2004;3:183-90.
398. Craig Cohen J, Lundblad LK, Bates JH, Levitzky M, Larson JE. The « Goldilocks Effect » in Cystic Fibrosis: identification of a lung phenotype in the *cftr* knockout and heterozygous mouse. *BMC Genetics*. 27 juill 2004;5(1):21.
399. Darrah RJ, Bederman IR, Mitchell AL, Hodges CA, Campanaro CK, Drumm ML, et al. Ventilatory pattern and energy expenditure are altered in cystic fibrosis mice. *Journal of Cystic Fibrosis*. juill 2013;12(4):345-51.
400. Darrah RJ, Mitchell AL, Campanaro CK, Barbato ES, Litman P, Sattar A, et al. Early pulmonary disease manifestations in cystic fibrosis mice. *Journal of Cystic Fibrosis*. nov 2016;15(6):736-44.
401. Bazett M, Haston CK. Airway hyperresponsiveness in FVB/N delta F508 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mice. *Journal of Cystic Fibrosis*. 1 juill 2014;13(4):378-83.
402. Davidson DJ, Dorin JR, McLachlan G, Ranaldi V, Lamb D, Doherty C, et al. Lung disease in the cystic fibrosis mouse exposed to bacterial pathogens. *Nat Genet*. avr 1995;9(4):351-7.
403. Bruscia EM, Zhang PX, Barone C, Scholte BJ, Homer R, Krause DS, et al. Increased susceptibility of *Cftr*^{-/-} mice to LPS-induced lung remodeling. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. 15 avr 2016;310(8):L711-9.
404. McCarron A, Donnelley M, Parsons D. Airway disease phenotypes in animal models of cystic fibrosis. *Respiratory Research*. 2 avr 2018;19(1):54.
405. Wellmerling JH, Chang SW, Kim E, Osman WH, Boyaka PN, Borchers MT, et al. Reduced expression of the Ion channel CFTR contributes to airspace enlargement as a consequence of aging and in response to cigarette smoke in mice. *Respir Res*. 2 sept 2019;20(1):200.
406. Larbig M, Jansen S, Dorsch M, Bernhard W, Bellmann B, Dorin JR, et al. Residual *cftr* Expression Varies with Age in *cftr*^{*tm1Hgu*} Cystic Fibrosis Mice: Impact on Morphology and Physiology. *Pathobiology*. 2002;70(2):89-97.
407. French PJ, van Doorninck JH, Peters RH, Verbeek E, Ameen NA, Marino CR, et al. A delta F508 mutation in mouse cystic fibrosis transmembrane conductance regulator results in a temperature-sensitive processing defect in vivo. *J Clin Invest*. 15 sept 1996;98(6):1304-12.
408. Colledge WH, Abella BS, Southern KW, Ratcliff R, Jiang C, Cheng SH, et al. Generation and characterization of a Δ F508 cystic fibrosis mouse model. *Nature Genetics*. 1 août 1995;10(4):445-52.
409. Johnson LG, Olsen JC, Sarkadi B, Moore KL, Swanstrom R, Boucher RC. Efficiency of gene transfer for restoration of normal airway epithelial function in cystic fibrosis. *Nat Genet*. sept 1992;2(1):21-5.

410. Zhou Z, Duerr J, Johannesson B, Schubert SC, Treis D, Harm M, et al. The ENaC-overexpressing mouse as a model of cystic fibrosis lung disease. *J Cyst Fibros.* 2011;10 Suppl 2:S172-182.
411. Livraghi-Butrico A, Kelly EJ, Klem ER, Dang H, Wolfgang MC, Boucher RC, et al. Mucus clearance, MyD88-dependent and MyD88-independent immunity modulate lung susceptibility to spontaneous bacterial infection and inflammation. *Mucosal Immunol.* juill 2012;5(4):397-408.
412. Hanukoglu I, Hanukoglu A. Epithelial sodium channel (ENaC) family: Phylogeny, structure-function, tissue distribution, and associated inherited diseases. *Gene.* 1 avr 2016;579(2):95-132.
413. Tetti M, Monticone S, Burrello J, Matarazzo P, Veglio F, Pasini B, et al. Liddle Syndrome: Review of the Literature and Description of a New Case. *Int J Mol Sci.* 11 mars 2018;19(3):812.
414. Fan P, Zhang D, Pan XC, Yang KQ, Zhang QY, Lu YT, et al. Premature Stroke Secondary to Severe Hypertension Results from Liddle Syndrome Caused by a Novel SCNN1B Mutation. *Kidney Blood Press Res.* 2020;45(4):603-11.
415. Livraghi-Butrico A, Kelly EJ, Wilkinson KJ, Rogers TD, Gilmore RC, Harkema JR, et al. Loss of Cfr function exacerbates the phenotype of Na⁺-hyperabsorption in murine airways. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology.* 1 avr 2013;304(7):L469-80.
416. Mall MA, Harkema JR, Trojanek JB, Treis D, Livraghi A, Schubert S, et al. Development of chronic bronchitis and emphysema in beta-epithelial Na⁺ channel-overexpressing mice. *Am J Respir Crit Care Med.* 1 avr 2008;177(7):730-42.
417. Esterly JR, Oppenheimer EH. Cystic fibrosis of the pancreas: structural changes in peripheral airways. *Thorax.* nov 1968;23(6):670-5.
418. Bedrossian CW, Greenberg SD, Singer DB, Hansen JJ, Rosenberg HS. The lung in cystic fibrosis. A quantitative study including prevalence of pathologic findings among different age groups. *Hum Pathol.* mars 1976;7(2):195-204.
419. Sobonya RE, Taussig LM. Quantitative Aspects of Lung Pathology in Cystic Fibrosis. *Am Rev Respir Dis.* août 1986;134(2):290-5.
420. Wielpütz MO, Weinheimer O, Eichinger M, Wiebel M, Biederer J, Kauczor HU, et al. Pulmonary Emphysema in Cystic Fibrosis Detected by Densitometry on Chest Multidetector Computed Tomography. *PLoS One.* 21 août 2013;8(8):e73142.
421. Mets OM, Roothaan SM, Bronsveld I, Luijk B, van de Graaf EA, Vink A, et al. Emphysema Is Common in Lungs of Cystic Fibrosis Lung Transplantation Patients: A Histopathological and Computed Tomography Study. *PLoS One.* 5 juin 2015;10(6):e0128062.
422. Wang Z, Li Y, Chen T, Zhang D, Sun F, Wei Q, et al. Ground-level ozone in urban Beijing over a 1-year period: Temporal variations and relationship to atmospheric oxidation. *Atmospheric Research.* oct 2015;164-165:110-7.

423. Chen B, Yang X, Xu J. Spatio-Temporal Variation and Influencing Factors of Ozone Pollution in Beijing. *Atmosphere*. févr 2022;13(2):359.
424. Zhao H, Zheng Y, Li T, Wei L, Guan Q. Temporal and Spatial Variation in, and Population Exposure to, Summertime Ground-Level Ozone in Beijing. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 29 mars 2018;15:628.
425. Xie J, Shi S, Wu L, Zhang X. Spatiotemporal Changes of Near-Surface Ozone Concentration From 2015 to 2018 in Beijing. *Frontiers in Environmental Science* [Internet]. 2021 [cité 7 oct 2022];9. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fenvs.2021.593220>
426. Finlayson-Pitts BJ, Pitts JN. Atmospheric Chemistry of Tropospheric Ozone Formation: Scientific and Regulatory Implications. *Air & Waste*. août 1993;43(8):1091-100.
427. Weschler CJ. Ozone in indoor environments: concentration and chemistry. *Indoor Air*. déc 2000;10(4):269-88.
428. Zhao XJ, Zhao PS, Xu J, Meng, Pu WW, Dong F, et al. Analysis of a winter regional haze event and its formation mechanism in the North China Plain. *Atmospheric Chemistry and Physics*. 13 juin 2013;13(11):5685-96.
429. Huang X, Liu Z, Liu J, Hu B, Wen T, Tang G, et al. Chemical characterization and source identification of PM_{2.5} at multiple sites in the Beijing–Tianjin–Hebei region, China. *Atmospheric Chemistry and Physics*. 2017;17(21):12941-62.
430. Romagnani S. Th1/Th2 cells. *Inflamm Bowel Dis*. nov 1999;5(4):285-94.
431. Butcher MJ, Zhu J. Recent advances in understanding the Th1/Th2 effector choice. *Fac Rev*. 15 mars 2021;10:30.
432. Quinton LJ, Nelson S, Zhang P, Boé DM, Happel KI, Pan W, et al. Selective transport of cytokine-induced neutrophil chemoattractant from the lung to the blood facilitates pulmonary neutrophil recruitment. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. mars 2004;286(3):L465-72.
433. Petri B, Sanz MJ. Neutrophil chemotaxis. *Cell Tissue Res*. 1 mars 2018;371(3):425-36.
434. Jalava P, Salonen RO, Hälinen AI, Sillanpää M, Sandell E, Hirvonen MR. Effects of Sample Preparation on Chemistry, Cytotoxicity, and Inflammatory Responses Induced by Air Particulate Matter. *Inhalation Toxicology*. 1 janv 2005;17(2):107-17.
435. Happonen MS, Salonen RO, Hälinen AI, Jalava PI, Pennanen AS, Kosma VM, et al. Dose and Time Dependency of Inflammatory Responses in the Mouse Lung to Urban Air Coarse, Fine, and Ultrafine Particles From Six European Cities. *Inhalation Toxicology*. 1 janv 2007;19(3):227-46.
436. Gao N, Xu W, Ji J, Yang Y, Wang ST, Wang J, et al. Lung function and systemic inflammation associated with short-term air pollution exposure in chronic obstructive pulmonary disease patients in Beijing, China. *Environmental Health*. 30 janv 2020;19(1):12.

437. Couper KN, Blount DG, Riley EM. IL-10: The Master Regulator of Immunity to Infection. *The Journal of Immunology*. 1 mai 2008;180(9):5771-7.
438. Gruzieva O, Merid SK, Gref A, Gajulapuri A, Lemonnier N, Ballereau S, et al. Exposure to Traffic-Related Air Pollution and Serum Inflammatory Cytokines in Children. *Environmental Health Perspectives*. 125(6):067007.
439. Janbazacyabar H, van Bergenhenegouwen J, Varasteh S, Garssen J, Folkerts G, Braber S. Repeated exposure of bronchial epithelial cells to particulate matter increases allergen-induced cytokine release and permeability. *Cytokine*. 1 juin 2022;154:155878.
440. Prunicki M, Stell L, Dinakarbandian D, de Planell-Saguer M, Lucas RW, Hammond SK, et al. Exposure to NO₂, CO, and PM_{2.5} is linked to regional DNA methylation differences in asthma. *Clin Epigenetics*. 5 janv 2018;10:2.
441. Prunicki M, Cauwenberghs N, Lee J, Zhou X, Movassagh H, Noth E, et al. Air pollution exposure is linked with methylation of immunoregulatory genes, altered immune cell profiles, and increased blood pressure in children. *Sci Rep*. 18 févr 2021;11:4067.
442. Adam M, Schikowski T, Carsin AE, Cai Y, Jacquemin B, Sanchez M, et al. Adult lung function and long-term air pollution exposure. ESCAPE: a multicentre cohort study and meta-analysis. *European Respiratory Journal*. 1 janv 2015;45(1):38-50.
443. Shaw OM, Sawyer GM, Hurst RD, Dinnan H, Martell S. Different immune and functional effects of urban dust and diesel particulate matter inhalation in a mouse model of acute air pollution exposure. *Immunology & Cell Biology*. 2021;99(4):419-27.
444. Xu M, Wang X, Xu L, Zhang H, Li C, Liu Q, et al. Chronic lung inflammation and pulmonary fibrosis after multiple intranasal instillation of PM_{2.5} in mice. *Environmental Toxicology*. 2021;36(7):1434-46.
445. Xiao J, Cheng P, Ma P, Wu Y, Feng F, Miao Y, et al. Toxicological effects of traffic-related air pollution on the lungs: Evidence, biomarkers and intervention. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 15 juin 2022;238:113570.
446. Kim BG, Lee PH, Lee SH, Kim YE, Shin MY, Kang Y, et al. Long-Term Effects of Diesel Exhaust Particles on Airway Inflammation and Remodeling in a Mouse Model. *Allergy, Asthma & Immunology Research*. 1 mai 2016;8(3):246-56.
447. Ribeiro Júnior G, de Souza Xavier Costa N, Belotti L, dos Santos Alemany AA, Amato-Lourenço LF, da Cunha PG, et al. Diesel exhaust exposure intensifies inflammatory and structural changes associated with lung aging in mice. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 15 avr 2019;170:314-23.
448. Wang J, Li Y, Zhao P, Tian Y, Liu X, He H, et al. Exposure to Air Pollution Exacerbates Inflammation in Rats with Preexisting COPD. *Mediators Inflamm*. 8 mai 2020;2020:4260204.
449. Quinton PM. Cystic Fibrosis: Lessons from the Sweat Gland. *Physiology*. juin 2007;22(3):212-25.

450. Catalán MA, Nakamoto T, Gonzalez-Begne M, Camden JM, Wall SM, Clarke LL, et al. Cftr and ENaC ion channels mediate NaCl absorption in the mouse submandibular gland. *The Journal of Physiology*. 2010;588(4):713-24.
451. Catalán MA, Scott-Anne K, Klein MI, Koo H, Bowen WH, Melvin JE. Elevated Incidence of Dental Caries in a Mouse Model of Cystic Fibrosis. *PLoS One*. 31 janv 2011;6(1):e16549.
452. Wong FH, AbuArish A, Matthes E, Turner MJ, Greene LE, Cloutier A, et al. Cigarette smoke activates CFTR through ROS-stimulated cAMP signaling in human bronchial epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 1 janv 2018;314(1):C118-34.
453. McCreanor J, Cullinan P, Nieuwenhuijsen MJ, Stewart-Evans J, Malliarou E, Jarup L, et al. Respiratory Effects of Exposure to Diesel Traffic in Persons with Asthma. *N Engl J Med*. 6 déc 2007;357(23):2348-58.
454. De Prins S, Dons E, Van Poppel M, Int Panis L, Van de Mierop E, Nelen V, et al. Airway oxidative stress and inflammation markers in exhaled breath from children are linked with exposure to black carbon. *Environ Int*. déc 2014;73:440-6.
455. Yoda Y, Otani N, Sakurai S, Shima M. Acute effects of summer air pollution on pulmonary function and airway inflammation in healthy young women. *J Epidemiol*. 2014;24(4):312-20.
456. Carraro S, Ferraro VA, Zanconato S. Impact of air pollution exposure on lung function and exhaled breath biomarkers in children and adolescents. *J Breath Res*. 19 août 2022;16(4).
457. Thaysen JH, Thorn NA, Schwartz IL. Excretion of Sodium, Potassium, Chloride and Carbon Dioxide in Human Parotid Saliva. *American Journal of Physiology-Legacy Content*. 1 juill 1954;178(1):155-9.
458. Noël S, Strale PO, Dannhoffer L, Wilke M, DeJonge H, Rogier C, et al. Stimulation of salivary secretion in vivo by CFTR potentiators in Cftr^{+/+} and Cftr^{-/-} mice. *Journal of Cystic Fibrosis*. mars 2008;7(2):128-33.
459. Romanenko VG, Nakamoto T, Srivastava A, Begenisich T, Melvin JE. Regulation of membrane potential and fluid secretion by Ca²⁺-activated K⁺ channels in mouse submandibular glands. *J Physiol*. 1 juin 2007;581(Pt 2):801-17.
460. Evans RL, Park K, Turner RJ, Watson GE, Nguyen HV, Dennett MR, et al. Severe Impairment of Salivation in Na⁺/K⁺/2Cl⁻ Cotransporter (NKCC1)-deficient Mice *. *Journal of Biological Chemistry*. 1 sept 2000;275(35):26720-6.
461. Zhang R, Khalizov AF, Pagels J, Zhang D, Xue H, McMurry PH. Variability in morphology, hygroscopicity, and optical properties of soot aerosols during atmospheric processing. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 29 juill 2008;105(30):10291-6.
462. Eriksson AC, Wittbom C, Roldin P, Sporre M, Öström E, Nilsson P, et al. Diesel soot aging in urban plumes within hours under cold dark and humid conditions. *Sci Rep*. 28 sept 2017;7:12364.

