



**HAL**  
open science

**Impact des particules fines (PM<sub>2.5-0.3</sub>) et de leurs fractions chimiques associées sur les mécanismes cellulaires et moléculaires après exposition de cellules épithéliales bronchiques humaines saines et pathologiques**

Philomène Despréaux

► **To cite this version:**

Philomène Despréaux. Impact des particules fines (PM<sub>2.5-0.3</sub>) et de leurs fractions chimiques associées sur les mécanismes cellulaires et moléculaires après exposition de cellules épithéliales bronchiques humaines saines et pathologiques. Médecine humaine et pathologie. Université Paris Cité, 2023. Français. NNT : 2023UNIP5256 . tel-04767530

**HAL Id: tel-04767530**

**<https://theses.hal.science/tel-04767530v1>**

Submitted on 5 Nov 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.

# Université Paris Cité

École doctorale Pierre Louis de santé publique : épidémiologie et sciences de  
l'information biomédicale (ED 393)

Centre de Recherche en Épidémiologie et StatistiqueS (UMR-S 1153)

## **Impact des particules fines (PM<sub>2.5-0.3</sub>) et de leurs fractions chimiques associées sur les mécanismes cellulaires et moléculaires après exposition de cellules épithéliales bronchiques humaines saines et pathologiques**

Par **Philomène DESPRÉAUX**

Thèse de doctorat d'Épidémiologie

Dirigée par Isabelle MOMAS

Présentée et soutenue publiquement le 14 décembre 2023

**Devant un jury composé de :**

Hélène FENET, Professeur des Universités, Université de Montpellier, Rapportrice

Guillaume GARÇON, Professeur des Universités, Université de Lille, Rapporteur

Armelle BAEZA-SQUIBAN, Professeur des Universités, Université Paris Cité, Examinatrice

Mathilde DELAVAL, Group Leader, Helmholtz Zentrum München, Examinatrice

Jean-Philippe JAIS, Maître de conférences, Université Paris Cité, Examineur

Hélène DESQUEYROUX, PhD, ADEME, Membre invité

Sophie ACHARD, MCU, Université Paris Cité, Membre invité

Isabelle MOMAS, Professeur des Universités, Université Paris Cité, Directrice de thèse



# Laboratoire d'accueil



Université Paris Cité

Faculté de pharmacie de Paris

Inserm UMR 1153 – CRESS

Équipe HERA (*Health Environmental Risk Assessment*)

4 avenue de l'Observatoire

75 270 Paris Cedex 06, France

Tél : +33 (0)1 53 73 97 28





# Financements

Cette thèse a été co-financée pendant trois ans par une bourse de thèse de l'ADEME (Agence de la transition écologique) et du DIMQi<sup>2</sup> (Réseau de recherche sur la qualité de l'air en région Ile-de-France).





# Résumé

**Impact des particules fines (PM<sub>2.5-0.3</sub>) et de leurs fractions chimiques associées sur les mécanismes cellulaires et moléculaires après exposition de cellules épithéliales bronchiques humaines saines et pathologiques.**

**Introduction.** Partie intégrante de notre exposome, les particules fines (PM<sub>2.5</sub>) sont considérées comme un mélange hétérogène et complexe de polluants, représentant un risque important pour la santé humaine. De nombreuses études épidémiologiques ont établi des associations entre l'exposition aux PM<sub>2.5</sub> et la survenue ou l'aggravation de maladies respiratoires telles que l'asthme et la BPCO. Cependant, les mécanismes sous-jacents ne sont pas encore entièrement compris.

**Objectif.** Dans ce contexte, l'objectif principal de ce travail de thèse est de contribuer à l'amélioration des connaissances sur l'impact des PM<sub>2.5</sub> sur les mécanismes cellulaires et moléculaires intervenant après exposition de cellules épithéliales bronchiques humaines. Pour atteindre cet objectif il a été envisagé d'étudier **(1)** l'impact de la part chimie des particules en évaluant les effets de PM<sub>2.5</sub> de source d'émission différente et donc de composition chimique distincte, puis en déterminant le rôle de deux fractions chimiques constitutives des PM<sub>2.5</sub> sur un ou plusieurs effet(s) cellulaire(s) et moléculaire(s) et **(2)** l'existence potentielle d'un impact différentiel des PM<sub>2.5</sub> en fonction du statut physiopathologique des individus.

**Matériel et méthodes.** Deux modèles *in vitro* complémentaires ont été utilisés : un modèle d'épithélium reconstruit d'origine bronchique et un modèle de cellules épithéliales bronchiques. Ces modèles sont issus de cellules primaires humaines prélevées chez des donneurs sains, asthmatiques ou atteints de BPCO. Les épithéliums ont été exposés de façon répétée à des PM<sub>2.5-0.3</sub> provenant de sources d'émission différentes (industrie et trafic). Les cellules épithéliales ont été exposées à des PM<sub>2.5-0.3</sub> dans leur entièreté et à deux fractions chimiques qui leur sont associées, la fraction organique extractible (O-PM) contenant notamment les HAP, et la fraction non extractible (Ne-PM), principalement composée du carbone inorganique et des métaux. Des expositions uniques ou répétées et alternées avec des périodes de repos ont été réalisées. Suite aux expositions, les expressions géniques ont été évaluées par RT-qPCR, puis analysées à l'aide de deux méthodes : la méthode d'analyse classique de  $\Delta\Delta C_t$  et une méthode d'analyse graphique par réseaux.

**Résultats.** La méthode d'analyse graphique par réseaux s'est avérée avoir de meilleures propriétés statistiques que la méthode classique et a permis de démontrer que l'exposition aux PM<sub>2.5-0.3</sub> dans leur entièreté induisait une modulation de l'expression de gènes du métabolisme et de l'inflammation. Ces réponses variaient en fonction de la source d'émission des PM<sub>2.5-0.3</sub> et donc de leur composition chimique. La fraction Ne-PM était associée à la réponse inflammatoire, tandis que la fraction O-PM jouait un rôle prépondérant dans la réponse métabolique. De manière intéressante, un effet synergique entre les fractions O-PM et Ne-PM apparaissait lorsque les deux fractions étaient combinées, notamment sur la réponse métabolique. De plus, les résultats ont montré que les effets persistaient après des périodes de repos et étaient exacerbés suite à une seconde exposition, indiquant un effet « mémoire » des cellules. Par ailleurs, les réponses cellulaires et moléculaires étaient influencées par le statut physiopathologique, avec une plus grande sensibilité des modèles asthmatiques.

**Conclusion.** L'impact des PM<sub>2.5-0.3</sub> au niveau des cellules épithéliales bronchiques dépend d'une part de leur composition chimique et d'autre part du statut physiopathologique du donneur. Ces résultats encouragent à prendre en compte la composition chimique des particules dans les programmes de surveillance de la qualité de l'air et à renforcer les mesures de protection mises en place pour les personnes les plus vulnérables, en particulier les asthmatiques.

**Mots clés :** particules fines ; fraction organique extractible ; fraction non-extractible ; épithéliums bronchiques reconstruits ; cellules épithéliales bronchiques ; *in vitro* ; inflammation ; métabolisme ; statuts physiopathologiques.

# Abstract

**Impact of fine particles (PM<sub>2.5-0.3</sub>) and their associated chemical fractions on cellular and molecular mechanisms following exposure of healthy and pathological human bronchial epithelial cells.**

**Introduction.** Fine particles (PM<sub>2.5</sub>) are part of our exposome, comprising a complex and heterogeneous mixture of pollutants that pose a significant risk to human health. Numerous epidemiological studies have established associations between PM<sub>2.5</sub> exposure and the onset or exacerbation of respiratory diseases, such as asthma and COPD. However, the underlying mechanisms remain unclear.

**Objective.** In this context, the main objective of this thesis is to contribute to our understanding of the impact of PM<sub>2.5</sub> on cellular and molecular mechanisms following exposure of human bronchial epithelial cells. This research aimed **(1)** to assess the impact of particle chemical composition by evaluating the effects of PM<sub>2.5</sub> from different emission sources, each characterized by distinct chemical compositions, and determining the role of two constituent chemical fractions of PM<sub>2.5</sub> on cellular and molecular effects and **(2)** investigate the potential differential impact of PM<sub>2.5</sub> based on the pathophysiological status of individuals.

**Materials and Methods.** Two complementary *in vitro* models were used: reconstructed bronchial epithelia and bronchial epithelial cells. These models were derived from primary human cells obtained from healthy, asthmatics, or COPD donors. Epithelia were repetitively exposed to PM<sub>2.5-0.3</sub> from different emission sources (industry and traffic). Epithelial cells were exposed to whole PM<sub>2.5-0.3</sub> and to two associated chemical fractions, the extractable organic fraction (O-PM), which includes PAHs, and the non-extractable fraction (Ne-PM), mainly composed of inorganic carbon and metals. Single exposures or repeated exposures alternated with rest periods were carried out. Following the exposures, gene expressions were evaluated using RT<sup>2</sup>-qPCR, and analyzed using two methods: the classical  $\Delta\Delta C_t$  analysis method and a graph analysis on pairwise expression *ratio* method.