463. Bhandari J, China S, Chandrakar KK, Kinney G, Cantrell W, Shaw RA, et al. Extensive Soot Compaction by Cloud Processing from Laboratory and Field Observations. *Sci Rep*. 14 août 2019;9:11824.
464. Li J, Li J, Wang G, Ho KF, Dai W, Zhang T, et al. Effects of atmospheric aging processes on in vitro induced oxidative stress and chemical composition of biomass burning aerosols. *Journal of Hazardous Materials*. 5 janv 2021;401:123750.
465. Kaur K, Mohammadpour R, Ghandehari H, Reilly CA, Paine R, Kelly KE. Effect of combustion particle morphology on biological responses in a Co-culture of human lung and macrophage cells. *Atmos Environ* (1994). 1 sept 2022;284:119194.
466. Atwi K, Wilson SN, Mondal A, Edenfield RC, Symosko Crow KM, El Hajj O, et al. Differential response of human lung epithelial cells to particulate matter in fresh and photochemically aged biomass-burning smoke. *Atmospheric Environment*. 15 févr 2022;271:118929.
467. Lau YS, Poon HY, Organ B, Chuang HC, Chan MN, Guo H, et al. Toxicological effects of fresh and aged gasoline exhaust particles in Hong Kong. *Journal of Hazardous Materials*. 5 janv 2023;441:129846.
468. Browning IB, D'Alonzo GE, Tobin MJ. Importance of Respiratory Rate as an Indicator of Respiratory Dysfunction in Patients with Cystic Fibrosis. *CHEST*. 1 juin 1990;97(6):1317-21.
469. Korten I, Kieninger E, Yammine S, Cangiano G, Nyilas S, Anagnostopoulou P, et al. Respiratory rate in infants with cystic fibrosis throughout the first year of life and association with lung clearance index measured shortly after birth. *J Cyst Fibros*. janv 2019;18(1):118-26.
470. Straßburg S, Linker CM, Brato S, Schöbel C, Taube C, Götze J, et al. Investigation of respiratory rate in patients with cystic fibrosis using a minimal-impact biomotion system. *BMC Pulmonary Medicine*. 11 févr 2022;22(1):59.
471. Wang X, Liao YP, Telesca D, Chang CH, Xia T, Nel AE. The Genetic Heterogeneity among Different Mouse Strains Impacts the Lung Injury Potential of Multi-walled Carbon Nanotubes. *Small*. sept 2017;13(33):10.1002/sml.201700776.

VIII. Annexes



The Impact of Air Pollution on the Course of Cystic Fibrosis: A Review

Marion Blayac¹, Patrice Coll², Valérie Urbach¹, Pascale Fanen^{1,3}, Ralph Epaud^{1,4} and Sophie Lanone^{1*}

¹Univ Paris Est Creteil, INSERM, IMRB, Creteil, France, ²Université Paris Cité and Univ Paris Est Créteil, CNRS, LISA, Paris, France, ³AP-HP, Hôpital Henri-Mondor, Service Génétique, Creteil, France, ⁴Centre Hospitalier Intercommunal, Centre des Maladies Respiratoires Rares (RespiRare®)-CRCM, Creteil, France

Cystic fibrosis (CF) is a lethal and widespread autosomal recessive disorder affecting over 80,000 people worldwide. It is caused by mutations of the *CFTR* gene, which encodes an epithelial anion channel. CF is characterized by a great phenotypic variability which is currently not fully understood. Although CF is genetically determined, the course of the disease might also depend on multiple other factors. Air pollution, whose effects on health and contribution to respiratory diseases are well established, is one environmental factor suspected to modulate the disease severity and influence the lung phenotype of CF patients. This is of particular interest as pulmonary failure is the primary cause of death in CF. The present review discusses current knowledge on the impact of air pollution on CF pathogenesis and aims to explore the underlying cellular and biological mechanisms involved in these effects.

OPEN ACCESS

Edited by:

Amy L. Ryan,
The University of Iowa, United States

Reviewed by:

Steven Molinski,
University of Toronto, Canada
Ian Michael Thomell,
The University of Iowa, United States

*Correspondence:

Sophie Lanone
sophie.lanone@inserm.fr

Specialty section:

This article was submitted to
Respiratory Physiology and
Pathophysiology,
a section of the journal
Frontiers in Physiology

Received: 30 March 2022

Accepted: 13 May 2022

Published: 02 June 2022

Citation:

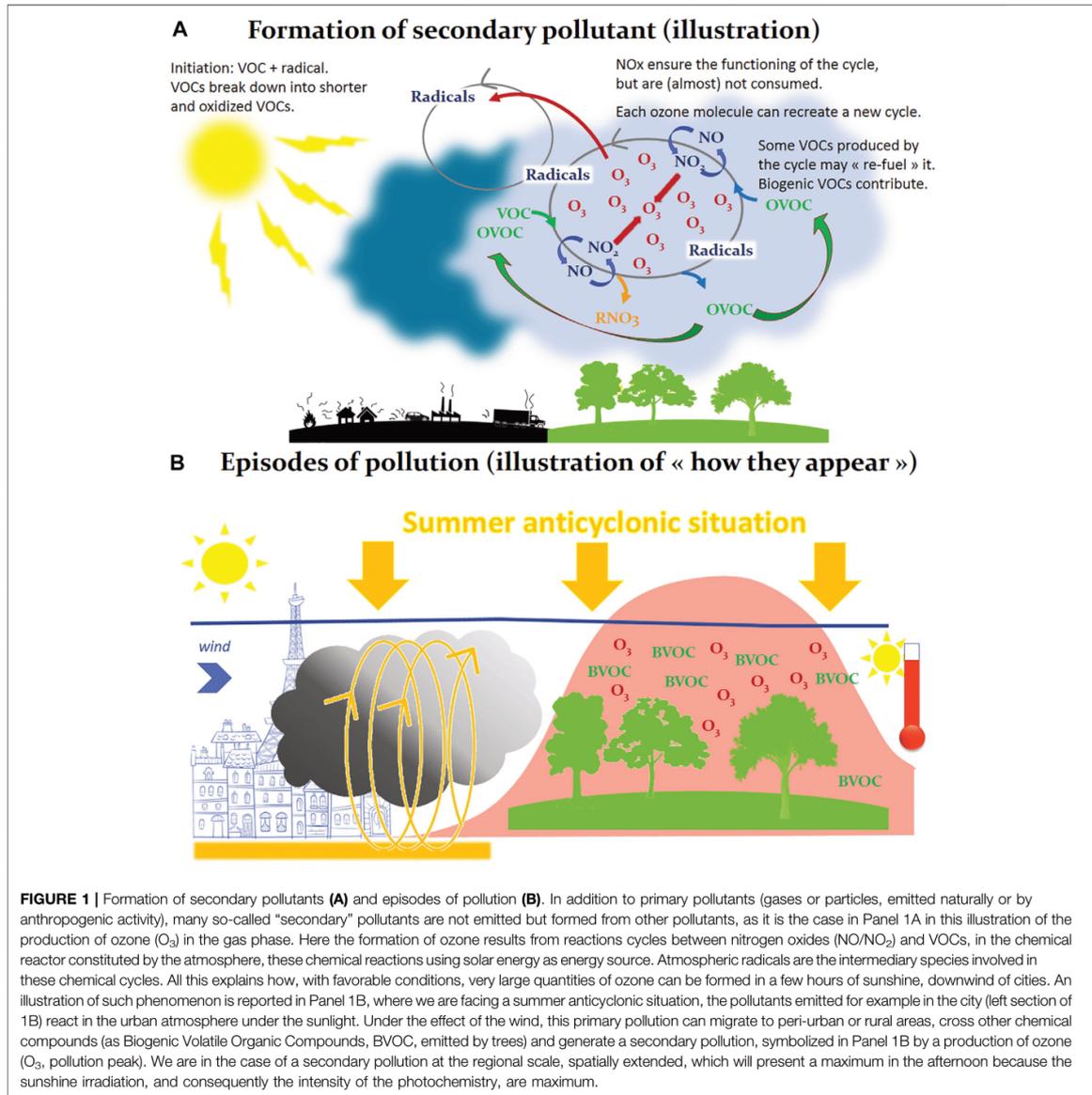
Blayac M, Coll P, Urbach V, Fanen P,
Epaud R and Lanone S (2022) The
Impact of Air Pollution on the Course of
Cystic Fibrosis: A Review.
Front. Physiol. 13:908230.
doi: 10.3389/fphys.2022.908230

Keywords: cystic fibrosis, air pollution, environmental factors, acute exposure, chronic exposure, CF models

INTRODUCTION

Cystic Fibrosis (CF) is a monogenic disease caused by pathogenic mutations in the Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator (*CFTR*) gene which encodes the CFTR protein, an anion channel responsible for chloride and bicarbonate ion transport across epithelial cells. For a more complete description of CF disease please, refer to Shteinberg et al. (2021). CFTR also regulates many other mechanisms in epithelial physiology and has been reported to inhibit the epithelial Na⁺ channel (ENaC) activity in the airways. Dysfunctional CFTR results in dehydration of airway surface liquid (ASL) and is associated with persistent airway infection and sustained inflammation, leading to obstructive lung disease and progressive structural damage (Boucher, 2007). While CF is a systemic disease characterized by altered lung mucociliary clearance, exocrine pancreatic insufficiency, intestinal obstruction and infertility, the bronchopulmonary disease remains the main driver of the high morbidity and early mortality of CF patients (Elborn, 2016). The progression of the disease mainly depends on pulmonary exacerbations defined as acute deterioration of respiratory symptoms which ultimately impair lung function and quality of life (Ferkol et al., 2006; Stanford et al., 2021). These exacerbations' episodes, most frequently caused by lung bacterial infections, include increased cough, increased sputum production, increased use of antibiotics, dyspnea, and decreased lung function. Repeated exacerbation events, chronic infection and persistent inflammation lead to progressive and irreversible lung damage and respiratory failure (Sanders et al., 2010, 2011; de Boer et al., 2011; Waters et al., 2012).

CF patients present a great genotypic variability with more than 2,000 *CFTR* gene mutations identified so far (Rommens, 2011). These mutations are classified into six classes based on their effect on CFTR synthesis and function (Elborn, 2016). Each of these mutations occurs at a variable



frequency (Lao et al., 2003; De Boeck et al., 2014) with a heterogeneous geographical distribution (Mirtajani, 2017). Class I–III mutations are usually associated with a more severe CF disease prognosis as CFTR protein function is totally suppressed. Class IV–VI mutations are characterized by a residual CFTR function and usually cause a disease of more moderate severity (Elborn, 2016). Interestingly, while CFTR genotype correlates well globally with the pancreatic phenotype, it mostly fails to predict pulmonary-disease severity (Burke et al., 1992; The Cystic Fibrosis Genotype-Phenotype Consortium, 1993; Kerem and

Kerem, 1996; Duguéproux and De Braekeleer, 2004; Cutting, 2015; Raynal and Corvol, 2020). Twin and sibling studies have shown a smaller difference in lung function between monozygotic twins than between dizygotic twins or siblings (Collaco et al., 2010). Such difference appears to increase when twins and siblings start living apart and stop sharing common environment. This phenotypic variability suggests the involvement of other contributors especially to the CF airway disease, unrelated to CFTR itself. Several genes (i.e., *NOS*, *TGFBI*, *MBL2*, *MUC4/MUC20*, *SLC9A3*, *SLC6A14* or *HLA* Class II) have

been identified as possible gene modifiers of CF lung disease (Corvol et al., 2015; Sepahzad et al., 2021). The splicing machinery could also modify CF severity (Nissim-Rafinia and Kerem, 2005). Beside these genetic and epigenetic modifiers, non-genetic factors also appear as relevant modifying contributors to CF pathophysiology; environmental factors (Szczesniak et al., 2020) such as tobacco smoke (Campbell et al., 1992; Kopp et al., 2016), air pollution (Brugha et al., 2018), climate and seasonal changes (Ramsay et al., 2016) or socioeconomic status (Oates and Schechter, 2016). This review particularly focuses on the contribution of air pollution.

Outdoor air pollutants are numerous (several hundreds to several thousands of chemical species), for most of them at trace levels (from few ppb—parts per billion, to ppm—parts per million), and are gaseous (nitrogen dioxide—NO₂, carbon dioxide—CO₂, methane—CH₄, etc.) but also under particular phases: these atmospheric particles, or *aerosols*—also referred to as particulate matter—are a suspension of liquid or solid in the gas phase and are categorized according to their size—coarse particles (PM₁₀), fine particles (PM_{2.5}) and ultrafine particles (PM_{0.1}). Pollutants can be divided into two groups related to their origin: 1) primary pollutants which are air pollutants emitted directly from a source—as an illustration nitrogen oxides (NO_x) or soot particles mainly emitted from traffic; 2) secondary pollutants that are not directly emitted, but are formed when other pollutants react in the lower atmosphere—as an illustration the production of the oxidant ozone (O₃) resulting from reactions between nitrogen oxides (NO_x) and volatile organic compounds (VOCs) (Figure 1A) (Walker, 1977). These numerous chemical compounds, gases and aerosols, react continuously in the atmosphere under solar irradiation, and are also stirred and transported in the atmosphere (Holton et al., 1995). Thus, the composition of the atmosphere varies according to time and space (in the order of few seconds and few meters for OH, and of 10 years and 1.000 km for CH₄; illustrations and more extended descriptions may be found in (Wayne, 2000; Ravishankara, 2003). These well-known atmospheric composition and evolution are illustrated by Figures 1A,B. Much more details may be found in (Seinfeld and Pandis, 2016).

Public health concerns, with raising questions about the impact of air pollution on our health, has driven to monitor and predict air quality (as in the case of meteorology). Atmospheric measurements are carried out throughout the world, in a more or less intense way depending on the level of development of the countries. The number of measuring stations, and their distribution on the territories, answer to rules or laws (as an example in France, rules are stated at the European level). These rules are essential to guarantee a quality of measurement that is comparable from one region or country to another (Kracht et al., 2018). For example, in the Paris region, different types of measurements and analysis stations are spread over a 100 km radius around Paris and measure the quality of the air breathed by the population (more than 12 million inhabitants in the whole region), regardless of their environment, near or far from the sources of pollution. The network in charge of these measurements has about 70 measuring stations, including more than 50 permanent stations, acting as mini static laboratories (Rodriguez et al., 2019).

Automatic stations (measuring for example O₃, NO_x, sulfur dioxide—SO₂, carbon monoxide—CO, etc.) ensure a continuous measurement every hour usually, and allow a real time follow-up of the air quality. The choice of the location of the automatic stations and of the types of the pollutants measured in these stations is primarily based on public health concerns. There are several types of stations: background stations (far from pollution sources, in particular traffic routes), near traffic stations (located near a road infrastructure as area representative of the maximum level of exposure for the population), urban stations (monitoring the average exposure of the population to air pollution phenomena known as “background” in urban centers), peri-urban stations (monitoring the photochemical pollution, in particular O₃ and its precursors, and monitoring the average level of exposure of the population to “background” air pollution phenomena on the outskirts of the urban center), rural stations (monitoring of the exposure of ecosystems and of the population in rural areas to “background” air pollution, in particular photochemical pollution, at a regional scale) and industrial site stations (information on concentrations measured in areas representative of the maximum level to which the population near a stationary source is likely to be exposed by plume or accumulation phenomena). Such continuous monitoring allows to measure the level of exposure of individuals over different times scales, either acutely (referring to an exposure lasting from 1 day to a few days as during an air pollution episode) or chronically (referring to a continuous or repeated exposure over a long period of time, from months to years). In addition, some pollutants are not measured automatically and in real time by the stations but are measured by sampling followed by delayed analysis techniques in specific laboratories, or even by dedicated measurement field campaigns. Finally, automatic station network can be reinforced by measurements using diffusion tubes. This method guarantees a regular but not continuous monitoring and allows to calculate an annual average and to estimate the situation with regard to the regulatory values.

Numerical modeling (Chemistry Transport Models) is a complementary tool to pollutant emission measurements and inventories. It allows to estimate the concentrations of various pollutants at any point of a given geographical area, for past, present, or future periods. These numerical tools are based on the representation of the phenomena involved in the formation and fate of air pollution: chemical transformations, transport, dispersion, emissions, and depositions. These different numerical models operate at various temporal and geographical scales (from the street scale to the continental scale) and their use requires to characterize the parameters influencing the concentrations of pollutants (for example meteorology). Overall, the use of this mathematical tool supports air quality monitoring, as it allows to characterize the air pollution at any point of the represented geographical domain.

The challenge of measuring reactive trace species in the atmosphere (at ppt—parts per trillion to ppm levels), ideally on a continuous basis, and of integrating these data into the Chemistry Transport Models in order to characterize the exposure of populations at a given location over a given

period of time, is therefore a very high-level challenge. This is the main barrier to linking the effects of air pollution to the observed health impacts on populations.

Amongst these hundreds of pollutants, some so-called “indicators” (such as O₃, NO₂, SO₂, PM_{2.5}, and PM₁₀) are under official monitoring in most countries and are expected to fit air quality guidelines. World Health Organization (WHO) estimates that 99% of people worldwide breath polluted air, with effects on health that are clearly established (World Health Organization, 2021). Accounting for 4.2 million premature deaths yearly worldwide (World Health Organization, 2021), ambient air pollution currently constitutes the major environmental threat for human health and ranks as the fourth leading risk factor for premature deaths (Health Effects Institute, 2020). Regarding respiratory effects, it is well documented that air pollution reduces lung function (Paulin and Hansel, 2016), worsens respiratory condition of patients with pre-existing pathologies such as asthma and chronic obstructive pulmonary disease (COPD) (Hoek et al., 2013; Thurston et al., 2020) and increases lung cancer incidence (Raaschou-Nielsen et al., 2013). Since 2013, air pollution has been classified as carcinogenic to humans by the International Agency for Research Cancer (IARC) (International Agency for Research on Cancer, 2013). In a recent paper, the loss of life expectancy from ambient air pollution was shown to be 2.9 years (Lelieveld et al., 2020). In addition, it is estimated that the mean life expectancy would increase by 1.7 years if all anthropogenic emissions were removed. For children, air pollution is associated with increased preterm birth and low birth weight (Stieb et al., 2012; Dadvand et al., 2013; Fleischer et al., 2014), reduced pulmonary growth and lung function (Gauderman et al., 2007; Hwang et al., 2015; Milanzi et al., 2018) together with an increased risk of developing respiratory diseases (Goldizen et al., 2016).

With known effects for healthy people as well as for people with pre-existing condition(s), air pollution could constitute an important contributing factor for CF disease. Moreover, in a context where air pollution is often above WHO’s recommended values and where CF patients live older (while being diagnosed at birth in most cases), it is of particular interest to consider air pollution and its possible harmful effects on the course of the disease. Strikingly, studies dealing with specific implication of air pollution on the course of CF airway disease are scarce and only quite recent. Our goal here is to review the actual knowledge on the role of air pollution in the phenotypic variability observed in CF as well as to highlight recent advances in the underlying mechanisms.

SEARCH STRATEGY

Studies of interest were identified by searching PubMed from 1990 to present with the term “cystic fibrosis” or “CFTR” combined with the specific terms “air pollution” or “particulate matter,” “ozone,” “nitrogen dioxide,” “sulfur dioxide,” “diesel” or “exhaust.” Key words search was limited to title and abstract. Human as well as mouse studies were considered. Among the 62 studies retrieved after this search,

14 were chosen based on their title and abstract. Studies were included if they assessed health outcomes in people with CF or in CF experimental models in relation with air pollution exposure measurement data or experimental exposure. Though conducted in non-CF airway cells and non-CF mouse model, two more studies were included because they investigated direct effects of pollutants on CFTR expression and/or function and airway fluid secretion. Finally, one additional study was identified when reviewing references of the articles initially selected. A total of 17 studies were overall included in this review (Tables 1, 2, 3).

HEALTH OUTCOMES OF AIR POLLUTION EXPOSURE IN CYSTIC FIBROSIS PATIENTS

Chronic Exposures

The first studies describing health outcomes of air pollution exposure in CF patients have focused on chronic exposures. There is only four of them so far. The very first study to address this issue has been published by Goss et al. (2004), in 2004, who surveyed a cohort of 11,484 patients during a 2 year-interval. In this study, the mean annual values for O₃, NO₂, SO₂, CO, and particulate matter (PM) were considered. Authors linked the exposure data to pulmonary function, exacerbations and mortality data. Pulmonary function was estimated with forced expiratory volume in 1 s (FEV₁) and exacerbations were defined as a “condition requiring hospitalization” or as “the at home use of intravenous antibiotics.” A negative linear association was found between lung function and particulate pollution (PM_{2.5} and PM₁₀); for a 10 µg/m³ increase in PM_{2.5} and PM₁₀, a significant decrease in FEV₁ was observed (Table 1). No association was found with the other pollutants (O₃, NO₂, SO₂, and CO). As for exacerbations, patients were divided into two groups according to the number of exacerbations experienced during the study period: none or one exacerbation versus two or more. The characterization of groups showed that the patients with more than two exacerbations were globally older, had a reduced lung function, a worse nutritional status and were more likely to be infected with the bacteria *Pseudomonas aeruginosa* (*P.aeruginosa*) and *Burkholderia cepacia* complex (*B.cepacia*) compared to those who suffer less than two exacerbations. Patients with two or more exacerbations also lived in regions with higher levels of PM_{2.5}, PM₁₀, and O₃. Authors showed that, for every 10 µg/m³ increase in PM_{2.5} and PM₁₀ concentration, there was respectively a 21% and 8% higher risk of presenting more than two exacerbations (Table 1). Moreover, a 10-ppb increase in O₃ concentration resulted in 10% increase in that same risk. No difference in the mean annual concentrations of NO₂, SO₂, and CO was observed between the two groups and no significant association with the exacerbation number was noted for these pollutants. Finally, although the result was not significant, a 10 µg/m³ increase in PM_{2.5} exposure substantially increased the mortality risk (32% higher risk).

In another study, Jassal et al. (2013) took in consideration the participant’s home distance to a major road or freeway in addition to O₃ and PM_{2.5}. The goal here was to use the

TABLE 1 | Summary and comparison of results obtained by epidemiological studies.

Study author/Year (References)	n (participants)	Exposure data-Pollutants concentration	Number of exacerbations	Clinical outcome	
				Lung function (as FEV ₁)	Primary infection
Chronic exposure Goss et al. (2004)	11 484	PM_{2.5} = 13.7 (4.2) µg/m³ PM₁₀ = 24.8 (7.8) µg/m³ O₃ = 51 (7.3) ppb	↗ (^a) OR = 1.21 (1.07–1.33) for PM _{2.5} OR = 1.08 (1.02–1.15) for PM ₁₀ OR = 1.10 (1.03–1.17) for O ₃	↘ (^a) ↘ FEV ₁ of 155 ml (115–194) for PM _{2.5} ↘ FEV ₁ of 38 ml (18–58) for PM ₁₀	N.A.
Jassal et al. (2013)	145	PM _{2.5} = 16.57 (13–17.6) µg/m ³ O ₃ = 0.12 (0.11–0.14) ppm Residential proximity to a major roadway	↗ (^b) OR = 6.7 (1.23–54.49) for residence/road distance	N.A.	N.A.
Psoter et al. (2015)	3 575	PM_{2.5} = 12.3 (2.7) µg/m³	N.A.	N.A.	↗ P.aeruginosa (^b) HR = 1.24 (1.01–1.51) for PM _{2.5}
Psoter et al. (2017)	3 012–4 255	PM_{2.5} = 12.31 (2.68) µg/m³	N.A.	N.A.	↗ MRSA (^b) HR = 1.56 (1.13–2.14) for PM _{2.5}
Acute exposure Goerminne et al. (2013)	215	PM₁₀ = 24 (17.6–32.1) µg/m³ O₃ = 72.4 (57.3–90.3) µg/m³ NO₂ = 23.9 (17.2–31.9) µg/m³	↗ (^a) OR = 1.043 (1.004–1.084) for PM ₁₀ OR = 1.106 (1.05–1.166) for O ₃ OR = 1.034 (1.003–1.067) for NO ₂	N.A.	N.A.
Farhat et al. (2013)	103	PM ₁₀ = 42.03 (18.63) µg/m ³ O₃ = 76.82 (36.81) µg/m³ NO ₂ = 103.02 (35.56) µg/m ³	↗ (^c) RR = 1.86 (1.14–3.02) for O ₃	N.A.	N.A.

PM, particulate matter; O₃, ozone; NO₂, nitrogen dioxide; FEV₁, Forced Expiratory Volume in 1 s; MRSA, Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus; N.A., Not Available; Pollutants concentrations are presented as Median (Q1–Q3) or as Mean (SD). Pollutants in bold are those significantly associated with change in clinical outcome.

^aEffects observed for a 10 µg/m³ or 10 ppb increase in pollutant concentration.

^bEffects observed for a 1,000 m decrease in residential/major roadway distance.

^cEffects observed for an interquartile range (45.62 µg/m³) increase in O₃ concentration. OR, Odds-Ratio; RR, relative risk; HR, Hazard Risk. Ratios are presented with their 95% confidence interval in parentheses.

TABLE 2 | *In vivo* experimental studies.

Study author/ Year (References)	n	Animal model	Biological outcome	Pollutants	Exposure data
Qu et al. (2009)	—	Wistar rat	CFTR expression	O ₃	1-h per day 1.5 ppm O ₃ for 3 days
Shi et al. (2019)	6	BALB/c mice	Airway surface liquid secretion CFTR expression	Diesel particulate matter	0.5 mg, 10 µg/µl
Geiser et al. (2014)	2–35	Cfr ^{tm1HGU} mice	Lung function Localization and biokinetics of NP Inflammation	TiO ₂ and CNP	1-h TiO ₂ NP inhalation: 20 nm, 30–40 µg/m ³ CNP Intratracheal instillation: 5–12 nm, 20 µg, 0.4 µg/µl
Geiser et al. (2013)	2–4	Senn1b-Tg mice	Cellular uptake and localization of NP	Au NP	2-h inhalation AuNP, 21 nm, 1.2 mg/m ³

O₃, ozone; NP, nanoparticles; TiO₂, titanium dioxide; C, carbon; Au, Gold.

TABLE 3 | *In vitro* experimental studies.

Study author/ Year (References)	n	Cell model	Biological outcome	Pollutants	Exposure data
Kamdar et al. (2008)	3	CF IB3-1 and WT S-9 human bronchial epithelial cell lines	Cellular viability Apoptosis ROS production	PM _{2.5}	Exposure by aerosolization (1 h) 25 µg/cm ²
Ahmad et al. (2011)	3–6	ALI cultures of non-CF and CF cell lines and primary airway epithelial cell cultures derived from non-CF and CF patients	Cell survival Pro-inflammatory cytokines	O ₃	100–1,000 ppb O ₃ for 4–18 h
Jeannet et al. (2016)	4	ALI cultures of normal and CF HBE cells and BEAS-2B bronchial epithelial cell line	Epithelial integrity Cell death Pro-inflammatory mediators	Ag and C NP	Exposure by aerosolization (36–3 600 s) 20 nm for both NP AgNP: 2, 18, and 176 ng/cm ² CNP: 0.3, 33, and 189 ng/cm ²
Leni et al. (2020)	9	ALI cultures of normal and CF HBE cells	Cytotoxicity Pro-inflammatory mediators Gene expression	PM _{2.5} and PM ₁₀	Water solubilization of PM filter extracts Exposure for 4 h Low doses: 0.9–2.5 µg/cm ² High doses: 8.8–25.4 µg/cm ²
Künzi et al. (2015)	3–6	ALI cultures of normal and CF HBE cells and BEAS-2B bronchial epithelial cell line	Cytotoxicity Pro-inflammatory mediators	Aged gasoline exhaust particles (secondary organic aerosol)	2-h aerosolization Particle dose deposited: 10–350 ng/cm ²
Krapf et al. (2017)	3	ALI cultures of normal and CF HBE cells and BEAS-2B bronchial epithelial cell line	Cell death Oxidative markers Inflammatory response	Wood combustion particles (primary and secondary aerosols)	2-h aerosolization Deposited mass: - Primary: 133.2–199.5 ng/cm ² - Secondary: 183.3–301.4 ng/cm ²
Ahmad et al. (2012)	3–6	ALI cultures of non-CF and CF cell lines and primary airway epithelial cell cultures derived from non-CF and CF patients	NP deposition and uptake Cell death and cellular integrity Pro-inflammatory cytokine IL-8	Polystyrene NP and O ₃	24-h exposure to aerosolized NP (40 nm, 0.1 µg/cm ²) 200–500 ppb O ₃ for 8 h

(Continued on following page)

TABLE 3 | (Continued) *In vitro* experimental studies.

Study author/ Year (References)	n	Cell model	Biological outcome	Pollutants	Exposure data
Qu et al. (2009)	4–7	Normal HBE cells	CFTR expression CFTR chloride current Signal pathways	O ₃	1.5 ppm O ₃ for 30 min
Shi et al. (2019)	4	Calu-3 cells	Cell viability Airway surface liquid secretion CFTR expression	Diesel particulate matter	100–400 µg/ml for 24–48 h

ALI, Air-Liquid Interface; ROS, reactive oxygen species; PM, particulate matter; O₃, Ozone; Ag, Silver; C, carbon; NP, nanoparticles.

proximity to roadways as a proxy for long-term traffic pollution, as concentrations of particles are elevated near roads due to emissions by vehicles exhaust. This 5-year retrospective study, dedicated to study the effects of air pollution on pulmonary exacerbation frequency, was conducted in 145 CF patients. Exacerbation and patient's categorization were defined as in Goss's study. No significant difference in O₃ and PM_{2.5} levels could be found between the two exacerbation groups. Residential proximity to a roadway was however higher for individuals who experienced more than two exacerbations (Table 1). While the pollutant levels were similar between studies, the failure to replicate O₃ and PM_{2.5} effects observed by Goss is probably due to a lack of statistical power in Jassal's study. This latter study is however the first to describe the influence of proximity to traffic on the clinical condition of CF patients as opposed to classical quantitative measures of pollutants. Of note, proximity to traffic implies the consideration of pollutants other than the ones usually measured. Eventually, these results suggest that residential proximity to roadway could increase the susceptibility for acute exacerbation events in CF patients.

Bacterial colonization constitutes a central element of exacerbations and a key determinant of the severity of exacerbation episodes in CF. Psoter et al. (2015) formulated the hypothesis that exposure to air pollution could increase the risk of primary infection by *P.aeruginosa*. Although this micro-organism is the major respiratory pathogen in CF patients with an initial colonization usually occurring within the first 10 years of life, earlier *P.aeruginosa* infection, particularly before the age of five is strongly associated with a more severe CF lung disease later (Pittman et al., 2011). Psoter et al. (2017) therefore followed children under the age of 6 (3,575) and recorded the time to initial acquisition of *P.aeruginosa*, defined as the apparition of a first positive respiratory culture while on study. For exposure evaluation, the mean yearly PM_{2.5} concentration during the year preceding birth of each child was considered. During a mean follow-up period of 1.8 years, 1,711 (48%) children acquired *P.aeruginosa* with a median age of acquisition of 15 months. Exposure to PM_{2.5} was found to be slightly higher among children who acquired *P.aeruginosa* during the follow-up period compared to those who remained uninfected. In addition, a 10 µg/m³ PM_{2.5} concentration

increase was significantly associated with a 24% increase in the risk of primary colonization by *P.aeruginosa* (Table 1). In a companion study based on the same cohort and experimental design, Psoter and colleagues evaluated if exposure to PM_{2.5} could be a risk factor for the initial acquisition of other respiratory pathogens in young CF children. They looked at the methicillin-sensitive (MSSA) and -resistant (MRSA) forms of *Staphylococcus aureus*, *Stenotrophomonas maltophilia* and *Achromobacter xylosoxidans*. Similar to the initial study, children who declared colonization during the follow-up period had a greater PM_{2.5} exposure compared to those who remained free of pathogens, independently of the pathogen considered. A 10 µg/m³ increase in PM_{2.5} exposure was associated with a 68% increased risk of MRSA acquisition but was not associated with the acquisition of other respiratory pathogens (Table 1).

Acute Exposures

Only two studies so far have focused on the effects of acute exposure to pollution peaks on the course of CF disease. Goeminne et al. (2013) led a case-crossover retrospective study over a period of 12 years (Table 1). The goal was to explore the link between the short-term increase in PM₁₀, O₃, and NO₂ and the onset of pulmonary exacerbations. An exacerbation was defined by the use of oral or intravenous antibiotics for respiratory event. Pollution levels were calculated for the last 2 days before and on the day of the exacerbation event. Data analysis showed an increase in the number of exacerbations on days with higher air pollution (Table 1). The authors found a significant association for a 10 µg/m³ increase in all three pollutants and same-day exacerbation onset. An overall increase in risk was also observed throughout the three measured days suggesting pollution peaks could have delayed effects. The strength of this study is its case-crossover design in which every subject is its own control, thus reducing the influence of confounding factors.