**Results.** The graph analysis method demonstrated better statistical properties than the classical method and revealed that exposure to whole PM<sub>2.5-0.3</sub> induced a modulation of genes related to metabolism and inflammation. These responses varied depending on the emission source of PM<sub>2.5-0.3</sub> and, consequently, their chemical composition. The Ne-PM fraction was associated with the inflammatory response, while the O-PM fraction played a predominant role in the metabolic response. Interestingly, a synergistic effect between O-PM and Ne-PM fractions emerged when both fractions were combined, particularly affecting the metabolic response. Furthermore, the results showed that the effects persisted after rest periods and were exacerbated following a second exposure, indicating a "cellular memory" effect. Additionally, cellular and molecular responses were influenced by the pathophysiological status, with higher sensitivity observed in asthmatic models.

**Conclusion.** The impact of PM<sub>2.5-0.3</sub> on bronchial epithelial cells depends on both their chemical composition and the pathophysiological status of the donor. These results emphasize the importance of considering the chemical composition of particles in air quality monitoring programs and strengthening protective measures for vulnerable individuals, particularly asthmatics.

**Keywords:** fine particles; extractable organic fraction; non-extractable fraction; reconstructed bronchial epithelium; bronchial epithelial cells; *in vitro*; inflammation; metabolism; pathophysiological status.

# Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mes rapporteurs, le **Pr. Hélène Fenet** et le **Pr. Guillaume Garçon**. Je vous remercie pour la grande attention que vous avez portée à mon manuscrit et pour l'objectivité et la rigueur avec lesquelles vous avez jugé mes travaux. Je vous remercie également très chaleureusement d'avoir accepté de rédiger vos rapports avec une contrainte de temps importante et de m'avoir ainsi permis de maintenir la date de ma soutenance de thèse.

Je souhaite exprimer mes sincères remerciements aux membres du jury, le **Pr. Armelle Baeza-Squiban**, le **Dr. Mathilde Delaval**, le **Dr. Hélène Desquyeroux** et le **Dr. Jean-Philippe Jais**, d'avoir accepté mon invitation pour juger ces trois années de travail. Je vous remercie pour votre disponibilité et pour le grand intérêt que vous avez montré pour mon sujet de thèse.

Je tiens également à remercier mes encadrantes de thèse, le **Dr. Sophie Achard** et le **Pr. Isabelle Momas**. Sophie, je te remercie de m'avoir offert l'opportunité de réaliser cette thèse et de travailler pendant trois ans sur un sujet passionnant. C'est grâce à toi que j'ai eu la chance d'obtenir une bourse de thèse ADEME, ce qui m'a permis de vivre cette grande aventure scientifique. Je te remercie également pour tes idées originales et tes relectures. Madame Momas, je vous remercie pour les temps précieux que vous m'avez accordés et pour votre aide, particulièrement en fin de thèse, une période riche en pression. Je vous remercie également de veiller avec beaucoup de bienveillance sur toute notre équipe.

Je souhaite exprimer mes sincères remerciements à ma tutrice de l'école doctorale, le **Dr. Maria Melchior** pour sa bienveillance et son aide afin de maintenir ma date de soutenance à la fin de l'année 2023.

Je remercie très chaleureusement le **Dr. Dorota Desaulle**. Dorota, j'ai beaucoup aimé travailler avec toi durant ces trois années de thèse. Je te remercie pour ta gentillesse et ta patience et pour ton aide précieuse ayant permis de mener à bien les analyses statistiques présentées dans ce manuscrit.

Je tiens également à remercier le **Dr. Anne-Laure-Schang** et le **Dr. Margueritta Al Zallouha** pour leurs enseignements des différentes manipulations qui m'ont permis de mener à bien ces travaux de thèse. Je vous remercie également pour avoir assisté à tous mes comités de suivi de thèse, pour vos remarques pertinentes et pour vos conseils.

Je remercie également les deux stagiaires de Master 1 que j'ai eu la chance d'encadrer durant ma thèse, **Capucine** et **Camille**. Vous avez toutes les deux fait preuve de beaucoup de sérieux et de rigueur et cela a été un plaisir de travailler avec vous.

Je souhaite exprimer mes remerciements à toute l'**équipe HERA** pour leur accueil chaleureux d'abord pour mon stage de Master 2 puis pour ma thèse. Merci à tous pour l'ambiance agréable qui règne au laboratoire de Santé Publique !

Je tiens à remercier particulièrement le **Dr. Céline Roda**. Céline, je te remercie très sincèrement pour ton soutien et tes conseils pendant ces trois années de thèse. Tu as beaucoup de qualités tant sur le plan professionnel que sur le plan personnel et c'est très agréable de t'avoir comme collègue.

Je remercie également très chaleureusement, le gestionnaire de notre équipe **Denis Basse**. Denis, je te remercie énormément pour l'aide que tu m'as apporté durant ces trois années de thèse (pour les commandes, les impressions, les galères de transports, etc.) et c'était un vrai plaisir de t'avoir comme voisin de bureau tous les mercredis après-midi.

Je souhaite remercier très chaleureusement mes collègues de bureaux, **Antoine, Léa** et **Malika**, qui ont été un vrai soutien au cours de ces trois années de thèse. Antoine, on aura commencé et soutenu nos thèses (presque) en même temps ! Je te remercie pour ta gentillesse et pour ta bonne humeur. Léa, je te remercie sincèrement pour tes conseils pour tout ce qui concerne la mise en page et les milles et unes astuces que tu m'as donné sur Word et sur PowerPoint. Malika, tu es un vrai rayon de soleil et c'était un plaisir de travailler en face de toi tous les jours. Merci beaucoup pour toutes tes petites attentions et pour tes encouragements quotidiens.

Je remercie également le **Dr. Melissa Hachem** et le **Dr. Hélène Amazouz**, anciennes doctorantes de l'équipe. Melissa, Hélène, merci pour votre gentillesse et d'avoir partagé vos expériences de thèse avec moi. Vos conseils ont été précieux pour moi et m'ont beaucoup aidé.

Je souhaite également remercier le programme Femmes et Sciences et particulièrement ma mentore **Fabienne**. Fabienne, je te remercie d'avoir partagé ton expérience de chercheuse avec moi. Nos discussions ont été très enrichissantes et m'ont permis de prendre du recul sur ma thèse. Cela a été une grande chance pour moi de participer à ce programme durant ma thèse.

Je tiens à remercier très chaleureusement les personnes du cours de Capoeira de l'université Paris Cité. **Camille** et **Enrique**, vous êtes d'excellents professeurs et je vous remercie de m'avoir fait découvrir ce sport. Merci pour votre investissement et pour tout ce que vous avez organisé pour

les élèves de l'Université (les rodas mensuelles, les cours de musique, les gouters, etc.). Merci également les étudiants du cours du mercredi soir **Sarah, Léa, Etienne, Léo, Louna, Shaden, Lisa, Lucas, Ève, Natasha, Justine, Juliette** et tous les autres. Merci beaucoup pour votre bonne humeur et pour votre énergie !! Vous êtes comme une petite famille pour moi.

Je remercie mes amis **Julien, Roxane, Alex, Kévin, Maëva, Loïc, Mélissa, Jade, Anaëlle, Estelle, Céline**, qui m'ont accompagnée durant ces trois années de thèse. Merci pour tous les doux moments passés ensemble et pour votre soutien !

Je souhaite remercier **ma famille** du fond du cœur. Maman, Papa, Garance je vous remercie d'avoir toujours cru en moi, de m'avoir toujours soutenue et encouragée. Tout cela n'aurait pas été possible sans vous. Je tiens à remercier particulièrement mon papa, qui m'a beaucoup aidé dans la rédaction de mon manuscrit de thèse.

**Simon**, je n'ai pas les mots pour t'exprimer toute ma gratitude. Tu as toujours été là pour moi durant ces trois années de thèse, tu es une personne exceptionnelle et j'ai énormément de chance de t'avoir à mes côtés.





# Valorisations scientifiques

## Publications scientifiques :

**Despréaux P**, Jeanton C, Desaulle D, Al Zallouha M, Verdin A, Momas I, Achard S. Innovative graph analysis method to assess gene expression modulation after fine particles exposures of 3D human airway epithelia. *Environ Res.* 2023 Mar 15;221:115296. doi: 10.1016/j.envres.2023.115296. Epub 2023 Jan 12. PMID: 36642119.