In a more size-limited study, Farhat et al. (2013) studied the effects of short-term variations in the concentrations of air pollutants. The study was conducted in the metropole of Sao Paulo on the occurrence of exacerbations in 103 CF children and teenagers for 1 year (Table 1). Exacerbation was defined as the presence of at least three of the following symptoms: fever,

increase in sputum production or cough intensity, change in sputum color, worsening dyspnea, loss of appetite, >10% decrease of FEV₁, or weight loss. The occurrence of exacerbation was then compared to daily mean concentrations of O₃, SO₂, NO₂, PM₁₀, and CO obtained from monitoring stations spread across the city. The authors reported a higher relative risk of exacerbation when O₃ concentration increased by an interquartile range (45.62 µg/m³) (Table 1). A significant association was observed for an O₃ increase 2 days before the onset of exacerbation and a tendency was observed for O₃ exposure the day prior and the same day as the exacerbation. No statistically significant association was found between other pollutants and the occurrence of exacerbation in patients with CF. Indeed, O₃ was the only pollutant exceeding national Brazilian standards as well as the WHO air quality guidelines during the study, hence reaching unhealthy levels while other pollutants levels were considered acceptable. However, this study raises several questions as many key elements are not described: the spatial variability of the concentrations of pollutants that allow to differentiate patients; the study of correlations between different pollutants (why are PM excluded from impacting pollutants when they are correlated with NO₂?); the lack of temporal visibility of pollutant concentrations and the ability to predict the impact on disease on fine time scales; the insufficiently explicit use of clinical data and their very patchy aspect. Also, the physiological importance in defining exacerbation severity differs between criteria (fever vs. >10% decrease of FEV₁). Overall, a clarification of the positive criteria related to an exacerbation would have provided the necessary information. The discrepancy with Goeminne's study regarding the impact of PM₁₀ and NO₂ levels may be explained by the methods used for exposure data estimation. Interestingly, levels of PM₁₀ and NO₂ reported by Farhat were higher than Goeminne's with respective mean concentrations of 42 µg/m³ and 103 µg/m³ against median concentrations of 24 µg/m³ for the two pollutants (Table 1) (Goeminne et al., 2013). These results are consistent with the fact that Farhat's study was conducted in a highly polluted metropole. However, both studies came to comparable O₃ concentration. More likely, the absence of association between the increase of PM₁₀ and NO₂ concentration and the occurrence of respiratory exacerbation in the Brazilian study might be explained by the smaller size of the panel but also by the difference in exacerbation definition and inclusion criteria. Goeminne's definition is restrictive to severe exacerbations because a lot of exacerbations are treated with only oral and/or aerosolized antibiotics. Also, patients who had no exacerbation or no registered use of antibiotic were excluded. Exacerbation definition is less stringent in Farhat's study which covers a larger panel of CF patients, including patients who did not undertake antibiotic therapy. This may have accounted for a possible not significant impact of other pollutants in Farhat's study and could suggest that NO₂ and PM₁₀ mainly target airways and favor infection while O₃ would have a wider impact on other organ function. Finally, patients' status at the time of the study could also explain the difference

observed. Indeed, in Farhat's study, 70% of CF patients did not present a significant degree of bronchial obstruction and their median Shwachman-Kulczycki score (assessment of CF disease severity based on general activity, physical examination, nutrition and radiological findings) was 75 corresponding to a "Good" clinical condition, while no details on disease severity was provided in Goeminne's study. Overall, both studies bring additional elements to consider acute exposure to air pollution as negatively impacting the course of CF disease.

EFFECTS OF AIR POLLUTION EXPOSURE IN EXPERIMENTAL MODELS OF CYSTIC FIBROSIS

Overall, epidemiological studies on CF patients have highlighted an increased risk of exacerbations, primary infections and reduced lung function associated with air pollution exposure. If these studies identify a negative impact of global air pollution on the course of CF, they however leave remaining questions about how these effects originate. The following chapter is dedicated to present experimental studies designed to answer these questions.

In Vivo Studies

As central contributors to CF airway pathophysiology, the expression of CFTR and airway secretions have been investigated in response to air pollution. A markedly reduced immunofluorescence staining of CFTR was observed in tracheal respiratory epithelium of rats exposed to O₃ (Qu et al., 2009). A decrease of about 25% in mRNA and protein expression of CFTR and aquaporins 1 (AQP1) and 5 (AQP5) was observed in normal BALB/c mice exposed to diesel particulate matter (Shi et al., 2019). The underlying mechanisms of action of such reduced CFTR expression have not been studied *in vivo*, nor the effect of diesel particulate matter on CFTR channel function. Importantly, the reduced expression of CFTR and aquaporins could result in a decreased cell permeability to water and ions and thus ASL secretion, two key features of CF. Shi et al. (2019) also described an increased Muc5AC mucin expression in BALF in the same mice. Interestingly, although not in the context of CF, O₃, SO₂, and particles were found to induce mucous cell metaplasia (Harkema et al., 1999; Sueyoshi et al., 2004), increase mucin expression (Jany and Basbaum, 1991; Cho et al., 1999; Huang et al., 2017) and impair mucociliary clearance and ciliary beating frequency (Pedersen, 1990; Saldiva et al., 1992; Bayram et al., 1998) in rat airway epithelium and human airway epithelial cells. These events would be interesting to consider since they are altered in CF but not yet studied in relation to air pollution exposure in CF models. Unfortunately, no dose-response relationship could be established, as only one dose for O₃ and diesel particulate matter was used in these animal studies.

In vivo studies investigating the effects of air pollution on CF models remain sparse (Table 2), compared to those performed in other models of bronchial disease, such as asthma or COPD. Carbon nanoparticles (CNP), particularly abundant in urban air

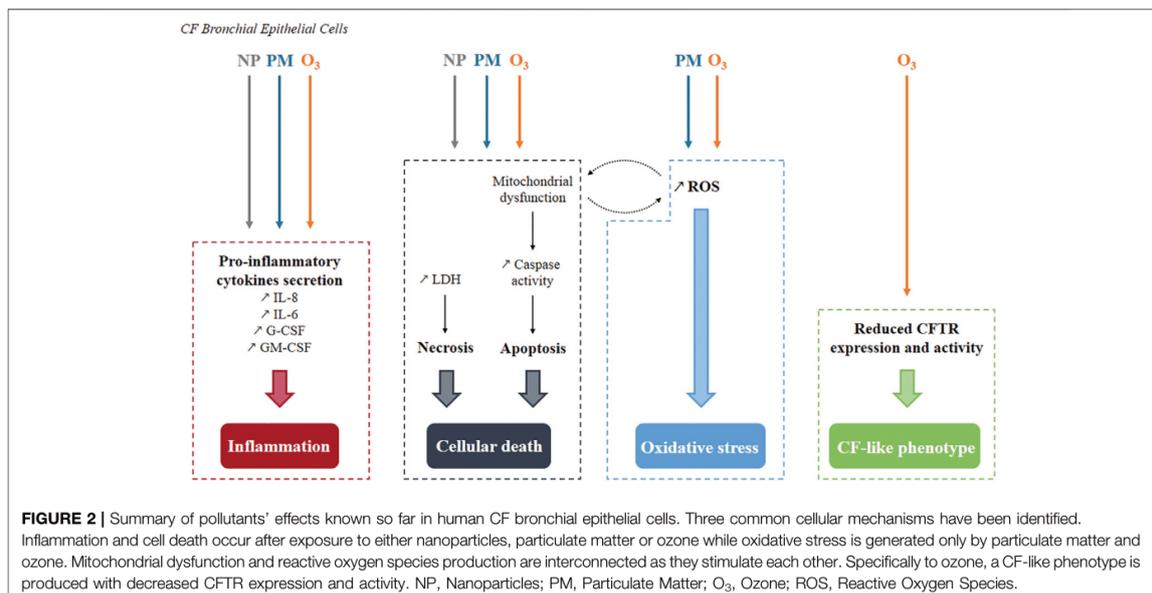
pollution, has been instilled in *Cftr*^{tm1HGU} and WT mice by intratracheal route to evaluate their lung inflammatory response (Geiser et al., 2014). The *Cftr*^{tm1HGU} model is produced by a targeted insertion mutagenesis in exon 10 of the *Cftr* gene (Dorin et al., 1992). It presents a markedly reduced but residual CFTR expression (about 10% of normal mRNA levels) resulting in a mild disease phenotype (Dorin et al., 1994). Of note, this mild airway phenotype is also influenced by genetic background and species differences as compared to humans. CNP instillation provoked, in WT and mutated mice, an acute and transient inflammatory response dominated by neutrophils. This response was maximal the day following exposure. Privileged interaction of NP with airway epithelial cells in mutants due to a reduced clearance of such NP could explain the induction of this inflammatory response. Indeed, Geiser et al. (2014) reported an alteration of titanium dioxide manufactured nanoparticles (TiO₂NP) cellular uptake in *Cftr*^{tm1HGU} mice. In WT mice, the cellular uptake of TiO₂NP is entirely achieved by macrophages while in *Cftr*^{tm1HGU} mice, 26% of TiO₂NP are internalized by alveolar epithelial cells—the remaining 74% NP are internalized by macrophages. This suggests a reduced macrophagic clearance of NP in this CF model. These results corroborate those obtained by the same group on inhaled gold NP uptake and cellular localization in transgenic *Scnn1b* mice: compared to WT mice, *Scnn1b* transgenic mice showed a reduced macrophage uptake of gold NP that were mainly localized at the epithelium surface (Geiser et al., 2013). This is of particular interest because this mouse model—characterized by an airway-targeted overexpression of the ENaC β subunit—constitutes presently the most complete murine model reproducing human CF pulmonary phenotype (Mall et al., 2004; Zhou et al., 2011). Finally, a reduced airway macrophage phagocytosis of carbonaceous PM has also been described in CF children (Liu et al., 2020), adding to the notion of an overall altered clearance of particulate material in CF disease.

An important feature of CF airway pathogenesis is the excessive and inefficient inflammatory process that could be explained by an altered resolution of inflammation (Roesch et al., 2018; Briottet et al., 2020). The finding that resolution of inflammation differs between *Cftr*^{tm1HGU} and WT mice is consistent with this aspect of the clinical description of the CF airway disease. Indeed, at the third day post-instillation, neutrophil count in bronchoalveolar lavages fluid (BALF) is decreased by 70% in WT mice while only by 25% in *Cftr*^{tm1HGU} mice. BALF pro-inflammatory cytokines levels were also higher in *Cftr*^{tm1HGU} mice compared to WT for most cytokines tested. As a striking example, G-CSF concentration was 13 times higher in *Cftr* mutant mice, consistent with the slower decline of BALF neutrophils and suggesting a delayed or impaired resolution of inflammation in *Cftr*-deficient mice. The specialized pro-resolving mediators (SPM) which are bioactive lipids triggering the inflammation resolution phase, are thus of particular interest in this context. Interestingly, the levels of 15-hydroxyecosatetraenoic (15-HETE), a metabolite of the lipoxygenase pathway showing anti-inflammatory properties, was significantly lower in *Cftr*

mutant mice exposed to CNP (Karp et al., 2004; Ringholz et al., 2014), which is in line with the compromised resolution of CNP-induced airway inflammation in *Cftr* mutants (Geiser et al., 2014). Furthermore, the SPM lipoxin A₄ (LXA4) was found to be decreased in C57Bl/6 mice in response to cigarette and wood smoke (Awji et al., 2015). SPM also have a therapeutic potential in reversing or preventing pollution-induced inflammation (Kilburg-Basnyat et al., 2018; Lu et al., 2018; Thatcher et al., 2019). Finally, in the airway of CF patients, the biosynthesis of LXA4 and Resolvin D1 (RvD1) SPM are reduced (Karp et al., 2004; Ringholz et al., 2014; Eickmeier et al., 2017; Briottet et al., 2020; Isopi et al., 2020) and related to the sustained levels of pro-inflammatory cytokines and bacterial infection, the altered airway surface hydration and pulmonary function (Verrière et al., 2012; Eickmeier et al., 2017; Codagnone et al., 2018; Ringholz et al., 2018; Isopi et al., 2020). Taken together, these data highlight a possible particular pulmonary susceptibility of CF patients exposed to particulate air pollution; under these conditions, insufficient inflammation resolution could favor the onset of a chronic inflammatory condition and accelerated progression of the CF airway disease.

In Vitro Studies

In non-CF HBE cells, it has been shown that O₃ decreased CFTR mRNA, protein expression and activity (Qu et al., 2009). This modulation of CFTR expression is dependent of the JAK2/STAT1 pathway which is itself activated by reactive oxygen species (ROS) (Qu et al., 2009). Indeed, ROS inhibitors prevented O₃-induced CFTR expression decrease by reducing STAT1 phosphorylation. As supporting evidence, a direct decrease of CFTR expression and activity due to oxidative stress has been previously described (Bebok et al., 2002; Cantin et al., 2006a). CFTR internalization or retrograde trafficking to the endoplasmic reticulum as induced by cigarette smoke exposure (Clunes et al., 2012; Marklew et al., 2019) could also be considered to explain the reduced CFTR expression and activity induced by O₃. In Calu-3 cells, diesel particulate matter (DPM), which contains oxidants, dose-dependently reduced CFTR expression as well as its binding to the plasma membrane (Shi et al., 2019). Although not directly investigated, the authors suggest that previously described mechanisms involving JAK2/STAT1 in reducing CFTR expression could be similarly involved in these effects. Interestingly, the expression of AQP1 and AQP5 expression was also significantly decreased after DPM exposure, while an increased cAMP intracellular content could be detected, potentially promoting CFTR activity. It must be noted that the inhibiting effects of such exposure on CFTR expression and membrane localization were stronger. In another study in Calu-3 cells, CFTR function was found to be reduced by DPM. However, this acquired CFTR dysfunction could be rescued by CFTR potentiator VX-770 (Nguyen et al., 2021). Interestingly, polystyrene NP activated CFTR ion channel in Calu-3 cells (McCarthy et al., 2011). Although not yet studied in CF cells, the modification of CFTR expression after exposure to air pollutants is thus important to consider because the existing low CFTR expression and altered airway fluid secretion in CF patients could be deepened. In class IV–VI CF patients, with



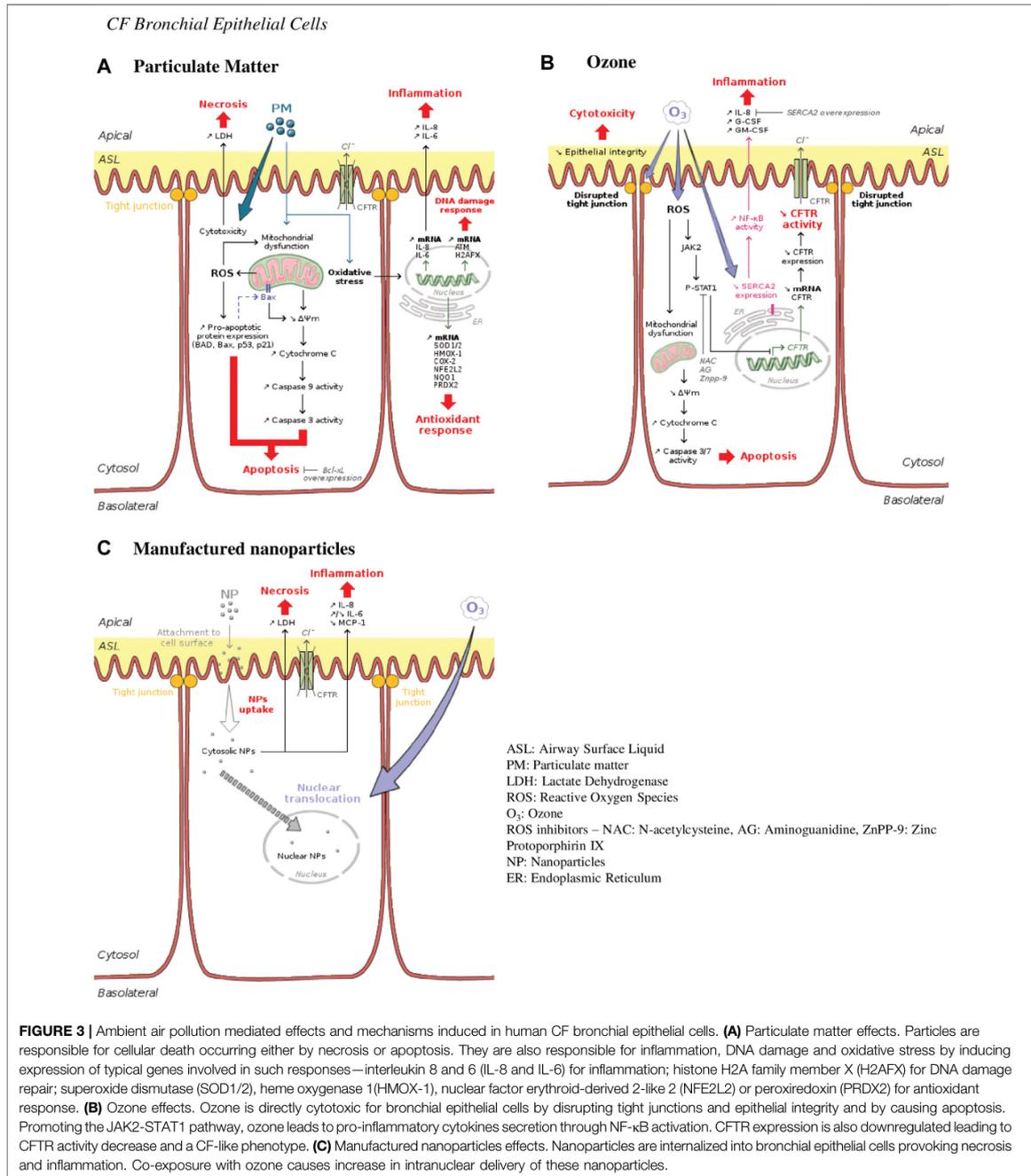
residual CFTR function mutations, this could lead to a potential total suppression of CFTR function which would certainly worsen their pathophysiological state.

Studies published on PM_{2.5}/PM₁₀, O₃, and NP exposure effects on CF cells (Table 3) have highlighted three common cellular mechanisms—cell death, oxidative stress, and inflammation (Figure 2). Such effects are not surprising as they are classically described and known to participate in CF pathophysiology (Rosenfeld et al., 2001; Rottner et al., 2007, 2011; Sagel et al., 2012; Voisin et al., 2014; Ziady and Hansen, 2014; Antus, 2016; Roesch et al., 2018) and induced by air pollution exposure (Dagher et al., 2006; Lee et al., 2018; de Oliveira Alves et al., 2020; Gangwar et al., 2020; Li et al., 2020).