**Despréaux P**, Lagadec C, Desaulle D, Verdin A, Momas I, Achard S. PM<sub>2.5-0.3</sub> induces inflammatory and metabolic responses depending on both chemical fractions and physiopathologic status of human airway epithelial cells. *Soumise.*

## Communications orales :

**Despréaux P**, Jeanton C, Desaulle D, Al Zallouha M, Verdin A, Momas I, Achard S. Assessment of gene expression modulation using graph analysis on pairwise expression ratios. Impact of PM<sub>2.5-0.3</sub> on 3-D bronchial epithelium model. BOHS Inhaled Particles / NanOEI Conference 2023, Manchester (Angleterre), Mai 2023.

**Despréaux P**, Jeanton C, Desaulle D, Al Zallouha M, Verdin A, Momas I, Achard S. Évaluation de la modulation de l'expression génique suite à l'exposition à des particules fines d'un modèle d'épithélium respiratoire humain. Journées des doctorants de l'ADEME, Angers, Mars 2023.

**Despréaux P**, Al Zallouha M, Verdin A, Momas I, Achard S. Impact des particules fines sur les mécanismes épigénétiques après expositions répétées d'épithéliums humains reconstruits d'origine bronchique. Journée des jeunes toxicologues, en ligne, Mars 2022.

**Despréaux P**, Al Zallouha M, Verdin A, Momas I, Achard S. Impact des particules fines sur les mécanismes épigénétiques après expositions répétées d'épithéliums humains reconstruits d'origine bronchique. Colloque de restitution des actions du DIM Qi<sup>2</sup>, Paris, Décembre 2021.

## Communications affichées :

**Despréaux P**, Verdin A, Desaulle D, Momas I, Achard S. Impact of the physical and chemical part of fine particles on human bronchial epithelial cells obtained from healthy and asthmatic

donors. Poster présenté au congrès EUROTOX 2023, Ljubljana (Slovénie), Septembre 2023. [https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(23\)00623-9](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(23)00623-9).

**Despréaux P**, Jeanton C, Desaulle D, Al Zallouha M, Verdin A, Schang A, Momas I, Achard S. Évaluation de la modulation de l'expression génique suite à l'exposition à des particules fines d'un modèle d'épithélium respiratoire humain. Poster présenté aux journées de l'École Doctorale 393, Saint-Malo, février 2023. *Prix du meilleur poster*.

**Despréaux P**, Schang A, Momas I, Achard S. Impact des particules fines sur les mécanismes épigénétiques après expositions répétées d'épithéliums respiratoires humains sains et pathologiques. Poster présenté aux journées de l'École Doctorale 393, Saint-Malo, Novembre 2021.

**Despréaux P**, Schang A, Momas I, Achard S. Impact des particules fines sur les mécanismes épigénétiques après expositions répétées d'épithéliums respiratoires humains sains et pathologiques. Poster présenté au séminaire 2AD'days, Montrouge, Octobre 2021.

Al Zallouha M, **Despréaux P**, A. Verdin, D. Courcot, F. Cazier, V. Desauziers, H. Plaisance, N. Costarramone, S. Achard. Evaluation of biological and epigenetic marks after exposure of MucilAir® human bronchial epithelia to mixtures of gaseous and particulate pollutants. ePoster présenté au congrès EUROTOX 2021, Septembre 2021. [https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(21\)00794-3](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(21)00794-3).

# Sommaire

## Table des matières

I.	Introduction.....	1
II.	État des connaissances.....	7
II.1.	Pollution atmosphérique.....	9
II.1.1.	Définition de la pollution atmosphérique.....	9
II.1.2.	Pollution atmosphérique, une problématique majeure de santé publique.....	9
II.1.3.	Principales sources et principaux polluants atmosphériques.....	10
II.2.	Polluants particulaires.....	15
II.2.1.	Origine des particules atmosphériques.....	15
II.2.2.	Classification des particules atmosphériques.....	16
II.2.3.	Composition chimique des particules atmosphériques.....	17
II.2.4.	Exposition de l'Homme aux particules atmosphériques.....	18
II.2.5.	Réglementation des polluants particulaires et des polluants associés.....	23
II.3.	Impact des particules fines sur la santé.....	27
II.3.1.	Données épidémiologiques.....	27
II.3.2.	Physiopathologie de l'asthme et de la BPCO.....	28
II.4.	Données toxicologiques sur les PM2.5.....	35
II.4.1.	Modèles expérimentaux.....	35
II.4.2.	Principaux mécanismes décrits dans la toxicité des PM2.5.....	37
II.5.	Conclusion de l'état de l'art et objectifs.....	54
III.	Matériel et Méthodes.....	57
III.1.	Particules étudiées.....	59
III.1.1.	Modalités de collecte des particules.....	59
III.1.2.	Caractéristiques physico-chimiques des particules.....	62
III.1.3.	Préparation des particules pour les expositions <i>in vitro</i> .....	64

III.2.	Modèles cellulaires.....	65
III.3.	Évaluation de l'activité biologique .....	65
III.3.1.	Évaluation de l'expression génique par RT-qPCR.....	65
III.3.2.	Évaluation de la réponse inflammatoire par test ELISA.....	70
III.4.	Analyse des données.....	71
III.4.1.	Analyse des données issues des RT-qPCR.....	71
III.4.2.	Analyse des données issues tests ELISA .....	76
IV.	Résultats et discussion .....	77
IV.1.	Évaluation de l'impact de PM2.5-0.3 d'influence trafic (PMTraf) ou industrie (PMInd) sur la modulation de l'expression génique après exposition d'épithéliums bronchiques reconstruits sains ou asthmatiques. ....	79
IV.1.1.	Contexte et objectif.....	81
IV.1.2.	Matériel et Méthodes.....	81
IV.1.3.	Résultats et discussion.....	87
IV.1.4.	Conclusion.....	108
IV.2.	Impact des fractions organiques et inorganiques des PM2.5-0.3 d'influence industrie (PMInd) sur les réponses inflammatoire et métabolique de cellules épithéliales bronchiques humaines saines ou pathologiques (asthme ou BPCO).....	111
IV.2.1.	Contexte et objectif.....	113
IV.2.2.	Matériel et Méthodes.....	113
IV.2.3.	Résultats et discussion.....	116
IV.2.4.	Conclusion.....	174
IV.3.	Impact d'expositions répétées et alternées aux PM2.5-0.3 d'influence industrie (wPM) et à leurs fractions chimiques associées (O-PM et Ne-PM) sur les mécanismes cellulaires et moléculaires de cellules épithéliales bronchiques humaines saines ou pathologiques (asthme)	
IV.3.1.	Contexte et objectif.....	179
IV.3.2.	Matériel et Méthodes.....	179

IV.3.3.	Résultats .....	181
IV.3.4.	Discussion et conclusion.....	191
V.	Discussion générale .....	193
V.1.	Forces et faiblesses.....	195
V.1.1.	Modèles <i>in vitro</i> .....	195
V.1.2.	Particules fines et fractions chimiques associées.....	196
V.1.3.	Marqueurs étudiés.....	197
V.1.4.	Méthodes d'analyse de la modulation de l'expression des gènes.....	198
V.2.	Apport en termes de connaissances et potentielles implications en termes de santé publique.....	199
V.2.1.	Impact des PM2.5-0.3 selon le statut physiopathologique du donneur .....	199
V.2.2.	Impact des PM2.5-0.3 selon leur chimie.....	201
VI.	Conclusion .....	205
VII.	Perspectives de recherche .....	209
	Références bibliographiques .....	213
	Annexes.....	251



# Liste des figures

Figure 1 : L'exposome (Source: ISGlobal - Barcelona Institute for Global Health) .....	4
Figure 2 : Sources d'émission des polluants atmosphériques (Source : ATMO France).....	10
Figure 3 : Processus de formation des particules secondaires (Source : ATMO Nouvelle-Aquitaine) .....	16
Figure 4 : Exemple de composition chimique d'une particule (Source : ADEME) .....	17
Figure 5 : L'appareil respiratoire (Source : Larousse Médical).....	19
Figure 6 : Pénétration pulmonaire des particules (Source : Encyclopédie de l'environnement) ...	20
Figure 7 : Processus de dépôt des particules dans le système respiratoire (inspiré de Froehlich & Salar-Behzadi, 2014) .....	21
Figure 8 : Physiopathologie de l'asthme (issu de Pavón-Romero et al., 2021).....	31
Figure 9 : Physiopathologie de la bronchopneumopathie obstructive chronique (BPCO) (adapté de Rodrigues et al., 2021).....	32
Figure 10 : Production et élimination d'ERO suite à des expositions aux PM2.5 (inspiré de Lelieveld et al., 2021). COV, composés organiques volatils ; Q, quinones ; Fe, fer ; Cu, cuivre ; SOD, superoxyde dismutase ; Asc, ascorbate.....	38
Figure 11 : La voie de signalisation Nrf2 (inspiré de Camiña & Penning, 2022).....	40
Figure 12 : Activation de la voie de signalisation NF- $\kappa$ B par des endotoxines (inspiré de Han et al., 2020). LPS, lipopolysaccharide; LBP, LPS binding protein; I $\kappa$ B- $\alpha$ , inhibitor of NF- $\kappa$ B alpha.....	42
Figure 13 : Représentation schématique du lien entre stress oxydant et inflammation pouvant se mettre en place dans les cellules épithéliales respiratoires suite à une exposition aux PM2.5 (inspiré de Bezerra et al., 2023). ROS, espèces réactive de l'oxygène (ERO) ; RNS, espèces réactive de l'azote (ERA) ; iNOS, oxyde nitrique synthase ; EPO, peroxydase ; MPO, myeloperoxydas. ....	44
Figure 14 : La voie de signalisation AhR (issu de Shivanna et al., 2022).....	46
Figure 15 : Les principales modifications épigénétiques : A. Méthylation et hydroxyméthylation de l'ADN, B. Modifications des histones, C et D. ARN non codants (longs ARN non codants et micro-ARN) (Surace & Hedrich, 2019).....	48
Figure 16 : Organisation de la chromatine (Source : Sawakinome) .....	49



Figure 17 : Méthylation et hydroxyméthylation de la cytosine (issu de Kinde et al., 2015) .....	49
Figure 18 : Équilibre acétylation/désacétylation des histones (issu de Kazantsev & Thompson, 2008) .....	50
Figure 19 : Exemples de mécanismes se mettant en place au niveau des cellules de l'arbre respiratoire suite à des expositions aux PM2.5 .....	54
Figure 20 : Site de prélèvement de Grande-Synthe-Dunkerque.....	59
Figure 21 : Site de prélèvement de Roubaix.....	60
Figure 22 : Schéma d'un impacteur en cascade.....	61
Figure 23 : Principe de la RT-qPCR (source : Adams, 2020) .....	66
Figure 24 : Protocole d'extraction des ARN et d'obtention des ADN complémentaires .....	67
Figure 25 : Courbe d'amplification d'une réaction de PCR et détermination du Ct.....	68
Figure 26 : Principe du test ELISA (Source : R&D Systems®).....	70
Figure 27 : Représentation graphique des hypothèses statistiques H0' et H1' .....	73
Figure 28 : Représentation des différents graphes obtenus après analyse.....	75
Figure 29 : Observations microscopiques d'épithéliums humains d'origine bronchique (MucilAir™-HF) <b>A.</b> en microscopie confocale <b>B.</b> en microscopie électronique à balayage.....	82
Figure 30 : Épithélium respiratoire humain reconstruit - MucilAir™ (Source : Epithelix©).....	82
Figure 31 : Exposition du modèle Mucilair™-HF aux PM2.5-0.3.....	85
Figure 32 : Protocole d'exposition des épithéliums humains reconstruits d'origine bronchique aux PM2.5-0.3 de différentes sources d'émission (PMInd ou PMTraf).....	85
Figure 33 : Comparaison de l'expression génique basale des Epi-A CONT par rapport aux Epi-S CONT (n ≥ 23). p-value : différence significative avec les deux méthodes d'analyse ; p-value : différence significative avec la méthode classique et limite de séparation avec la méthode d'analyse par réseaux ; p-value : significativité uniquement avec la méthode classique.....	99
Figure 34 : Comparaison de l'expression génique basale d'épithéliums reconstruits à partir de cellules primaires provenant d'un même donneur mais issus de deux reconstructions différentes. <b>A.</b> Donneur sans pathologie respiratoire (Epi-S) et <b>B.</b> Donneur asthmatique (Epi-A) (n ≥ 8)..	101
Figure 35 : Comparaison de la modulation de l'expression des gènes après des expositions répétées aux PMInd par rapport aux expositions répétées aux PMTraf chez les Epi-S pour une	

concentration d'exposition de **A.** 45µg/cm<sup>2</sup> **B.** 90µg/cm<sup>2</sup> (n = 6). p-value : différence significative avec les deux méthodes d'analyse ; p-value : différence significative avec la méthode classique et limite de séparation avec la méthode d'analyse par réseaux ; p-value : significativité uniquement avec la méthode classique..... 103

Figure 36 : Comparaison de la modulation de l'expression des gènes après des expositions répétées aux PMInd par rapport aux expositions répétées aux PMTraf chez les Epi-A pour une concentration d'exposition de **A.** 45µg/cm<sup>2</sup> **B.** 90µg/cm<sup>2</sup> (n = 6). p-value : différence significative avec les deux méthodes d'analyse ; p-value : différence significative avec la méthode classique et limite de séparation avec la méthode d'analyse par réseaux ; p-value : significativité uniquement avec la méthode classique..... 105

Figure 37 : Comparaison de la modulation de l'expression génique chez Epi-S et les Epi-A après expositions répétées aux **A.** PMInd à 45µg/cm<sup>2</sup> **B.** PMTraf à 45µg/cm<sup>2</sup> **C.** PMInd à 90µg/cm<sup>2</sup> **D.** PMTraf à 90µg/cm<sup>2</sup> (n ≥ 5) ..... 107

Figure 38 : Protocole d'exposition des cellules hAECb aux wPM et à leur fractions associées.. 116

Figure 39 : Comparaison des expressions géniques à l'état basal **A.** des cellules hAECb-A Cont par rapport aux cellules hAECb-S Cont **B.** des cellules hAECb-B Cont par rapport aux cellules hAECb-S Cont **C.** des cellules hAECb-B Cont par rapport aux cellules hAECb-A Cont. n ≥ 10 pour chacun des groupes étudiés. p-value : différence significative avec les deux méthodes d'analyse ; p-value : différence significative avec la méthode classique et limite de séparation avec la méthode d'analyse par réseaux ; p-value : significativité uniquement avec la méthode classique. .... 165

Figure 40 : Comparaison de l'expression génique entre les conditions T<sub>DMSO</sub> et Cont chez les hAECb-S (**A** et **D**), hAECb-A (**B** et **E**) et hAECb-B (**C** et **F**) après 6h (**A**, **B** et **C**) ou 24h (**D**, **E** et **F**) d'exposition. n ≥ 5 pour chacun des groupes étudiés..... 167

Figure 41 : Évaluation de la modulation de l'expression des gènes chez les hAECb-S suite à des expositions aux wPM, à O-PM, à NE-PM ou aux recPM à des concentrations de 3 ou 6 µg/cm<sup>2</sup> pendant 6 ou 24h. n ≥ 3 pour chacun des groupes étudiés..... 170

Figure 42 : Évaluation de la modulation de l'expression des gènes chez les hAECb-A suite à des expositions aux wPM, à O-PM, à NE-PM ou aux recPM à des concentrations de 3 ou 6 µg/cm<sup>2</sup> pendant 6 ou 24h. n ≥ 3 pour chacun des groupes étudiés..... 172

Figure 43 : Évaluation de la modulation de l'expression des gènes chez les hAECb-B suite à des expositions aux wPM, à O-PM, à NE-PM ou aux recPM à des concentrations de 3 ou 6 µg/cm <sup>2</sup> pendant 6 ou 24h. n ≥ 3 pour chacun des groupes étudiés.....	174
Figure 44 : Protocole d'exposition des cellules hAECb aux wPM ou à leurs fractions associées	180
Figure 45 : Comparaison des expressions géniques à l'état basal des cellules hAECb-A Cont par rapport aux cellules hAECb-S Cont. n ≥ 8 pour chacun des groupes étudiés. ....	181
Figure 46 : Évaluation de la modulation de l'expression des gènes suite à des expositions de cellules hAECb-S1 <b>A.</b> aux wPM, <b>B.</b> à Ne-PM ou <b>C.</b> à O-PM <b>1.</b> après une première exposition de 24h heures (E1) <b>2.</b> après une exposition de 24 heures suivie d'une période de 24 heures de repos (E1R1) <b>3.</b> après une seconde exposition de 24h heures (E2R1) <b>4.</b> après une seconde exposition de 24 heures suivie d'une période de 24 heures de repos (E2R2). n ≥ 3 pour chacun des groupes étudiés. ...	183
Figure 47 : Évaluation de la modulation de l'expression des gènes suite à des expositions de cellules hAECb-S2 <b>A.</b> aux wPM, <b>B.</b> à Ne-PM ou <b>C.</b> à O-PM <b>1.</b> après une première exposition de 24h heures (E1) <b>2.</b> après une exposition de 24 heures suivie d'une période de 24 heures de repos (E1R1) <b>3.</b> après une seconde exposition de 24h heures (E2R1) <b>4.</b> après une seconde exposition de 24 heures suivie d'une période de 24 heures de repos (E2R2). n ≥ 3 pour chacun des groupes étudiés. ...	185
Figure 48 : Évaluation de la modulation de l'expression des gènes suite à des expositions de cellules hAECb-A1 <b>A.</b> aux wPM, <b>B.</b> à Ne-PM ou <b>C.</b> à O-PM <b>1.</b> après une première exposition de 24h heures (E1) <b>2.</b> après une exposition de 24 heures suivie d'une période de 24 heures de repos (E1R1) <b>3.</b> après une seconde exposition de 24h heures (E2R1) <b>4.</b> après une seconde exposition de 24 heures suivie d'une période de 24 heures de repos (E2R2). n ≥ 3 pour chacun des groupes étudiés. ...	187
Figure 49 : Évaluation de la modulation de l'expression des gènes suite à des expositions de cellules hAECb-A2 <b>A.</b> aux wPM, <b>B.</b> à Ne-PM ou <b>C.</b> à O-PM <b>1.</b> après une première exposition de 24h heures (E1) <b>2.</b> après une exposition de 24 heures suivie d'une période de 24 heures de repos (E1R1) <b>3.</b> après une seconde exposition de 24h heures (E2R1) <b>4.</b> après une seconde exposition de 24 heures suivie d'une période de 24 heures de repos (E2R2). n ≥ 3 pour chacun des groupes étudiés. ...	189
Figure 50 : Hypothèse du mécanisme pouvant se mettre en place suite aux expositions des épithéliums bronchiques reconstruits aux PM2.5-0.3, expliquant l'inhibition de l'expression de CXCL10.....	202
Figure 51 : Contribution de ces travaux de thèse à la connaissance de l'exposome. ....	207