Cell death occurs either by apoptosis or necrosis or even by both processes in the case of exposure to PM_{2.5} (Kamdar et al., 2008; Leni et al., 2020). Exposure of transformed human CF bronchial epithelial cells (CF HBE cells) or wild-type ones (non-CF HBE cells) to PM_{2.5} (Kamdar et al., 2008) or O₃ (Ahmad et al., 2011) induced an increase in DNA fragmentation, propidium iodide staining, caspase 3/7 and 9 activity and an increased expression of pro-apoptotic mediators (Figures 2, 3). Of note, this increase was greater in CF HBE cells suggesting that these cells are more sensitive to PM_{2.5} and O₃ than non-CF ones. While the level of anti-apoptotic proteins remained unchanged with exposure, the overexpression of the anti-apoptotic Bcl-xL contributes to significantly reduce apoptosis in CF HBE cells exposed to PM_{2.5}. Mitochondrial dysfunction seems to be at the origin of such apoptosis (Kamdar et al., 2008; Ahmad et al., 2011). Indeed, a decrease of mitochondria membrane potential, of cytochrome C release and pro-apoptotic Bcl-2 associated X (Bax) translocation to mitochondria were reported upon exposure to PM_{2.5} and O₃. Mitochondria-dependent

generation of reactive oxygen species (ROS) was induced by exposure to PM_{2.5} only (Kamdar et al., 2008). Likewise, baseline production of ROS was higher in CF HBE cells revealing increased oxidative stress in CF cells. By promoting further mitochondrial dysfunction, ROS generation maintains oxidative stress, which could be responsible for the higher baseline apoptosis observed in CF cells. Furthermore, as a marker of cytotoxicity, increase lactate dehydrogenase (LDH) release from damaged cells has been linked to necrosis in CF cells exposed to silver (AgNP) and carbon manufactured NP (Jeannet et al., 2016). Also, a dose-dependent increase in LDH release was observed after exposure of normal and CF HBE cells to PM_{2.5} and PM₁₀ (Leni et al., 2020), aged gasoline exhaust particles (Künzi et al., 2015) or wood combustion particles (Krapf et al., 2017). A loss of transepithelial resistance was showed in CF cells exposed to O₃ suggesting the disruption of tight junctions (Ahmad et al., 2011). However, these NP did not interfere with epithelial integrity as intact apical junctional complexes were reported after such exposure (Ahmad et al., 2012; Jeannet et al., 2016). The observed modification of tight junction properties after O₃ but not NP exposure indicates a more pronounced susceptibility of CF cells to O₃ than to NP. Yet, CF HBE cells sensitivity to NP could be potentiated in presence of O₃. Indeed, after cell surface attachment, NP are mainly internalized in cytosol but this localization was partly switched to nucleus when cells were co-exposed to O₃ thus giving NP a potential to exert further harmful effects (Ahmad et al., 2012).

Oxidative stress response has been shown to be stronger in CF HBE cells primary cultures compared to non-CF HBE cells. Wood combustion particles upregulated the expression of the oxidative stress markers heme oxygenase 1 (HMOX-1) and cyclooxygenase 2 (COX-2) (Krapf et al., 2017). PM_{2.5} and



PM₁₀ also upregulated genes involved in oxidative stress (superoxide dismutase one and 2—SOD1 and 2), antioxidant defense (HMOX-1, nuclear factor erythroid-derived 2-like 2—NFE2L2), oxidative protection (NADP(H) quinone

dehydrogenase—NQO1, peroxiredoxin—PRDX2) as well as genes involved in DNA damage repair (ataxia telangiectasia mutated kinase—ATM, histone H2A family member H2AFX) (Leni et al., 2020). This oxidative/anti-oxidative imbalance could

yield to an inflammation cascade. Indeed, IL-8, G-CSF, and GM-CSF levels were found to be markedly increased following O₃ exposure in CFBE41o- cell line (Ahmad et al., 2011). O₃-mediated inflammation is dependent on the NF-κB signaling pathway modulated by SERCA2 (Sarcoendoplasmic Reticulum Calcium ATPase). SERCA2 is downregulated by O₃ and the specific downregulation of SERCA2 activates NF-κB pathway and the subsequent IL-8 release (Ahmad et al., 2011). The O₃-induced IL-8 secretion was reversed by SERCA2 overexpression. Interestingly, SERCA2 expression is constitutively decreased in CF airway epithelia, which could potentially explain the basal inflammation observed in these cells (Ahmad et al., 2009). Indeed, basal IL-8, G-CSF, and GM-CSF levels were greater in CF airway epithelial cell lines and CF primary cultures than in non-CF cells (Ahmad et al., 2011) as well as IL-6 and MCP-1 levels which are, in CF cells, constitutively largely exceeding those of non-CF cells (Künzi et al., 2015; Jeannet et al., 2016). Such higher pro-inflammatory cytokines levels could also participate in turn to ROS generation. As regard to cytokine secretion, the effects of particle exposure are more controversial. Indeed, in both non-CF and CF HBE cells IL-8 levels increased after exposure to PM (Leni et al., 2020), AgNP and CNP (Jeannet et al., 2016) while polystyrene NP did not induce modification of IL-8 release (Ahmad et al., 2012). IL-6 levels either increased in response to PM, AgNP, and CNP in normal and CF HBE cells but decreased after exposure to aged gasoline particles in CF HBE cells. Upon exposure to PM and NP, MCP-1 levels increased in normal cells while they decreased in CF HBE cells (Künzi et al., 2015; Jeannet et al., 2016; Leni et al., 2020). Wood combustion particles did not significantly alter any cytokine release in any of the cell model considered (Krapf et al., 2017).

KNOWLEDGE GAPS AND FUTURE DIRECTIONS

Unfortunately, there is no epidemiological data on CF prior to the industrial revolution that could bring to light the influence of air pollution composition on CFTR or on the CF airway disease. Indeed, anthropological studies suggests that CFTR mutation arose in the early Bronze Age and that the mutations spread from west to southeast Europe during ancient migrations *via* healthy carriers (CF is an autosomal recessive disease—people with CF inherit one mutated copy of the *CFTR* gene from each parent, referred to as a carrier). However, the first description of the CF disease dates only back to the 1930s (Andersen, 1938). In the 1950s, the median life expectancy for patients with CF was a few months, not allowing any conclusion to be drawn regarding the impact of air pollution. Finally, the causative *CFTR* gene was only discovered 30 years ago (Riordan et al., 1989). There are geographic differences in life expectancy of CF patients which could be related to different air pollution, but these discrepancies are mostly related to the status of developing country or not, where the weight of accessibility to treatments is bigger than that of air pollution. Substantial increased number of adults with CF in developed countries has resulted from delivery of care in well-organized, multidisciplinary CF centers and the use of effective

drugs to treat infection and improve mucociliary clearance (Castellani et al., 2009; McCormick et al., 2010). In contrast, in countries with less well-resourced health-care systems, median life expectancy can be in the second decade of life because of the lack of access to treatment.

Epidemiological studies provide information on the global effect of air pollution on the course of CF disease. However, individual exposure is difficult to follow and only few pollutants are currently explored. Exposure estimation is tricky. Except one study which used spatial interpolation model (Goeminne et al., 2013), all the others estimated individual exposure on average measures obtained by the closest oriented-population monitoring air stations rather than direct monitoring at the patient's residence. As a consequence, possible exposure misclassification could occur. Monitoring stations are mainly found in urban areas. How accurately assess exposure in rural areas? In addition, only few pollutants are monitored, but are they representative of the atmospheric mixture? Actual individual exposure also depends on factors like time spent outdoors, distance from pollution sources and weather patterns. For example, meteorological conditions are of primary importance because of their pivotal link to both CF and pollution: they have effects on CF clinical condition—as shown for temperature (Collaco et al., 2011) and season (Psoter et al., 2013) on *P.aeruginosa* lung infection—and they also influence on pollution chemical composition and evolution. Therefore, the inclusion of meteorological variables should be considered. A correct exposure estimation is also in relation with an accurate determination of possible confounders. In most epidemiological studies reviewed here, adjustment was made on socio-economic status. People of low socio-economic status tend to live in areas with higher ambient air pollution, have lower income and thus limited access to health care which could explain poorer health outcomes. Adjustment on socio-economic status may have reduced residual confounding due to these variables. However, these studies reveal the lack of inclusion of other confounding exposures such as tobacco smoke. Of note, cigarette smoking exposure has been associated with worse clinical prognosis in CF—decreased growth and weight (Rubin, 1990; Kovesi et al., 1993; Kopp et al., 2015), smaller lung function (Kovesi et al., 1993; Smyth et al., 1994; Collaco et al., 2008), increased colonization by MRSA (Kopp et al., 2015), longer periods of intravenous antibiotic treatment (Gilljam et al., 1990), airway surface dehydration (Clunes et al., 2012) and CFTR dysfunction (Cantin et al., 2006b; Raju et al., 2013; Marklew et al., 2019; Rasmussen et al., 2020). In a very recent study, tobacco smoke has also been shown to limit the therapeutic benefit of tezacaftor/ivacaftor therapy in pediatric CF patients (Baker et al., 2021). Similar limiting effects of air pollution on such treatments could be considered in CF patients. On the opposite, the effects of cigarette smoke exposure were reversed with the use of the CFTR potentiator ivacaftor (VX-770) in non-CF HBE cells (Sloane et al., 2012; Raju et al., 2017). One could thus also hypothesize the potential prevention of air pollution effects by CFTR modulators as shown with DPM-induced CFTR dysfunction rescue by VX-770 (Nguyen et al., 2021). Tobacco smoke and air pollution co-exposure must be considered in the context of worsening exacerbations and lung function. The important point here is

that air pollution is part of a wider concept called exposome. Exposome corresponds to the sum of all environmental exposures an organism experiences throughout his/her life, from conception to death (Wild, 2012). This concept emphasizes that it is impossible to know to what extent air pollution exposure only influences CF phenotype as one individual is never exposed to air pollution alone. Environmental exposures more likely interact with each other and have cumulative effects. That is why, to be as realistic and accurate as possible, air pollution should be considered as part of a complete and complex exposome to reduce potential residual confounding. In addition to the complexity of this external exposome—all the external exposures—comes the complexity of an internal exposome—all the biological responses to exposures—that takes its origin, in the context of CF, in the great diversity of CF mutations and their respective consequences on the pleiotropic functions of CFTR itself. Keeping in mind this notion of exposome is of the utmost importance in developing new experimental concepts and lessen the misinterpretation of data. This is true for epidemiological studies as well as for experimental ones. Indeed, studying environmental exposures on animals maintained in strictly controlled conditions—i.e., same exposome—can only provide approximative indications on the potential biological responses in human populations who are genetically heterogenous, live in different environments, have different occupations, etc. and thus have complex and divergent internal and external exposomes (Bolon and Haschek, 2020).

Experimental studies use animal and cellular models. CF animal models are numerous and different based on the nature of the mutation in the *Cftr* locus (Wilke et al., 2011). In mice, most of the knock-out models present a severe mortality due to intestinal obstruction which limits the possibility to study the disease at adult age. F508del mutation models have a good survival until maturity and have the advantage to reproduce the most common mutation found in patients. However, they mainly reproduce the intestinal aspect of the disease with no basal specific lung phenotype. On the opposite, the *Scnn1b* transgenic model presents a CF-like lung disease but has no intestinal defect. In addition, this model is not mutated in the *Cftr* gene thus diverting the origin of CF disease and limiting other possible effects resulting from *Cftr* mutations. Apart from mice, other CF animal models developing a “spontaneous” lung disease have emerged such as pigs, ferrets or rats (Semaniakou et al., 2019). As for CF animal models, there is a wide range of existing CF epithelial cell models (Castellani et al., 2018). The airway epithelium is characterized by a wide diversity of cell types: basal cells, ciliated cells, goblet cells, club cells, ionocytes and more (Montoro et al., 2018). These different cell types could have different susceptibility to air pollution. In the specific context of CF, ionocytes—cells with a high level of CFTR expression (Plasschaert et al., 2018; Scudieri et al., 2020)—could be particularly interesting to examine. Yet, this cellular complexity of the respiratory epithelium is not always considered. Indeed, transformed or immortalized cell lines constitute a simplistic single barely differentiated cell type model. On the other hand, fully differentiated primary HBE cells cultured at air-liquid interface, despite subjected to donors’ variability, more closely mimic the *in vivo* lung environment and therefore relevant

exposure conditions. These differences in model construction could explain why responses might be very different from one study to another.

Beside the limits of the different animal and cellular models of CF exposed above, another major limitation of the experimental studies reviewed here resides in pollutants consideration. Several challenges remain to be tackled. As mentioned earlier, air pollution consists of a complex reactive mixture evolving in space and time. Yet only few pollutants—used as indicators and representing a tiny part of the atmospheric mixture (O_3 , NO_2 , SO_2 , $PM_{2.5}$, and PM_{10})—are currently monitored. As an example, ultrafine particles ($PM_{0.1}$) are not measured directly nor subjected to guideline values while causing deleterious health effects (MacNee and Donaldson, 2003; Schraufnagel, 2020). Moreover, many toxicological studies have been based on the study of individual pollutants. As a primary approach, studying individual pollutants is interesting for mechanistic insight and to give a first glimpse of their respective toxicity. However, it is limited when numerous pollutants interact together. One isolated pollutant will not necessarily have the same effects alone or in combination with others. The relevance of existing experimental studies can therefore be largely challenged based on the absence of consideration of such synergism and reactivity between pollutants making it thus difficult to extrapolate results to “real life.” In this context of considering pollutants’ dynamic, few studies exist on pulmonary effects of secondary or aged aerosols (Delfino et al., 2010; Gaschen et al., 2010; Rager et al., 2011; Diaz et al., 2012; Künzi et al., 2013; Künzi et al., 2015; Krapf et al., 2017). Ahmad et al. are to our knowledge the only ones to have combined NP and O_3 exposition, a first step toward consideration of multi-pollutant interactions (Ahmad et al., 2012). A disruptive approach consists to reproduce multiphasic chemical processes in the laboratory—i.e., continuously produce environments representative of urban atmospheres—in order to study the impact of air pollution in particular in the multi-pollutant synergy and multiphasic dimensions (Coll et al., 2018). For example, the authors have developed a platform, named PolluRisk, which allows to reproduce for days the atmospheric phases (gases and aerosols) similar to those of cities like Paris or Beijing for example. It is resulting from the coupling of an atmospheric simulation chamber with exposure devices able to host preclinical models. The experimental protocol consists in the continuous injection of primary pollutants (NO_x , organic compounds mix simulating anthropogenic emissions, SO_2 , soot, inorganic salts and potentially mineral dust particles if needed) at low concentrations (ppb levels in air) in the chamber. Due to the residence time in the atmospheric simulation chamber—around 4 h to represent air masses at a regional scale—the mixture is exposed to an artificial solar irradiation, allowing secondary pollutants such as O_3 , NO_2 , formaldehyde, and peroxyacetyl nitrate (PANs) as well as complex polyfunctional organics including Secondary Organic Aerosol (SOA) to be formed. This way, they can reach their chemical steady state. Exposure devices are then “fed” with a constant flow of such a mixture. A challenge of such chambers is to reach realistic pollutants doses, a key point as *in vivo* and *in vitro* studies usually expose animal models and cells to non-realistic elevated pollutants concentrations. For example, in the

studies reviewed here (Tables 2, 3), an O₃ exposure from 100 ppb to 1.5 ppm corresponds to 195–3 000 µg/m³, levels far from the WHO guidelines values—100 µg/m³ 8-h daily maximum and 60 µg/m³ 8-h mean (World Health Organization, 2021)—and not reached in real life. For particulate exposure, doses are usually more realistic but mostly match a high-exposure scenario.

CONCLUSION

A complex relationship exists between gene and environment into determining human disease phenotypes. If CF is definitely caused by a genetic defect, environmental aggressions most probably participate to the progression of CF airway disease. Epidemiological studies provide some data for a possible contribution of air pollution to CF airway severity and morbidity. In addition and although scarce, the existing experimental literature supports this possible contribution of air pollution to CF airway disease and gives an insight for possible mechanisms involved. However, it also underlies limitations, both conceptual—missing the complexity of

exposome considerations—and experimental—linked to the use/evaluation of one pollutant at a time. For sure these questions need to be addressed in future research.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conceptualization, MB and SL; methodology, MB; formal analysis, MB and VU; writing—original draft preparation, MB, PC, and SL; writing—review and editing, MB, VU, PC, PF, RE, and SL. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

We want to thank the DIM Qi² with the support of the Ile-de-France Region for funding MB. We also thank EU project #874753 REMEDIA which currently support the authors' activity on the effects of exposome on the course of Cystic Fibrosis.

REFERENCES

- Ahmad, S., Ahmad, A., Dremina, E. S., Sharov, V. S., Guo, X., Jones, T. N., et al. (2009). Bcl-2 Suppresses Sarcoplasmic/Endoplasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase Expression in Cystic Fibrosis Airways. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 179, 816–826. doi:10.1164/rccm.200807-1104OC
- Ahmad, S., Nichols, D. P., Strand, M., Rancourt, R. C., Randell, S. H., White, C. W., et al. (2011). SERCA2 Regulates Non-CF and CF Airway Epithelial Cell Response to Ozone. *PLOS ONE* 6, e27451. doi:10.1371/journal.pone.0027451
- Ahmad, S., Raemy, D. O., Loader, J. E., Kailey, J. M., Neeves, K. B., White, C. W., et al. (2012). Interaction and Localization of Synthetic Nanoparticles in Healthy and Cystic Fibrosis Airway Epithelial Cells: Effect of Ozone Exposure. *J. Aerosol Med. Pulm. Drug Deliv.* 25, 7–15. doi:10.1089/jamp.2011.0889
- Andersen, D. H. (1938). Cystic Fibrosis of the Pancreas and its Relation to Celiac Disease. *Am. J. Dis. Child.* 56, 344–399. doi:10.1001/archpedi.1938.01980140114013
- Antus, B. (2016). Oxidative Stress Markers in Sputum. *Oxid. Med. Cell Longev.* 2016, 2930434. doi:10.1155/2016/2930434
- Awji, E. G., Chand, H., Bruse, S., Smith, K. R., Colby, J. K., Mebratu, Y., et al. (2015). Wood Smoke Enhances Cigarette Smoke-Induced Inflammation by Inducing the Aryl Hydrocarbon Receptor Repressor in Airway Epithelial Cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 52, 377–386. doi:10.1165/rcmb.2014-0142OC
- Baker, E., Harris, W. T., Rowe, S. M., Rutland, S. B., and Oates, G. R. (2021). Tobacco Smoke Exposure Limits the Therapeutic Benefit of Tezacaftor/ivacaftor in Pediatric Patients with Cystic Fibrosis. *J. Cyst. Fibros.* 20, 612–617. doi:10.1016/j.jcf.2020.09.011
- Bayram, H., Devalia, J. L., Sapsford, R. J., Ohtoshi, T., Miyabara, Y., Sagai, M., et al. (1998). The Effect of Diesel Exhaust Particles on Cell Function and Release of Inflammatory Mediators from Human Bronchial Epithelial Cells In Vitro. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 18, 441–448. doi:10.1165/ajrcmb.18.3.2882
- Bebok, Z., Varga, K., Hicks, J. K., Venglarik, C. J., Kovacs, T., Chen, L., et al. (2002). Reactive Oxygen Nitrogen Species Decrease Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Expression and cAMP-Mediated Cl⁻ Secretion in Airway Epithelia. *J. Biol. Chem.* 277, 43041–43049. doi:10.1074/jbc.M203154200
- Bolon, B., and Haschek, W. M. (2020). The Exposome in Toxicologic Pathology. *Toxicol. Pathol.* 48, 718–720. doi:10.1177/0192623320912403
- Boucher, R. C. (2007). Airway Surface Dehydration in Cystic Fibrosis: Pathogenesis and Therapy. *Annu. Rev. Med.* 58, 157–170. doi:10.1146/annurev.med.58.071905.105316
- Briottet, M., Shum, M., and Urbach, V. (2020). The Role of Specialized Pro-resolving Mediators in Cystic Fibrosis Airways Disease. *Front. Pharmacol.* 11, 1290. doi:10.3389/fphar.2020.01290
- Brugha, R., Edmondson, C., and Davies, J. C. (2018). Outdoor Air Pollution and Cystic Fibrosis. *Paediatr. Respir. Rev.* 28, 80–86. doi:10.1016/j.prrv.2018.03.005
- Burke, W., Aitken, M. L., Chen, S.-H., and Scott, C. R. (1992). Variable Severity of Pulmonary Disease in Adults with Identical Cystic Fibrosis Mutations. *Chest* 102, 506–509. doi:10.1378/chest.102.2.506
- Campbell, P. W., Parker, R. A., Roberts, B. T., Krishnamani, M. R. S., and Phillips, J. A. (1992). Association of Poor Clinical Status and Heavy Exposure to Tobacco Smoke in Patients with Cystic Fibrosis Who Are Homozygous for the F508 Deletion. *J. Pediatr.* 120, 261–264. doi:10.1016/s0022-3476(05)80438-x
- Cantin, A. M., Bilodeau, G., Ouellet, C., Liao, J., and Hanrahan, J. W. (2006a). Oxidant Stress Suppresses CFTR Expression. *Am. J. Physiology-Cell Physiology* 290, C262–C270. doi:10.1152/ajpcell.00070.2005
- Cantin, A. M., Hanrahan, J. W., Bilodeau, G., Ellis, L., Dupuis, A., Liao, J., et al. (2006b). Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Function Is Suppressed in Cigarette Smokers. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 173, 1139–1144. doi:10.1164/rccm.200508-1330OC
- Castellani, C., Southern, K. W., Brownlee, K., Dankert Roelse, J., Duff, A., Farrell, M., et al. (2009). European Best Practice Guidelines for Cystic Fibrosis Neonatal Screening. *J. Cyst. Fibros.* 8, 153–173. doi:10.1016/j.jcf.2009.01.004
- Castellani, S., Di Gioia, S., di Toma, L., and Conese, M. (2018). Human Cellular Models for the Investigation of Lung Inflammation and Mucus Production in Cystic Fibrosis. *Anal. Cell. Pathol.* 2018, 1–15. doi:10.1155/2018/3839803
- Cho, H., Hotchkiss, J. A., and Harkema, J. R. (1999). Inflammatory and Epithelial Responses during the Development of Ozone-Induced Mucous Cell Metaplasia in the Nasal Epithelium of Rats. *Toxicol. Sci.* 51, 135–145. doi:10.1093/toxsci/51.1.135
- Clunes, L. A., Davies, C. M., Coakley, R. D., Aleksandrov, A. A., Henderson, A. G., Zeman, K. L., et al. (2012). Cigarette Smoke Exposure Induces CFTR Internalization and Insolubility, Leading to Airway Surface Liquid Dehydration. *FASEB J.* 26, 533–545. doi:10.1096/fj.11-192377
- Codagnone, M., Cianci, E., Lamolinara, A., Mari, V. C., Nespoli, A., Isopi, E., et al. (2018). Resolvin D1 Enhances the Resolution of Lung Inflammation Caused by Long-Term *Pseudomonas aeruginosa* Infection. *Mucosal Immunol.* 11, 35–49. doi:10.1038/mi.2017.36

- Coll, P., Cazaunau, M., Boczkowski, J., Zysman, M., Doussin, J.-F., Gratién, A., et al. (2018). Pollurisk: an Innovative Experimental Platform to Investigate Health Impacts of Air Quality. *WIT Trans. Ecol. Environ.* 230, 557–565. doi:10.2495/AIR180521
- Collaco, J. M., Blackman, S. M., McGready, J., Naughton, K. M., and Cutting, G. R. (2010). Quantification of the Relative Contribution of Environmental and Genetic Factors to Variation in Cystic Fibrosis Lung Function. *J. Pediatr.* 157, 802–807. e3. doi:10.1016/j.jpeds.2010.05.018
- Collaco, J. M., McGready, J., Green, D. M., Naughton, K. M., Watson, C. P., Shields, T., et al. (2011). Effect of Temperature on Cystic Fibrosis Lung Disease and Infections: A Replicated Cohort Study. *PLOS ONE* 6, e27784. doi:10.1371/journal.pone.0027784
- Collaco, J. M., Vanscoy, L., Bremer, L., McDougal, K., Blackman, S. M., Bowers, A., et al. (2008). Interactions between Secondhand Smoke and Genes that Affect Cystic Fibrosis Lung Disease. *JAMA* 299, 417–424. doi:10.1001/jama.299.4.417
- Corvol, H., Blackman, S. M., Boëlle, P.-Y., Gallins, P. J., Pace, R. G., Stonebraker, J. R., et al. (2015). Genome-wide Association Meta-Analysis Identifies Five Modifier Loci of Lung Disease Severity in Cystic Fibrosis. *Nat. Commun.* 6, 8382. doi:10.1038/ncomms9382
- Cutting, G. R. (2015). Cystic Fibrosis Genetics: from Molecular Understanding to Clinical Application. *Nat. Rev. Genet.* 16, 45–56. doi:10.1038/nrg3849
- Dadvand, P., Parker, J., Bell, M. L., Bonzini, M., Brauer, M., Darrow, L. A., et al. (2013). Maternal Exposure to Particulate Air Pollution and Term Birth Weight: A Multi-Country Evaluation of Effect and Heterogeneity. *Environ. Health Perspect.* 121, 267–373. doi:10.1289/ehp.1205575
- Dagher, Z., Garçon, G., Billet, S., Gosset, P., Ledoux, F., Courcot, D., et al. (2006). Activation of Different Pathways of Apoptosis by Air Pollution Particulate Matter (PM_{2.5}) in Human Epithelial Lung Cells (L132) in Culture. *Toxicology* 225, 12–24. doi:10.1016/j.tox.2006.04.038
- De Boeck, K., Zolin, A., Cuppens, H., Olesen, H. V., and Viviani, L. (2014). The Relative Frequency of CFTR Mutation Classes in European Patients with Cystic Fibrosis. *J. Cyst. Fibros.* 13, 403–409. doi:10.1016/j.jcf.2013.12.003
- de Boer, K., Vandemheen, K. L., Tullis, E., Doucette, S., Fergusson, D., Freitag, A., et al. (2011). Exacerbation Frequency and Clinical Outcomes in Adult Patients with Cystic Fibrosis. *Thorax* 66, 680–685. doi:10.1136/thx.2011.161117
- de Oliveira Alves, N., Martins Pereira, G., Di Domenico, M., Costanzo, G., Benevenuto, S., de Oliveira Fonoff, A. M., et al. (2020). Inflammation Response, Oxidative Stress and DNA Damage Caused by Urban Air Pollution Exposure Increase in the Lack of DNA Repair XPC Protein. *Environ. Int.* 145, 106150. doi:10.1016/j.envint.2020.106150
- Delfino, R. J., Staimer, N., Tjoa, T., Arhami, M., Polidori, A., Gillen, D. L., et al. (2010). Associations of Primary and Secondary Organic Aerosols with Airway and Systemic Inflammation in an Elderly Panel Cohort. *Epidemiology* 21, 892–902. doi:10.1097/EDE.0b013e3181f20e6c
- Diaz, E. A., Chung, Y., Papapostolou, V., Lawrence, J., Long, M. S., Hatakeyama, V., et al. (2012). Effects of Fresh and Aged Vehicular Exhaust Emissions on Breathing Pattern and Cellular Responses - Pilot Single Vehicle Study. *Inhal. Toxicol.* 24, 288–295. doi:10.3109/08958378.2012.668572
- Dorin, J. R., Dickinson, P., Alton, E. W. F. W., Smith, S. N., Geddes, D. M., Stevenson, B. J., et al. (1992). Cystic Fibrosis in the Mouse by Targeted Insertional Mutagenesis. *Nature* 359, 211–215. doi:10.1038/359211a0
- Dorin, J. R., Stevenson, B. J., Fleming, S., Alton, E. W. F. W., Dickinson, P., and Porteous, D. J. (1994). Long-term Survival of the Exon 10 Insertional Cystic Fibrosis Mutant Mouse Is a Consequence of Low Level Residual Wild-type Cfr Gene Expression. *Mamm. Genome* 5, 465–472. doi:10.1007/bf00369314
- Duguépéroux, I., and De Braekeleer, M. (2004). De Braekeleer, M., and Participating Centres to the French National Cystic Fibrosis Registry Genotype-Phenotype Relationship for Five CFTR Mutations Frequently Identified in Western France. *J. Cyst. Fibros.* 3, 259–263. doi:10.1016/j.jcf.2004.07.004
- Eickmeier, O., Fussbroich, D., Mueller, K., Serve, F., Smaczny, C., Zielen, S., et al. (2017). Pro-resolving Lipid Mediator Resolvin D1 Serves as a Marker of Lung Disease in Cystic Fibrosis. *PLoS One* 12, e0171249. doi:10.1371/journal.pone.0171249
- Elborn, J. S. (2016). Cystic Fibrosis. *Lancet* 388, 2519–2531. doi:10.1016/S0140-6736(16)00576-6
- Farhat, S. C. L., Almeida, M. B., Silva-Filho, L. V. R. F., Farhat, J., Rodrigues, J. C., and Braga, A. L. F. (2013). Ozone Is Associated with an Increased Risk of Respiratory Exacerbations in Patients with Cystic Fibrosis. *Chest* 144, 1186–1192. doi:10.1378/chest.12-2414
- Ferkol, T., Rosenfeld, M., and Milla, C. E. (2006). Cystic Fibrosis Pulmonary Exacerbations. *J. Pediatr.* 148, 259–264. doi:10.1016/j.jpeds.2005.10.019
- Fleischer, N. L., Meriardi, M., van Donkelaar, A., Vadillo-Ortega, F., Martin, R. V., Betran, A. P., et al. (2014). Betran Ana Pilar, et al Outdoor Air Pollution, Preterm Birth, and Low Birth Weight: Analysis of the World Health Organization Global Survey on Maternal and Perinatal Health. *Environ. Health Perspect.* 122, 425–430. doi:10.1289/ehp.1306837
- Gangwar, R. S., Bevan, G. H., Palanivel, R., Das, L., and Rajagopalan, S. (2020). Oxidative Stress Pathways of Air Pollution Mediated Toxicity: Recent Insights. *Redox Biol.* 34, 101545. doi:10.1016/j.redox.2020.101545
- Gaschen, A., Lang, D., Kalberer, M., Savi, M., Geiser, T., Gazdhar, A., et al. (2010). Cellular Responses after Exposure of Lung Cell Cultures to Secondary Organic Aerosol Particles. *Environ. Sci. Technol.* 44, 1424–1430. doi:10.1021/es902261m
- Gauderman, W. J., Vora, H., McConnell, R., Berhane, K., Gilliland, F., Thomas, D., et al. (2007). Effect of Exposure to Traffic on Lung Development from 10 to 18 Years of Age: a Cohort Study. *Lancet* 369, 571–577. doi:10.1016/S0140-6736(07)60037-3
- Geiser, M., Quail, O., Wenk, A., Wigge, C., Eigeldinger-Berthou, S., Hirn, S., et al. (2013). Cellular Uptake and Localization of Inhaled Gold Nanoparticles in Lungs of Mice with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Part. Fibre Toxicol.* 10, 19. doi:10.1186/1743-8977-10-19
- Geiser, M., Stoeger, T., Casaulta, M., Chen, S., Semmler-Behnke, M., Bolle, I., et al. (2014). Biokinetics of Nanoparticles and Susceptibility to Particulate Exposure in a Murine Model of Cystic Fibrosis. *Part. Fibre Toxicol.* 11, 19. doi:10.1186/1743-8977-11-19
- Gilljam, H., Stenlund, C., Ericsson-Hollings, A., and Strandvik, B. (1990). Passive Smoking in Cystic Fibrosis. *Respir. Med.* 84, 289–291. doi:10.1016/s0954-6111(08)80055-8
- Goeminne, P. C., Kiciński, M., Vermeulen, F., Fierens, F., De Boeck, K., Nemery, B., et al. (2013). Impact of Air Pollution on Cystic Fibrosis Pulmonary Exacerbations. *Chest* 143, 946–954. doi:10.1378/chest.12-1005
- Goldizen, F. C., Sly, P. D., and Knibbs, L. D. (2016). Respiratory Effects of Air Pollution on Children. *Pediatr. Pulmonol.* 51, 94–108. doi:10.1002/ppul.23262
- Goss, C. H., Newsom, S. A., Schildcrout, J. S., Sheppard, L., and Kaufman, J. D. (2004). Effect of Ambient Air Pollution on Pulmonary Exacerbations and Lung Function in Cystic Fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 169, 816–821. doi:10.1164/rccm.200306-779OC
- Harkema, J. R., Hotchkiss, J. A., Barr, E. B., Bennett, C. B., Gallup, M., Lee, J. K., et al. (1999). Long-Lasting Effects of Chronic Ozone Exposure on Rat Nasal Epithelium. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 20, 517–529. doi:10.1165/ajrcmb.20.3.3227
- Health Effects Institute (2020). *State of Global Air*. Boston.
- Hoek, G., Krishnan, R. M., Beelen, R., Peters, A., Ostro, B., Brunekreef, B., et al. (2013). Long-term Air Pollution Exposure and Cardio-Respiratory Mortality: a Review. *Environ. Health* 12, 43. doi:10.1186/1476-069X-12-43
- Holton, J. R., Haynes, P. H., McIntyre, M. E., Douglass, A. R., Rood, R. B., and Pfister, L. (1995). Stratosphere-troposphere Exchange. *Rev. Geophys.* 33, 403–439. doi:10.1029/95rg02097
- Huang, L., Pu, J., He, F., Liao, B., Hao, B., Hong, W., et al. (2017). Positive Feedback of the Amphiregulin-EGFR-ERK Pathway Mediates PM_{2.5} from Wood Smoke-Induced MUC5AC Expression in Epithelial Cells. *Sci. Rep.* 7, 11084. doi:10.1038/s41598-017-11541-1
- Hwang, B.-F., Chen, Y.-H., Lin, Y.-T., Wu, X.-T., and Leo Lee, Y. (2015). Relationship between Exposure to Fine Particulates and Ozone and Reduced Lung Function in Children. *Environ. Res.* 137, 382–390. doi:10.1016/j.envres.2015.01.009
- International Agency for Research on Cancer (2013). *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*. 109. Outdoor air pollution.
- Isopi, E., Mattoscio, D., Codagnone, M., Mari, V. C., Lamolinara, A., Patruno, S., et al. (2020). Resolvin D1 Reduces Lung Infection and Inflammation Activating Resolution in Cystic Fibrosis. *Front. Immunol.* 11, 581. doi:10.3389/fimmu.2020.00581