# Liste des tableaux

Tableau I : Les principaux polluants atmosphériques surveillés et/ou réglementés en France ....	12
Tableau II : Valeurs de gestion des polluants particulaires atmosphériques en Europe et en France et recommandation de l’OMS (Sources : Airparif et OMS) .....	24
Tableau III : Valeurs de gestion des éléments métalliques en France et en Europe (Source : Airparif) .....	25
Tableau IV : Liste des 16 HAP classés prioritaires par l’US-EPA.....	26
Tableau V : Caractéristiques des stations de mesure.....	60
Tableau VI : Niveau d’hydrocarbures aromatiques polycycliques en µg/g quantifiés dans les PM Traf et les PM Ind .....	62
Tableau VII : Niveau de composés hydrocarbonés en µg/g quantifiés dans les PM Traf et les PM Ind.....	63
Tableau VIII : Teneur en métaux totaux en µg/g quantifiés dans les PM Traf et les PM Ind .....	64
Tableau IX : Gènes de référence et gènes d’intérêt : amorces utilisées pour la réalisation des qPCR .....	69
Tableau X : Caractéristiques des donneurs et informations sur les reconstructions des épithéliums humains d’origine bronchique (MucilAir™-HF). Les certificats d’analyse ont été fournis par Epithelix©.....	84
Tableau XI : Évaluation de l’intégrité tissulaire par la mesure de la résistance transmembranaire des épithéliums (TEER), chez le groupe CONT et chez les groupes exposés, avant exposition et après 1, 2 et 3 semaines d’exposition.....	87
Tableau XII : Informations sur les cellules épithéliales humaines d’origine bronchique (hAECb) et caractéristiques des donneurs. Les certificats d’analyse ont été fournis par Epithelix©.....	114
Tableau XIII : Informations sur les cellules épithéliales humaines d’origine bronchique (hAECb) et caractéristiques des donneurs. Les certificats d’analyse ont été fournis par Epithelix©. ....	179



# Liste des abréviations

**16HBE** *Human Bronchial Epithelial cell line*, Lignée de cellules épithéliales bronchiques humaines

**3R** *Replace, Reduce, Refine*, Remplacer, Réduire, Raffiner

**8-OHdG** 8-hydroxy-déoxyguanosine

## A

**ADN** Acide Déoxyribonucléique

**ADNc** ADN complémentaire

**AhR** *Aryl hydrocarbon Receptor*, Récepteur d'aryl hydrocarbure

**ALI** *Air-Liquid Interface*, Interface air-liquide

**Anses** Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

**ARE** *Antioxidant Responsive Element*, Élément de réponse aux antioxydants

**ARN** Acide Ribonucléique

**ARNT** *Aryl hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator*, Translocateur nucléaire du récepteur d'aryl hydrocarbure

## B

**BEAS-2B** *Bronchial Epithelium transformed with Ad12-SV40 2B*, Lignée de cellules épithéliales bronchiques humaines transformées avec l'adénovirus 12-SV40-2B

**BPCO** Bronchopneumopathie Obstructive Chronique

## C

**CAT** Catalase

**CCL** *Chemokine CC Ligand*, Ligand de chimiokine CC

**CIRC** Centre International de Recherche contre le Cancer

**CMR** Cancérogène, Mutagène, Reprotoxique

**CO** Monoxyde de carbone

**CO<sub>2</sub>** Dioxyde de carbone

**Cont** Contrôle

**COV** Composés Organiques Volatils

**Ct** *Cycle threshold*, Cycle seuil

**Cul3** Cullin 3

**CV** Coefficient de Variation

**CXCL** *C-X-C motif chemokine Ligand*, Ligand de chimiokine à motif C-X-C

**CYP450** Cytochrome P450

## **D**

**Dae** Diamètre aérodynamique équivalent

**DMSO** Diméthyl Sulfoxyde

**DNMT** *DNA Methyltransferase*, ADN méthyltransférases

## **E**

**EGF** *Epidermal Growth Factor*, Facteur de croissance épidermique

**ELISA** *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*, Dosage immunoenzymatique

**Epi-A** Épithélium reconstruit à partir de cellules prélevées épithéliales bronchiques humaines prélevées chez un donneur asthmatique

**Epi-S** Épithélium reconstruit à partir de cellules prélevées épithéliales bronchiques humaines prélevées chez un donneur sans pathologie respiratoire

**ERA** Espèces Réactives de l'Azote

**ERO** Espèces Réactives de l'Oxygène

## **G**

**GM-CSF** *Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor*, Facteur de stimulation des colonies de granulocytes et de macrophages

**GPx** Glutathion Peroxydase

**GSH** Glutathion

**GSTM1** Glutathion S-Transférase Mu 1

**GSTP1** Glutathion S-Transférase P1

## **H**

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** Peroxyde d'hydrogène

**hAEC** *human Airway Epithelial Cell*, Cellules épithéliales primaires des voies respiratoire humaines

**hAECb-A** Cellules épithéliales humaines d'origine bronchique issues d'un donneur asthmatique

**hAECb-B** Cellules épithéliales humaines d'origine bronchique issues d'un donneur atteint de BPCO

**hAECb-S** Cellules épithéliales humaines d'origine bronchique issues d'un donneur sans pathologie respiratoire

**HAP** Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques

**HAT** Histone Acétyltransférase

**HDAC** Histone Desacétylase

**HDM** Histone Déméthylase

**HMT** Histone Methyltransférase

**HO-1 ou HMOX1** Hème oxygénase 1

**Hsp90** *Heat shock protein 90 kDa*, Protéine de choc thermique 90 kDa

## **I**

**ICAM-1** *Intercellular Adhesion Molecule-1*, Molécule d'adhérence intercellulaire-1

**ILC** *Innate Lymphoid Cells*, Cellules lymphoïdes innées

**IgE** Immunoglobuline E

**IL** Interleukine

**IFN- $\gamma$**  Interféron-gamma

## **K**

**Keap1** *Kelch-like ECH-associated protein 1*, Protéine associée à la protéine ECH de type Kelch 1

## **M**

**MBP** *Major Basic Protein*, Protéine Basique Majeure

**MDA** Malondialdéhyde

**MUC** Mucine

## **N**

**Ne-PM** Fraction non extractible des PM<sub>2.5-0.3</sub>

**NF- $\kappa$ B** *Nuclear Factor-kappa B*, Facteur nucléaire-kappa B

**NHBE** *Normal Human Bronchial Epithelial cells*, Cellules épithéliales bronchiques humaines normales

**NO<sub>x</sub>** *Nitrogen Oxides*, oxydes d'azote

**Nrf2** *Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2*, Facteur nucléaire 2 (dérivé des érythroïdes) de type 2

## **O**

**O<sub>2</sub>** Dioxygène

**O<sup>2-</sup>** Anion superoxyde

**O<sub>3</sub>** Ozone

**OH<sup>°</sup>** Radical hydroxyde

**OMS** Organisation Mondiale de la santé

**O-PM** Fraction organique extraite des PM<sub>2.5-0.3</sub>

## **P**

**PM** *Particulate Matter*, Matière particulaire

**PM<sub>2.5-0.3</sub>** Particules fines



**PMInd** PM2.5-0.3 d'influence industrie

**PMTraf** PM2.5-0.3 d'influence trafic

## **R**

**Rbx1** *Ring-box 1*, Protéine de la boîte en anneau 1

**recPM** *Recombined PM2.5-0.3*, PM2.5-0.3 reconstituées

**RQ** *Relative Quantification*, Quantification relative

**RT-qPCR** *Reverse Transcription quantitative Polymerase Chain Reaction*, Réaction de polymérisation en chaîne quantitative après transcription inverse