- Jany, B., and Basbaum, C. B. (1991). Modification of Mucin Gene Expression in Airway Disease. *Am. Rev. Respir. Dis.* 144, 538–541. doi:10.1164/ajrccm/144.3_pt_2.S38
- Jassal, M. S., Yu, A. M., Bhatia, R., Keens, T. G., and Davidson Ward, S. L. (2013). Effect of Residential Proximity to Major Roadways on Cystic Fibrosis Exacerbations. *Int. J. Environ. Health Res.* 23, 119–131. doi:10.1080/09603123.2012.708917
- Jeannot, N., Fierz, M., Schneider, S., Künzi, L., Baumlin, N., Salathe, M., et al. (2016). Acute Toxicity of Silver and Carbon Nanoaerosols to Normal and Cystic Fibrosis Human Bronchial Epithelial Cells. *Nanotoxicology* 10, 279–291. doi:10.3109/17435390.2015.1049233
- Kamdar, O., Le, W., Zhang, J., Ghio, A. J., Rosen, G. D., and Upadhyay, D. (2008). Air Pollution Induces Enhanced Mitochondrial Oxidative Stress in Cystic Fibrosis Airway Epithelium. *FEBS Lett.* 582, 3601–3606. doi:10.1016/j.febslet.2008.09.030
- Karp, C. L., Flick, L. M., Park, K. W., Softic, S., Greer, T. M., Keledjian, R., et al. (2004). Defective Lipoxin-Mediated Anti-inflammatory Activity in the Cystic Fibrosis Airway. *Nat. Immunol.* 5, 388–392. doi:10.1038/ni1056
- Kerem, E., and Kerem, B. (1996). Genotype-phenotype Correlations in Cystic Fibrosis. *Pediatr. Pulmonol.* 22, 387–395. doi:10.1002/(sici)1099-0496(199612)22:6<387::aid-ppul7>3.0.co;2-g
- Kilburg-Basnyat, B., Reece, S. W., Crouch, M. J., Luo, B., Boone, A. D., Yaeger, M., et al. (2018). Specialized Pro-resolving Lipid Mediators Regulate Ozone-Induced Pulmonary and Systemic Inflammation. *Toxicol. Sci.* 163, 466–477. doi:10.1093/toxsci/kfy040
- Kopp, B., Ortega-García, J., Sadreameli, S., Wellmerling, J., Cornet-Boyaka, E., Thompson, R., et al. (2016). The Impact of Secondhand Smoke Exposure on Children with Cystic Fibrosis: A Review. *Ijperh* 13, 1003. doi:10.3390/ijperh13101003
- Kopp, B. T., Sarzynski, L., Khalifoun, S., Hayes, D., Thompson, R., Nicholson, L., et al. (2015). Detrimental Effects of Secondhand Smoke Exposure on Infants with Cystic Fibrosis. *Pediatr. Pulmonol.* 50, 25–34. doi:10.1002/ppul.23016
- Kovesi, T., Corey, M., and Levison, H. (1993). Passive Smoking and Lung Function in Cystic Fibrosis. *Am. Rev. Respir. Dis.* 148, 1266–1271. doi:10.1164/ajrccm/148.5.1266
- Kracht, O., Santiago, J., Martin, F., Piersanti, A., Cremona, G., Righini, G., et al. (2018). *Spatial Representativeness of Air Quality Monitoring Sites: Outcomes of the FAIRMODE/AQUILA Intercomparison Exercise*. Luxembourg: EUR 28987 EN, Publications Office of the European Union. doi:10.2760/60611
- Krapf, M., Künzi, L., Allenbach, S., Bruns, E. A., Gavarini, I., El-Haddad, I., et al. (2017). Wood Combustion Particles Induce Adverse Effects to Normal and Diseased Airway Epithelia. *Environ. Sci. Process. Impacts* 19, 538–548. doi:10.1039/C6EM00586A
- Künzi, L., Krapf, M., Daher, N., Dommen, J., Jeannot, N., Schneider, S., et al. (2015). Toxicity of Aged Gasoline Exhaust Particles to Normal and Diseased Airway Epithelia. *Sci. Rep.* 5, 1–10. doi:10.1038/srep11801
- Künzi, L., Mertes, P., Schneider, S., Jeannot, N., Menzi, C., Dommen, J., et al. (2013). Responses of Lung Cells to Realistic Exposure of Primary and Aged Carbonaceous Aerosols. *Atmos. Environ.* 68, 143–150. doi:10.1016/j.atmosenv.2012.11.055
- Lao, O., Andrés, A. M., Mateu, E., Bertranpetit, J., and Calafell, F. (2003). Spatial Patterns of Cystic Fibrosis Mutation Spectra in European Populations. *Eur. J. Hum. Genet.* 11, 385–394. doi:10.1038/sj.ejhg.5200970
- Lee, H., Myung, W., Jeong, B.-H., Choi, H., Jhun, B. W., and Kim, H. (2018). Short- and Long-Term Exposure to Ambient Air Pollution and Circulating Biomarkers of Inflammation in Non-smokers: A Hospital-Based Cohort Study in South Korea. *Environ. Int.* 119, 264–273. doi:10.1016/j.envint.2018.06.041
- Lelieveld, J., Pozzer, A., Pöschl, U., Fnais, M., Haines, A., and Münzel, T. (2020). Loss of Life Expectancy from Air Pollution Compared to Other Risk Factors: a Worldwide Perspective. *Cardiovasc. Res.* 116, 1910–1917. doi:10.1093/cvr/cvaa025
- Leni, Z., Cassagnes, L. E., Daellenbach, K. R., El Haddad, I., Vlachou, A., Uzu, G., et al. (2020). Oxidative Stress-Induced Inflammation in Susceptible Airways by Anthropogenic Aerosol. *PLoS ONE* 15, e0233425. doi:10.1371/journal.pone.0233425
- Li, Z., Liu, Q., Xu, Z., Guo, X., and Wu, S. (2020). Association between Short-Term Exposure to Ambient Particulate Air Pollution and Biomarkers of Oxidative Stress: A Meta-Analysis. *Environ. Res.* 191, 110105. doi:10.1016/j.envres.2020.110105
- Liu, N. M., Miyashita, L., Sanak, M., Barratt, B., and Grigg, J. (2021). Prostaglandin E2 and Phagocytosis of Inhaled Particulate Matter by Airway Macrophages in Cystic Fibrosis. *J. Cyst. Fibros.* 20 (4), 673–677. doi:10.1016/j.jcf.2020.11.010
- Lu, X., Fu, H., Han, F., Fang, Y., Xu, J., Zhang, L., et al. (2018). Lipoxin A4 Regulates PM2.5-induced Severe Allergic Asthma in Mice via the Th1/Th2 Balance of Group 2 Innate Lymphoid Cells. *J. Thorac. Dis.* 10, 1449–1459. doi:10.21037/jtd.2018.03.02
- MacNee, W., and Donaldson, K. (2003). Mechanism of Lung Injury Caused by PM10 and Ultrafine Particles with Special Reference to COPD. *Eur. Respir. J.* 21, 478–518. doi:10.1183/09031936.03.00403203
- Mall, M., Grubb, B. R., Harkema, J. R., O'Neal, W. K., and Boucher, R. C. (2004). Increased Airway Epithelial Na+ Absorption Produces Cystic Fibrosis-like Lung Disease in Mice. *Nat. Med.* 10, 487–493. doi:10.1038/nm1028
- Marklew, A. J., Patel, W., Moore, P. J., Tan, C. D., Smith, A. J., Sassano, M. F., et al. (2019). Cigarette Smoke Exposure Induces Retrograde Trafficking of CFTR to the Endoplasmic Reticulum. *Sci. Rep.* 9, 13655. doi:10.1038/s41598-019-49544-9
- McCarthy, J., Gong, X., Nahirney, D., Duszyk, M., and Radomski, M. (2011). Polystyrene Nanoparticles Activate Ion Transport in Human Airway Epithelial Cells. *Ijn* 6, 1343–1356. doi:10.2147/IJN.S21145
- McCormick, J., Mehta, G., Olesen, H. V., Viviani, L., Macek, M., Mehta, A., et al. (2010). Comparative Demographics of the European Cystic Fibrosis Population: a Cross-Sectional Database Analysis. *Lancet* 375, 1007–1013. doi:10.1016/S0140-6736(09)62161-9
- Milanzi, E. B., Koppelman, G. H., Smit, H. A., Wijga, A. H., Oldenwening, M., Vonk, J. M., et al. (2018). Air Pollution Exposure and Lung Function until Age 16 years: the PIAMA Birth Cohort Study. *Eur. Respir. J.* 52, 1800218. doi:10.1183/13993003.00218-2018
- Mirtajani, S. B., Farnia, P., Hassanzad, M., and Ghanavi, J. (2017). Geographical Distribution of Cystic Fibrosis. *past 70 years data Anal.* 1, 105–112. doi:10.4103/bbrj.bbrj_81_17
- Montoro, D. T., Haber, A. L., Biton, M., Vinarsky, V., Lin, B., Birket, S. E., et al. (2018). A Revised Airway Epithelial Hierarchy Includes CFTR-Expressing Ionocytes. *Nature* 560, 319–324. doi:10.1038/s41586-018-0393-7
- Nguyen, J. P., Huff, R. D., Cao, Q. T., Tiessen, N., Carlsen, C., and Hirota, J. A. (2021). Effects of Environmental Air Pollutants on CFTR Expression and Function in Human Airway Epithelial Cells. *Toxicol. Vitro* 77, 105253. doi:10.1016/j.tiv.2021.105253
- Nissim-Rafinia, M., and Kerem, B. (2005). The Splicing Machinery Is a Genetic Modifier of Disease Severity. *Trends Genet.* 21, 480–483. doi:10.1016/j.tig.2005.07.005
- Oates, G. R., and Schechter, M. S. (2016). Socioeconomic Status and Health Outcomes: Cystic Fibrosis as a Model. *Expert Rev. Respir. Med.* 10, 967–977. doi:10.1080/17476348.2016.1196140
- Paulin, L., and Hansel, N. (2016). Particulate Air Pollution and Impaired Lung Function. *F1000Res* 5, 201. doi:10.12688/f1000research.7108.1
- Pedersen, M. (1990). Ciliary Activity and Pollution. *Lung* 168, 368–376. doi:10.1007/BF02718154
- Pittman, J. E., Calloway, E. H., Kiser, M., Yeatts, J., Davis, S. D., Drumm, M. L., et al. (2011). Age of *Pseudomonas aeruginosa* Acquisition and Subsequent Severity of Cystic Fibrosis Lung Disease. *Pediatr. Pulmonol.* 46, 497–504. doi:10.1002/ppul.21397
- Plasschaert, L. W., Žilionis, R., Choo-Wing, R., Savova, V., Knehr, J., Roma, G., et al. (2018). A Single-Cell Atlas of the Airway Epithelium Reveals the CFTR-Rich Pulmonary Ionocyte. *Nature* 560, 377–381. doi:10.1038/s41586-018-0394-6
- Psoter, K. J., De Roos, A. J., Mayer, J. D., Kaufman, J. D., Wakefield, J., and Rosenfeld, M. (2015). Fine Particulate Matter Exposure and Initial *Pseudomonas aeruginosa* Acquisition in Cystic Fibrosis. *Ann. ATS* 12, 385–391. doi:10.1513/AnnalsATS.201408-400OC
- Psoter, K. J., De Roos, A. J., Wakefield, J., Mayer, J. D., and Rosenfeld, M. (2017). Air Pollution Exposure Is Associated with MRSA Acquisition in Young U.S. Children with Cystic Fibrosis. *BMC Pulm. Med.* 17, 106. doi:10.1186/s12890-017-0449-8

- Psoter, K. J., De Roos, A. J., Wakefield, J., Mayer, J., and Rosenfeld, M. (2013). Season Is Associated with *Pseudomonas aeruginosa* Acquisition in Young Children with Cystic Fibrosis. *Clin. Microbiol. Infect.* 19, E483–E489. doi:10.1111/1469-0691.12272
- Qu, F., Qin, X.-Q., Cui, Y.-R., Xiang, Y., Tan, Y.-R., Liu, H.-J., et al. (2009). Ozone Stress Down-Regulates the Expression of Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator in Human Bronchial Epithelial Cells. *Chemico-Biological Interact.* 179, 219–226. doi:10.1016/j.cbi.2008.10.059
- Raaschou-Nielsen, O., Andersen, Z. J., Beelen, R., Samoli, E., Stafoggia, M., Weinmayr, G., et al. (2013). Air Pollution and Lung Cancer Incidence in 17 European Cohorts: Prospective Analyses from the European Study of Cohorts for Air Pollution Effects (ESCAPE). *Lancet Oncol.* 14, 813–822. doi:10.1016/S1470-2045(13)70279-1
- Rager, J. E., Lichtveld, K., Ebersviller, S., Smeester, L., Jaspers, I., Sexton, K. G., et al. (2011). A Toxicogenomic Comparison of Primary and Photochemically Altered Air Pollutant Mixtures. *Environ. Health Perspect.* 119, 1583–1589. doi:10.1289/ehp.1003323
- Raju, S. V., Jackson, P. L., Courville, C. A., McNicholas, C. M., Sloane, P. A., Sabbatini, G., et al. (2013). Cigarette Smoke Induces Systemic Defects in Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Function. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 188, 1321–1330. doi:10.1164/rccm.201304-0733OC
- Raju, S. V., Lin, V. Y., Liu, L., McNicholas, C. M., Karki, S., Sloane, P. A., et al. (2017). The Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Potentiator Ivacaftor Augments Mucociliary Clearance Abrogating Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Inhibition by Cigarette Smoke. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 56, 99–108. doi:10.1165/rcmb.2016-0226OC
- Ramsay, K., Stockwell, R., Bell, S., and Kidd, T. (2016). Infection in Cystic Fibrosis: Impact of the Environment and Climate. *Expert Rev. Respir. Med.* 10, 505–519. doi:10.1586/17476348.2016.1162715
- Rasmussen, L. W., Stanford, D., Patel, K., and Raju, S. V. (2020). Evaluation of Secondhand Smoke Effects on CFTR Function *In Vivo*. *Respir. Res.* 21, 70. doi:10.1186/s12931-020-1324-3
- Ravishankara, A. R. (2003). Introduction: Atmospheric Chemistry Long-Term Issues. *Chem. Rev.* 103, 4505–4508. doi:10.1021/cr020463i
- Raynal, C., and Corvol, H. (2020). Variant Classifications, Databases and Genotype-Phenotype Correlations. *Arch. Pédiatrie* 27, eS13–eS18. doi:10.1016/S0929-693X(20)30045-2
- Ringholz, F. C., Buchanan, P. J., Clarke, D. T., Millar, R. G., McDermott, M., Linnane, B., et al. (2014). Reduced 15-lipoxygenase 2 and Lipoxin A4/leukotriene B4 Ratio in Children with Cystic Fibrosis. *Eur. Respir. J.* 44, 394–404. doi:10.1183/09031936.00106013
- Ringholz, F. C., Higgins, G., Hatton, A., Sassi, A., Moukachar, A., Fustero-Torre, C., et al. (2018). Resolvin D1 Regulates Epithelial Ion Transport and Inflammation in Cystic Fibrosis Airways. *J. Cyst. Fibros.* 17, 607–615. doi:10.1016/j.jcf.2017.11.017
- Riordan, J. R., Rommens, J. M., Kerem, B.-S., Alon, N., Rozmahel, R., Grzelczak, Z., et al. (1989). Identification of the Cystic Fibrosis Gene: Cloning and Characterization of Complementary DNA. *Science* 245, 1066–1073. doi:10.1126/science.2475911
- Rodriguez, D., Valari, M., Payan, S., and Eymard, L. (2019). On the Spatial Representativeness of NOX and PM10 Monitoring-Sites in Paris, France. *Atmos. Environ. X* 1, 100010. doi:10.1016/j.aeoa.2019.100010
- Roesch, E. A., Nichols, D. P., and Chmiel, J. F. (2018). Inflammation in Cystic Fibrosis: An Update. *Pediatr. Pulmonol.* 53, S30–S50. doi:10.1002/ppul.24129
- Rommens, J. M. (2011). *Cystic Fibrosis Mutation Database*. Available at: <http://www.genet.sickkids.on.ca/StatisticsPage.html> (Accessed January 30, 2021).
- Rosenfeld, M., Gibson, R. L., McNamara, S., Emerson, J., Burns, J. L., Castile, R., et al. (2001). Early Pulmonary Infection, Inflammation, and Clinical Outcomes in Infants with Cystic Fibrosis. *Pediatr. Pulmonol.* 32, 356–366. doi:10.1002/ppul.1144
- Rottner, M., Kunzelmann, C., Mergely, M., Freyssinet, J. M., and Martínez, M. C. (2007). Exaggerated Apoptosis and NF- κ B Activation in Pancreatic and Tracheal Cystic Fibrosis Cells. *FASEB J.* 21, 2939–2948. doi:10.1096/fj.06-7614com
- Rottner, M., Tual-Chalot, S., Mostefai, H. A., Andriantsitohaina, R., Freyssinet, J.-M., and Martínez, M. C. (2011). Increased Oxidative Stress Induces Apoptosis in Human Cystic Fibrosis Cells. *PLOS ONE* 6, e24880. doi:10.1371/journal.pone.0024880
- Rubin, B. K. (1990). Exposure of Children with Cystic Fibrosis to Environmental Tobacco Smoke. *N. Engl. J. Med.* 323, 782–788. doi:10.1056/NEJM199009203231203
- Sagel, S. D., Wagner, B. D., Anthony, M. M., Emmett, P., and Zemanick, E. T. (2012). Sputum Biomarkers of Inflammation and Lung Function Decline in Children with Cystic Fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 186, 857–865. doi:10.1164/rccm.201203-0507OC
- Saldiva, P. H. N., King, M., Delmonte, V. L. C., Macchione, M., Parada, M. A. C., Daliberto, M. L., et al. (1992). Respiratory Alterations Due to Urban Air Pollution: an Experimental Study in Rats. *Environ. Res.* 57, 19–33. doi:10.1016/s0013-9351(05)80016-7
- Sanders, D. B., Bittner, R. C. L., Rosenfeld, M., Hoffman, L. R., Redding, G. J., and Goss, C. H. (2010). Failure to Recover to Baseline Pulmonary Function after Cystic Fibrosis Pulmonary Exacerbation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 182, 627–632. doi:10.1164/rccm.200909-1421OC
- Sanders, D. B., Bittner, R. C., Rosenfeld, M., Redding, G. J., and Goss, C. H. (2011). Pulmonary Exacerbations Are Associated with Subsequent FEV1 Decline in Both Adults and Children with Cystic Fibrosis. *Pediatr. Pulmonol.* 46, 393–400. doi:10.1002/ppul.21374
- Schraufnagel, D. E. (2020). The Health Effects of Ultrafine Particles. *Exp. Mol. Med.* 52, 311–317. doi:10.1038/s12276-020-0403-3
- Scudieri, P., Musante, I., Venturini, A., Guidone, D., Genovese, M., Cresta, F., et al. (2020). Ionocytes and CFTR Chloride Channel Expression in Normal and Cystic Fibrosis Nasal and Bronchial Epithelial Cells. *Cells* 9, 2090. doi:10.3390/cells9092090
- Seinfeld, J. H., and Pandis, S. N. (2016). *Atmospheric Chemistry and Physics: From Air Pollution to Climate Change*. 3rd Edition. New-York: John Wiley & Sons.
- Semaniakou, A., Croll, R. P., and Chappe, V. (2019). Animal Models in the Pathophysiology of Cystic Fibrosis. *Front. Pharmacol.* 9, 1475. doi:10.3389/fphar.2018.01475
- Sepahzad, A., Morris-Rosendahl, D. J., and Davies, J. C. (2021). Cystic Fibrosis Lung Disease Modifiers and Their Relevance in the New Era of Precision Medicine. *Genes* 12, 562. doi:10.3390/genes12040562
- Shi, R., Su, W.-W., Zhu, Z.-T., Guan, M.-Y., Cheng, K.-L., Fan, W.-Y., et al. (2019). Regulation Effects of Naringin on Diesel Particulate Matter-Induced Abnormal Airway Surface Liquid Secretion. *Phytomedicine* 63, 153004. doi:10.1016/j.phymed.2019.153004
- Shteynberg, M., Haq, I. J., Polineni, D., and Davies, J. C. (2021). Cystic Fibrosis. *Lancet* 397, 2195–2211. doi:10.1016/S0140-6736(20)32542-3
- Sloane, P. A., Shastry, S., Wilhelm, A., Courville, C., Tang, L. P., Backer, K., et al. (2012). A Pharmacologic Approach to Acquired Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Dysfunction in Smoking Related Lung Disease. *PLoS One* 7, e39809. doi:10.1371/journal.pone.0039809
- Smyth, A., O'Hea, U., Williams, G., Smyth, R., and Heaf, D. (1994). Passive Smoking and Impaired Lung Function in Cystic Fibrosis. *Archives Dis. Child.* 71, 353–354. doi:10.1136/adc.71.4.353
- Stanford, G. E., Dave, K., and Simmonds, N. J. (2021). Pulmonary Exacerbations in Adults with Cystic Fibrosis. *CHEST* 159, 93–102. doi:10.1016/j.chest.2020.09.084
- Stieb, D. M., Chen, L., Eshoul, M., and Judek, S. (2012). Ambient Air Pollution, Birth Weight and Preterm Birth: a Systematic Review and Meta-Analysis. *Environ. Res.* 117, 100–111. doi:10.1016/j.envres.2012.05.007
- Sueyoshi, S., Miyata, Y., Masumoto, Y., Ishibashi, Y., Matsuzawa, S., Harano, N., et al. (2004). Reduced Airway Inflammation and Remodeling in Parallel with Mucin 5AC Protein Expression Decreased by S-Carboxymethylcysteine, a Mucoregulant, in the Airways of Rats Exposed to Sulfur Dioxide. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 134, 273–280. doi:10.1159/000079164
- Szczesniak, R., Rice, J. L., Brokamp, C., Ryan, P., Pestian, T., Ni, Y., et al. (2020). Influences of Environmental Exposures on Individuals Living with Cystic Fibrosis. *Expert Rev. Respir. Med.* 14, 737–748. doi:10.1080/17476348.2020.1753507
- Thatcher, T. H., Woeller, C. F., McCarthy, C. E., and Sime, P. J. (2019). Quenching the Fires: Pro-resolving Mediators, Air Pollution, and Smoking. *Pharmacol. Ther.* 197, 212–224. doi:10.1016/j.pharmthera.2019.02.001

- The Cystic Fibrosis Genotype-Phenotype Consortium (1993). Correlation between Genotype and Phenotype in Patients with Cystic Fibrosis. *N. Engl. J. Med.* 329, 1308–1313. doi:10.1056/NEJM199310283291804
- Thurston, G. D., Balmes, J. R., Garcia, E., Gilliland, F. D., Rice, M. B., Schikowski, T., et al. (2020). Outdoor Air Pollution and New-Onset Airway Disease. An Official American Thoracic Society Workshop Report. *Ann. ATS* 17, 387–398. doi:10.1513/AnnalsATS.202001-046ST
- Verrière, V., Higgins, G., Al-Alawi, M., Costello, R. W., McNally, P., Chiron, R., et al. (2012). Lipoxin A4 Stimulates Calcium-Activated Chloride Currents and Increases Airway Surface Liquid Height in Normal and Cystic Fibrosis Airway Epithelia. *PLoS One* 7, e37746. doi:10.1371/journal.pone.0037746
- Voisin, G., Bouvet, G. F., Legendre, P., Dagenais, A., Massé, C., and Berthiaume, Y. (2014). Oxidative Stress Modulates the Expression of Genes Involved in Cell Survival in $\Delta F508$ Cystic Fibrosis Airway Epithelial Cells. *Physiol. Genomics* 46, 634–646. doi:10.1152/physiolgenomics.00003.2014
- Walker, J. C. G. (1977). *Evolution of the Atmosphere*. New York: Macmillan.
- Waters, V., Stanojevic, S., Atenafu, E. G., Lu, A., Yau, Y., Tullis, E., et al. (2012). Effect of Pulmonary Exacerbations on Long-Term Lung Function Decline in Cystic Fibrosis. *Eur. Respir. J.* 40, 61–66. doi:10.1183/09031936.00159111
- Wayne, R. P. (2000). *Chemistry of Atmospheres: An Introduction to the Chemistry of the Atmospheres of Earth, the Planets, and Their Satellites*. Third Edition. Oxford, New York: Oxford University Press.
- Wild, C. P. (2012). The Exposome: from Concept to Utility. *Int. J. Epidemiol.* 41, 24–32. doi:10.1093/ije/dyr236
- Wilke, M., Buijs-Offerman, R. M., Aarbiou, J., Colledge, W. H., Sheppard, D. N., Touqui, L., et al. (2011). Mouse Models of Cystic Fibrosis: Phenotypic Analysis and Research Applications. *J. Cyst. Fibros.* 10 (Suppl. 2), S152–S171. doi:10.1016/S1569-1993(11)60020-9
- World Health Organization (2021). *Ambient (Outdoor) Air Pollution*. Available at: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/ambient-\(outdoor\)-air-quality-and-health](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/ambient-(outdoor)-air-quality-and-health).
- Zhou, Z., Duerr, J., Johannesson, B., Schubert, S. C., Treis, D., Harm, M., et al. (2011). The ENaC-Overexpressing Mouse as a Model of Cystic Fibrosis Lung Disease. *J. Cyst. Fibros.* 10 (Suppl. 2), S172–S182. doi:10.1016/S1569-1993(11)60021-0
- Ziady, A. G., and Hansen, J. (2014). Redox Balance in Cystic Fibrosis. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 52, 113–123. doi:10.1016/j.biocel.2014.03.006
- Conflict of Interest:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.
- Publisher's Note:** All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.
- Copyright © 2022 Blayac, Coll, Urbach, Fanen, Epaud and Lanone. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Annexe 2 Valeurs de fold-change pour tous les marqueurs étudiés chez les souris WT.

Biological endpoint	Markers	Beijing-W ₁ 18H	Beijing-W ₁ 72H	Beijing-S ₂	Paris-S
Mucin expression	MUC5AC	1,15	1,14	0,90	1,52
	MUC5B	0,92	0,96	0,91	0,88
	Mean	1,03	1,05	0,91	1,20
	Log₁₀	0,01	0,02	-0,04	0,08
Destruction of lung tissue	MLI	1,15	0,94	1,03	1,03
	MMP9	0,71	0,66	-	1,21
	MMP12	0,53	1,28	1,23	0,62
	NE	0,31	2,13	1,15	0,95
	Mean	0,68	1,25	1,14	0,95
	Log₁₀	-0,17	0,10	0,06	-0,02
Oxidative stress	MPO/GPX1 Ratio	0,43	1,49	0,08	0,07
	Log₁₀	-0,37	0,15	-1,10	-1,15
Pro-inflammatory markers	CCL5	0,28	2,38	0,84	0,49
	CXCL1	0,23	0,84	0,75	0,81
	CXCL10	0,60	1,20	1,18	0,58
	IFNg	0,41	1,17	1,22	0,46
	G-CSF	0,29	0,15	34,63	-
	IL-1a	0,87	1,56	0,95	0,61
	IL-1b	0,00	5,12	-	-
	IL-2	0,78	1,38	0,98	0,61
	IL-6	0,00	0,60	1,44	-
	IL-9	0,68	1,86	0,64	0,47
	IL-12(p40)	0,92	1,58	0,47	0,05
	IL-13	2,67	0,88	1,51	0,00
	IL-15	0,52	2,47	0,77	0,13
	IL-17	0,17	1,32	0,00	-
	MIP-1a	0,13	1,18	-	0,00
	TNFα	0,00	0,97	-	-
	VEGF	0,74	1,07	1,16	0,64
	NE	0,31	2,13	1,15	0,95
	Macrophages (10 ³ /mL)	1,35	0,94	0,78	1,22
	Lymphocytes (10 ³ /mL)	0,75	1,28	1,80	0,65
Neutrophils (10 ³ /mL)	0,78	0,87	1,76	0,52	
Mean	0,57	1,45	3,59	0,51	
Log₁₀	-0,24	0,16	0,56	-0,29	
Anti-inflammatory marker	IL-10	1,25	1,24	1,10	0,60
	Log₁₀	0,10	0,09	0,04	-0,22
Lung function	Inspiratory capacity			0,88	0,97
	Static compliance			0,84	0,98
	Mean	N.A	N.A	0,86	0,98
	Log₁₀			-0,07	-0,01

N.A = Non applicable car non mesuré

Pour chaque atmosphère considérée et pour chaque marqueur étudié, les fold-change ont été calculés entre le groupe de souris exposées aux atmosphères urbaines et le groupe de souris exposées à l'atmosphère contrôle correspondante. Un fold-change moyen a ensuite été calculé pour chaque ensemble de marqueurs. Les Log_{10} de ces fold-change moyens ont ensuite été calculés afin de tracer les graphiques radar. Dans le tableau, les cases vides renvoient à un fold-change qui n'a pas pu être calculé pour cause d'un dénominateur égal à zéro (valeur du marqueur égale à zéro dans le groupe témoin). Ces valeurs manquantes n'ont ainsi pas pu être incluses dans le calcul du fold-change moyen de l'endpoint biologique correspondant.

Annexe 3 Valeurs de fold-change pour tous les marqueurs étudiés chez les souris *Cftr^{tm1EUR}*.

Biological endpoint	Markers	Beijing-W ₁ 18H	Beijing-W ₁ 72H	Beijing-S ₂	Paris-S
Mucin expression	MUC5AC	1,18	0,59	0,77	0,93
	MUC5B	1,09	0,83	0,91	0,86
	Mean	1,13	0,71	0,84	0,90
	Log₁₀	0,05	-0,15	-0,08	-0,05
Destruction of lung tissue	MLI	0,97	0,98	0,98	1,01
	MMP9	0,50	1,36	-	1,60
	MMP12	1,17	1,34	1,18	0,96
	NE	1,60	4,32	1,33	1,18
	Mean	1,06	2,00	1,16	1,19
	Log₁₀	0,03	0,30	0,06	0,08
Oxidative stress	MPO/GPX1 Ratio	1,95	1,42	0,79	3,08
	Log₁₀	0,29	0,15	-0,10	0,49
Pro-inflammatory markers	CCL5	1,48	2,15	2,06	1,37
	CXCL1	1,05	5,00	0,79	1,58
	CXCL10	1,34	2,88	1,42	1,49
	IFNg	1,24	0,71	6,66	2,09
	G-CSF	0,57	3,64	1,21	1,21
	IL-1a	1,37	2,02	1,69	1,43
	IL-2	1,16	1,15	1,43	1,30
	IL-6	0,00	13,28	1,61	-
	IL-9	2,29	1,60	1,30	1,04
	IL-12(p40)	0,76	1,61	1,55	-
	IL-13	0,65	0,00	1,78	0,92
	IL-15	0,17	3,69	1,85	1,53
	IL-17	-	6,87	0,00	-
	MIP-1a	0,97	7,32	0,00	-
	TNFα	-	12,13	-	-
	VEGF	0,96	1,16	0,94	0,71
	NE	1,60	4,32	1,33	1,18
	Macrophages (10 ³ /mL)	6,38	2,11	0,94	1,27
	Lymphocytes (10 ³ /mL)	10,57	1,83	0,33	0,37
	Neutrophils (10 ³ /mL)	6,79	4,86	0,06	-
Mean	2,19	3,92	1,50	1,25	
Log₁₀	0,34	0,59	0,18	0,10	
Anti-inflammatory marker	IL-10	2,79	2,70	1,99	1,70
	Log₁₀	0,45	0,43	0,30	0,23
Lung function	Inspiratory capacity			0,97	0,98
	Compliance			0,92	0,94
	Mean	N.A	N.A	0,95	0,96
	Log₁₀			-0,02	-0,02

N.A = Non applicable car non mesuré

Pour chaque atmosphère considérée et pour chaque marqueur étudié, les fold-change ont été calculés entre le groupe de souris exposées aux atmosphères urbaines et le groupe de souris exposées à l'atmosphère contrôle correspondante. Un fold-change moyen a ensuite été calculé pour chaque ensemble de marqueurs. Les Log_{10} de ces fold-change moyens ont ensuite été calculés afin de tracer les graphiques radar. Dans le tableau, les cases vides renvoient à un fold-change qui n'a pas pu être calculé pour cause d'un dénominateur égal à zéro (valeur du marqueur égale à zéro dans le groupe témoin). Ces valeurs manquantes n'ont ainsi pas pu être incluses dans le calcul du fold-change moyen de l'endpoint biologique correspondant.