## **S**

**sMaf** *small Musculoaponeurotic fibrosarcoma*

**SO<sub>2</sub>** Dioxyde de soufre

**SOD** Superoxyde Dismutase

## **T**

**TEER** *Transepithelial Electrical Resistance*, Résistance électrique transépithéliale

**TET** *Ten-Eleven Translocation methylcytosine dioxygenase*

**TGF- $\beta$**  *Transforming Growth Factor-beta*, Facteur de croissance transformant beta

**TLR** *Toll Like Receptor*, Récepteur de type Toll

**T<sub>DMSO</sub>** Témoin DMSO

**TMil** Témoin Milieu

**TNF- $\alpha$**  *Tumor Necrosis Factor-alpha*, Facteur de nécrose tumorale alpha

**TRXR1** Thioredoxine Reductase 1

**TSLP** *Thymic Stromal Lymphopoietin*, Lymphopoïétine thymique stromale

## **U**

**US-EPA** *United States Environmental Protection Agency*, Agence américaine de protection de l'environnement

## **W**

**wPM** *whole PM2.5-0.3*, PM2.5-0.3 « totales »

## **X**

**XAP2** *hepatitis X-associated protein-2*, Protéine associée à l'hépatite X-2

# I. Introduction

---



Au cours de ces dernières décennies, de nombreux travaux ont été menés afin d'étudier la contribution de déterminants génétiques dans la survenue de maladies chroniques comme l'obésité, les diabètes, les cancers, les maladies neurodégénératives, cardio-vasculaires et respiratoires dont l'asthme. Si ces approches constituent une avancée considérable pour identifier des facteurs de risque de pathologies chroniques, il est maintenant reconnu que le génome ne peut en expliquer qu'une petite part. Les scientifiques se sont alors intéressés à l'autre partie de l'équation qui correspond aux facteurs environnementaux au sens très large, c'est-à-dire à tout ce qui n'est pas génétique. Polluants atmosphériques, substances chimiques, radiations, bruit, contaminants biologiques, etc. sont en effet, autant de facteurs environnementaux influençant notre vie de tous les jours, susceptibles de conduire, à plus ou moins long terme, à ces pathologies.

C'est dans ce contexte que le concept d'exposome a été développé en 2005 par Christopher P. Wild, afin de souligner l'importance d'une meilleure prise en compte des facteurs non génétiques dans la survenue des maladies chroniques (Wild, 2005). C. P. Wild définit l'exposome comme « *la totalité des expositions auxquelles un individu est soumis de la conception à la mort. C'est une représentation complexe et dynamique des expositions auxquelles une personne est sujette tout au long de sa vie, intégrant l'environnement chimique, microbiologique, physique, récréatif, médicamenteux, le style de vie, l'alimentation, ainsi que les infections* ». Il faut reconnaître que les épidémiologistes, communauté scientifique dont fait partie C.P. Wild, avaient anticipé cette notion d'exposome depuis plusieurs années en explorant simultanément, lors d'études en population, de nombreuses expositions en considérant différents facteurs relatifs aux conditions de vie (alimentation, habitat, accès aux soins, réseau social, etc.), à l'environnement (conditions de travail, expositions professionnelles et environnementales, etc.), et à l'état de santé (états précliniques, chronologie des phénomènes pathologiques). De même, depuis plus de 20 ans, les évaluations des risques chimiques en milieu professionnel renseignaient l'exposome, sans le savoir.

Outre l'exposition provenant de sources exogènes, les processus biologiques endogènes, tels que l'inflammation, l'immunité, le stress oxydant peuvent également déclencher des processus pathologiques (Rappaport, 2011). En 2012, C.P. Wild (Wild, 2012) puis Miller et Jones en 2014 (Miller & Jones, 2014) ont précisé le concept d'exposome en définissant les notions d'environnement externe général, se référant aux expositions partagées (pollution de l'air, environnement urbain-rural, facteurs sociaux, etc.); d'environnement externe spécifique, renvoyant aux expositions spécifiques à chaque individu (alimentation, activité physique, tabac, profession, etc.); et d'environnement interne, comprenant les processus biochimiques qui se déroulent dans l'organisme (toxico-cinétique/toxico-dynamique) spécifiques à chaque individu (ethnie, âge, sexe, état de santé, polymorphismes génétiques, etc.) (Figure 1). Des interactions

complexes existent entre ces trois domaines, l'environnement externe, qu'il soit général ou spécifique, semble influencer l'environnement interne par induction d'altérations métaboliques, génétiques, épigénétiques, etc. contribuant ainsi au développement de maladies chroniques, dont l'asthme.

De nombreuses contributions venant de la chimie analytique, la toxicologie, la biologie systémique, l'épidémiologie, les mathématiques, la modélisation, les sciences sociales, etc. ont permis, et permettront, de préciser ces interactions qui, aujourd'hui, occupent une place importante dans le champ de la recherche Environnement-Santé. C'est dans ce contexte que le terme d'exposome a

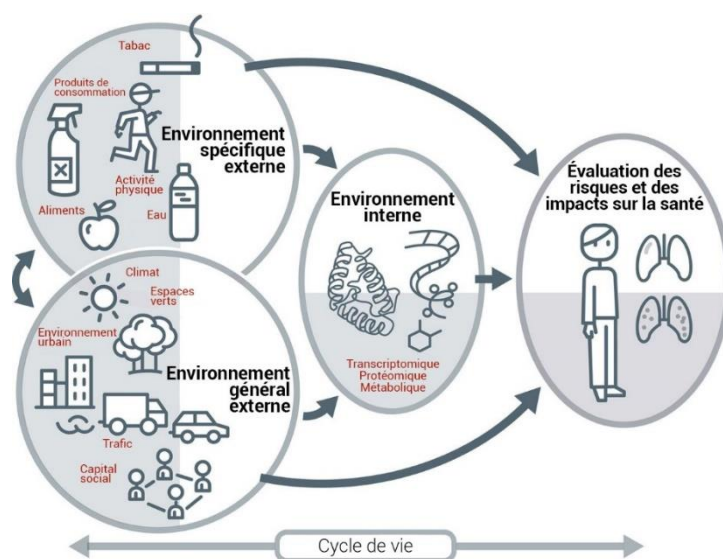


Figure 1 : L'exposome (Source: ISGlobal - Barcelona Institute for Global Health)

été diffusé dans le débat public par son introduction dans le troisième plan national santé environnement (PNSE3 – 2015-2019) pour permettre « une nouvelle approche de la santé environnementale » puis dans le PNSE4 (2021-2025) avec la volonté de « mieux connaître l'exposome ». Il a également été intégré dans la loi de modernisation de notre système de santé (loi 2016-41 du 26 janvier 2016).

Ainsi, en raison de son impact significatif sur la santé humaine, l'exposome s'est révélé être un domaine de recherche crucial, qui a pour défi majeur d'améliorer la compréhension des liens entre les expositions prises dans leur ensemble, et leurs impacts sur la santé humaine, pour établir des liens de causalité dans le but d'avoir un outil d'aide à la décision (H. Wu et al., 2023).

Cependant, et c'est ce qui fait la complexité de cette recherche, l'exposome est très variable et dynamique. Plusieurs déclinaisons apparaissent comme « Exposome chimique », « Exposome urbain », « Exposome et Changement climatique », « Exposome et Pathologie », « Exposome et

Toxicologie». Si la toxicologie environnementale a progressivement évolué vers une approche mécanistique fondée sur une meilleure connaissance de la physiologie et sur une exploration systémique des effets des polluants, il y a encore trop peu d'études *in vitro* permettant une telle démarche.

Parmi les facteurs environnementaux qui composent l'exposome, la pollution atmosphérique émerge comme l'un des éléments les plus inquiétants, par la présence de multiple polluants et d'allergènes, qui représentent un facteur de risque de nombreuses pathologies cardiovasculaires, neurodégénératives, métaboliques mais aussi respiratoires comme l'asthme. Parmi les polluants atmosphériques gazeux, le dioxyde d'azote (NO<sub>2</sub>), le dioxyde de soufre (SO<sub>2</sub>) ou l'ozone (O<sub>3</sub>), sont connus pour avoir un impact irritatif important sur la muqueuse respiratoire, de par leurs propriétés oxydantes, favorisant ainsi la mise en place d'une réaction inflammatoire et une hypersensibilité bronchique. Les particules fines (PM<sub>2.5</sub>), qui nous intéressent plus particulièrement dans ce travail de recherche, constituent l'un des polluants atmosphériques les plus préoccupants d'un point de vue sanitaire. Elles sont considérées comme un mélange complexe par la présence d'un grand nombre de substances chimiques adsorbées à leur surface, comme les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), mais aussi de substances immunogènes (spores fongiques, pollens), et sont fortement associées au développement et à l'exacerbation de l'asthme.

Ainsi, dans le cadre de cette thèse, je m'efforcerai de prendre part à cette recherche sur l'exposome, à l'aide d'une approche expérimentale *in vitro* mettant en scène des cellules épithéliales bronchiques humaines issues de donneurs de statut physiopathologique différent et de l'application d'une méthode statistique originale pour analyser les données d'expression génique obtenues après expositions des cellules aux particules fines et à leurs fractions chimiques associées.

Ce manuscrit de thèse, construit sur publication, se décomposera en un état des connaissances, suivi d'un matériel et méthodes commun aux différentes études mises en œuvre au cours de ce travail de recherche. Puis les trois études expérimentales seront abordées par la présentation des articles associés, suivis de résultats complémentaires. Enfin une discussion générale, faisant apparaître les forces et les faiblesses de ce travail, ainsi que les apports tant au niveau des connaissances qu'au niveau des implications en termes de santé publique, sera développée. Ce manuscrit se terminera par une conclusion et des perspectives de recherche.



## II. État des connaissances

---





## II.1. Pollution atmosphérique

Cette première partie de l'état des connaissances vise à fournir une vue d'ensemble des aspects généraux de la pollution atmosphérique. Après avoir rappelé la définition de la pollution atmosphérique et son impact en termes de santé publique, les principales sources et les principaux polluants atmosphériques seront présentés.

### II.1.1. Définition de la pollution atmosphérique

La pollution atmosphérique est définie dans l'article 2 de la loi n° 96-1236 du 30 décembre 1996 sur l'air et l'utilisation rationnelle de l'énergie comme « l'introduction par l'Homme, directement ou indirectement, dans l'atmosphère et les espaces clos, de substances ayant des conséquences préjudiciables de nature à mettre en danger la santé humaine, à nuire aux ressources biologiques et aux écosystèmes, à influencer sur les changements climatiques, à détériorer les biens matériels, à provoquer des nuisances olfactives excessives ». Un polluant atmosphérique quant à lui est défini par la directive 2008/50/CE du parlement européen et du conseil européen comme « toute substance présente dans l'air ambiant et susceptible d'avoir des effets nocifs sur la santé humaine et/ou sur l'environnement dans son ensemble ».

### II.1.2. Pollution atmosphérique, une problématique majeure de santé publique

La pollution atmosphérique est une menace majeure pour la santé de l'Homme. La quasi-totalité de la population mondiale respire un air avec des quantités de polluants dépassant les limites recommandées par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS). L'exposition aux polluants atmosphériques est plus forte dans les pays à revenu faible ou intermédiaire que dans les pays à revenus élevés (OMS, 2023b).

En 2020, il a été estimé que la pollution de l'air à l'intérieur des habitations a été responsable d'environ 3,2 millions de décès dans le monde, dont plus de 237 000 décès d'enfants de moins de 5 ans (OMS, 2022a). Parallèlement, la pollution de l'air ambiant (pollution de l'air extérieur) a causé environ 4,2 millions de décès prématurés au niveau mondial (OMS, 2022b). Ainsi, la combinaison des effets de la pollution de l'air intérieur et de l'air extérieur est associée à environ 7 millions de décès prématurés chaque année à l'échelle mondiale.

En France, la pollution de l'air extérieur est responsable, (Ministère de la Transition écologique et de la Cohésion des Territoire & Ministère de la Transition énergétique, 2023), de 48 000 décès

prématurés par an, ce qui correspond à 9% de la mortalité. Le coût annuel total de la pollution de l'air (extérieur et intérieur) est estimé à 100 milliards d'euros dont une large part est liée aux coûts de santé.

### II.1.3. Principales sources et principaux polluants atmosphériques

Les polluants atmosphériques sont émis dans l'atmosphère par diverses sources, qui peuvent être naturelles, telles que l'érosion, les volcans, les embruns marins, les feux de forêts, etc. , ou anthropiques, c'est-à-dire émis par des activités humaines telles que l'industrie, l'agriculture, les transports (routiers, aériens, maritimes), les sources résidentielles, etc. (Pan et al., 2022).

Les principaux polluants atmosphériques sont les oxydes d'azote (NOx), le dioxyde de soufre (SO<sub>2</sub>), les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), le monoxyde de carbone (CO), les composés organiques volatils (COV), l'ozone (O<sub>3</sub>), les métaux, les particules (PM), ainsi que les contaminants biologiques (pollens, mycotoxines, etc.).

La Figure 2 présente des exemples de sources d'émission ainsi que les principaux polluants associés à chacune d'entre elles.



Figure 2 : Sources d'émission des polluants atmosphériques (Source : ATMO France)

Les polluants atmosphériques peuvent être classés selon :

- **leur état** (solide, liquide, gazeux). Le plus souvent, les polluants atmosphériques se présentent sous forme gazeuse ( $O_3$ ,  $NO_x$ ,  $SO_2$ , CO, COV, etc.).
- **leur origine** (polluants primaires et polluants secondaires). Les polluants primaires résultent de sources de pollution directes, telles que le trafic (routier, maritime, aérien, etc.), les industries, le chauffage ou encore l'agriculture ( $NO_x$ ,  $SO_2$ , HAP, COV, métaux, etc.). En revanche, les polluants secondaires ne sont pas émis directement dans l'air, mais résultent de réactions chimiques entre différents gaz ou de réactions photochimiques ( $O_3$ , etc.) (Airparif, 2021b). Certains polluants, tels que le dioxyde d'azote ( $NO_2$ ) et les particules, peuvent être à la fois des polluants primaires et secondaires, car leur présence dans l'atmosphère résulte à la fois d'émissions directes et de réactions chimiques.
- **leur nature chimique**. Ainsi, on distingue les polluants inorganiques ( $O_3$ ,  $NO_x$ ,  $SO_2$ , métaux, etc.) des polluants organiques (CO, COV, HAP, etc.). Les polluants particulaires, quant à eux, sont un mélange de polluants inorganiques et organiques.

Les principaux polluants atmosphériques surveillés et réglementés en France sont résumés dans le Tableau I qui récapitule leur origine, leur nature chimique et leur impact sur la santé. La réglementation spécifique relative à ces polluants est détaillée en Annexe 1.

Tableau I : Les principaux polluants atmosphériques surveillés et/ou réglementés en France

\*CIRC : Centre International de Recherche contre le Cancer

Polluant	État	Origine	Nature chimique	Impact sur la santé
Ozone (O <sub>3</sub> )	Gazeux	Polluant secondaire résultant de la transformation photochimique de l'O <sub>2</sub> au contact de polluants primaires tels que les NO <sub>x</sub> ou les COV, en présence de rayonnements ultraviolets solaires et d'une température élevée (Lu et al., 2019).	Inorganique	Troubles respiratoires : crises d'asthme, réduction de la fonction pulmonaire, développement de maladies respiratoires, etc. (Nuvolone et al., 2018).
Oxydes d'azote (NO <sub>x</sub> )	Gazeux	Polluants primaires (NO et NO <sub>2</sub> ) issus de sources d'émission anthropiques (combustion, industries, agriculture, etc.) ou naturelles (volcans, éclairs, transformation de l'azote du sol, etc.) <u>OU</u> Polluants secondaires (NO <sub>2</sub> ) résultant de la réaction entre le NO et l'O <sub>2</sub> , l'O <sub>3</sub> , ou espèces radicalaires présentes dans l'atmosphère (Kimbrough et al., 2017).	Inorganique	Troubles respiratoires : sensibilité accrue des bronches aux infections, hyperréactivité, réduction de la fonction pulmonaire, etc. (Boningari & Smirniotis, 2016).
Dioxyde de soufre (SO <sub>2</sub> )	Gazeux	Polluant primaire issu principalement de la combustion d'énergies fossiles (fioul, charbon, lignite, gazole, etc.) mais pouvant également provenir de sources d'émission anthropiques de type industriel (production d'acide sulfurique, production de pâte à papier, raffinage du pétrole, etc.) ou de sources naturelles (éruptions volcaniques, décomposition de matière organique) (Pénard-Morand & Annesi-Maesano, 2004).	Inorganique	Difficultés respiratoires, œdème pulmonaire, crises d'asthme, irritation des yeux, maladies cardio-respiratoires, etc. (Khaniabadi et al., 2017).
Éléments majeurs et traces métalliques	Solide	Polluants primaires issus de sources d'émission naturelles (érosion, éruption volcanique, feu de forêt) ou anthropiques, principalement liées aux activités métallurgiques (extraction minière, fonte, fonderies, etc.), et aux transports (principalement le trafic routier) (Briffa et al., 2020).	Inorganique	Troubles respiratoires (arsenic, et nickel), troubles cardiovasculaires (arsenic, nickel, plomb), effets sur le système nerveux (arsenic, cadmium, plomb), altérations de la fonction rénale (cadmium, plomb), etc.  Certains de ces éléments métalliques, comme l'arsenic, le cadmium et le nickel, sont classés cancérogènes certains pour l'Homme (groupe 1 du CIRC*) (Briffa et al., 2020).

<b>Polluant</b>	<b>État</b>	<b>Origine</b>	<b>Nature chimique</b>	<b>Impact sur la santé</b>
Monoxyde de carbone (CO)	Gazeux	Polluant primaire issu de combustions incomplètes de nombreux combustibles (bois, butane, charbon, essence, fuel, gaz naturel, pétrole, propane, etc.). Les principales sources d'émission de CO en milieu extérieur sont le trafic routier et les activités industrielles. Les principales sources en milieu intérieur sont les cuisinières à gaz, les feux de bois, la fumée de cigarette, etc. (Chenoweth et al., 2021; Fazlzadeh et al., 2015).	Organique	Maux de tête, faiblesse, étourdissements, nausées, tachycardie, tachypnée voire, dans les cas les plus grave, coma ou mort (Hanley & Patel, 2023).
Composés organiques volatils	Gazeux	Polluants primaires issus de sources d'émission naturelles (feux de forêt, transformation de précurseurs biogéniques etc.) ou anthropiques (activités pétrochimiques, solvants, peintures, trafic, agriculture, etc.) (Montero-Montoya et al., 2018).	Organique	Irritation des yeux, du nez, de la gorge et des muqueuses (Gibb, 2013). Certains COV tels que le benzène et le formaldéhyde sont classés cancérigènes certains pour l'Homme (groupe 1 du CIRC*).
Hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP)	Répartition entre une phase gazeuse et une phase particulaire	Polluants primaires principalement issus de sources d'émission anthropiques (émissions domestiques, trafic, activités industrielles) mais pouvant également être issus de sources naturelles (feux de forêts et éruptions volcaniques) (Cecinato et al., 2014).	Organique	Plusieurs HAP sont reconnus comme étant des substances cancérigènes, mutagènes et reprotoxiques (CMR). Parmi eux, le benzo(a)pyrène est classé cancérigène certain pour l'Homme (groupe 1 du CIRC*) (Abdel-Shafy & Mansour, 2016).
Polluants particulaires	Particulaire	Polluants primaires issus de source d'émission naturelles (éruptions volcaniques, poussière de sol, embruns marins, etc.) ou anthropiques (activités industrielles, trafic, chauffage domestique, etc.) <u>ou</u> Polluants secondaires formées à partir de précurseurs gazeux présents dans l'atmosphère, tels que les oxydes de soufre et d'azote, les COV, etc. (Pan et al., 2022).	Mélange de composés organiques et inorganiques	Troubles respiratoires, cardiovasculaires, augmentation du risque de cancer, etc. (Thompson, 2018).



## II.2. Polluants particulaires

Parmi les divers polluants présents dans l'atmosphère, notre attention se portera plus particulièrement sur les polluants particulaires. Les particules en suspension dans l'air constituent un mélange complexe et hétérogène de composés organiques et inorganiques. Leurs caractéristiques physico-chimiques, conditionnant leur impact sanitaire, dépendent principalement de leurs sources d'émission, qu'elles soient d'origine naturelle ou anthropique.

Dans cette deuxième partie de l'état des connaissances, l'origine des particules atmosphériques ainsi que leurs principales caractéristiques physico-chimiques seront présentées. Puis, les modalités d'exposition de l'Homme à ces polluants, ainsi que leurs impacts sur la santé humaine et leur réglementation seront abordés.

### II.2.1. Origine des particules atmosphériques

Les polluants particulaires peuvent être des polluants primaires ou secondaires. Les particules primaires sont directement émises dans l'atmosphère, sous forme liquide ou solide, par des sources naturelles (éruptions volcaniques, poussières de sol, embruns marins, etc.) ou anthropiques (activités industrielles, trafic, chauffage domestique, etc.), sans subir de modification chimique ou physique depuis leur émission. En revanche, les particules secondaires sont formées à partir de précurseurs gazeux présents dans l'atmosphère, tels que les oxydes de soufre et d'azote, les composés organiques volatils, etc. Les réactions chimiques impliquées dans leur formation comprennent la nucléation, la condensation et la coagulation (Figure 3). La nucléation consiste en la conversion de gaz présents dans l'atmosphère en particules, soit directement (gaz-solide), soit par l'intermédiaire de gouttes d'eau. La condensation, quant à elle, implique la condensation de molécules gazeuses sur les particules nouvellement formées, augmentant ainsi leur diamètre aérodynamique (paramètre intégrant à la fois la taille, la densité et la forme des particules) tout en conservant leur nombre. Enfin, la coagulation correspond au processus d'agrégation des particules entre elles, entraînant une augmentation de leur diamètre aérodynamique et une diminution de leur nombre (Pan et al., 2022).



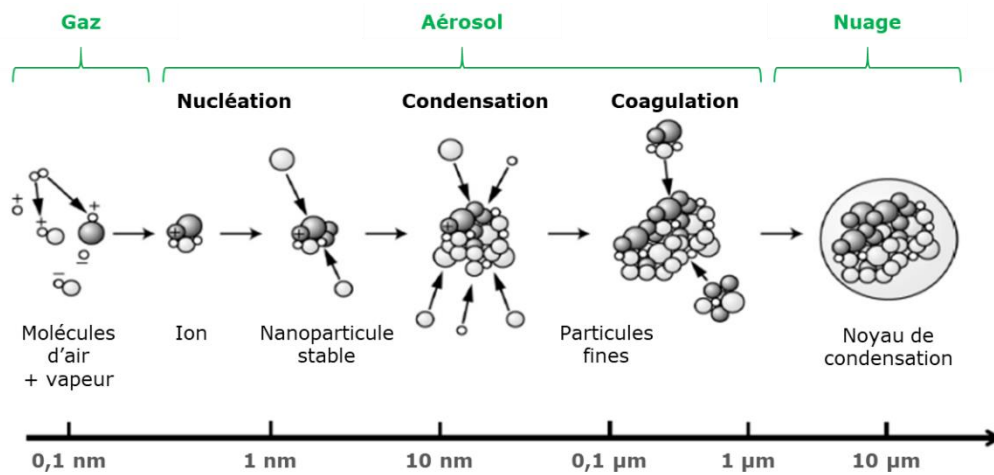


Figure 3 : Processus de formation des particules secondaires (Source : ATMO Nouvelle-Aquitaine)

## II.2.2. Classification des particules atmosphériques

La classification la plus utilisée pour les particules est basée sur des critères de taille. Les particules n'étant pas toutes sphériques, leur taille ne peut pas être définie en fonction de leur diamètre. Par conséquent, le diamètre aérodynamique équivalent (D<sub>ae</sub>) est utilisé. Il est défini comme le diamètre d'une sphère ayant la même vitesse de chute que la particule et une masse volumique égale à 1 g.cm<sup>-3</sup>. Le D<sub>ae</sub> est un paramètre applicable à toutes les particules, quelle que soit leur forme. Ainsi, les particules, nommées *Particulate Matter* (PM) peuvent être classées de la façon suivante (Mühlfeld et al., 2008) :

- PM<sub>10</sub> : particules dont le D<sub>ae</sub> est inférieur à 10 μm, dites « particules grossières » ;
- PM<sub>2.5</sub> : particules dont le D<sub>ae</sub> est inférieur à 2,5 μm, dites « particules fines » ;
- PM<sub>1</sub> : particules dont le D<sub>ae</sub> est inférieur à 1 μm, dites « particules très fines » ;
- PM<sub>0.1</sub> : particules dont le D<sub>ae</sub> est inférieur à 0,1 μm, dites « particules ultrafines ».

La taille est une caractéristique importante des particules car elle détermine leur surface spécifique. Ce paramètre désigne le rapport de la superficie de la surface réelle d'une particule sur sa quantité de matière (sa masse), rendant les contaminants chimiques et biologiques plus ou moins accessibles à la surface des particules. Plus les particules sont petites, plus leur surface spécifique augmente, ce qui accroît leur réactivité (Duffin et al., 2007; Hussain et al., 2009).

### II.2.3. Composition chimique des particules atmosphériques

La composition chimique des particules est très variée, dépendant des sources d'émission et des évolutions qu'elles peuvent subir dans l'atmosphère. De manière générale, les particules sont composées d'un noyau carboné sur lequel s'adsorbent différents éléments chimiques tels que des HAP, des métaux, des sulfates, des quinones, etc., ainsi que des contaminants biologiques tels que des moisissures, des pollens, des virus, etc. (Finlayson-Pitts et al., 2020; Pemelet-Joly, 2008) (Figure 4).

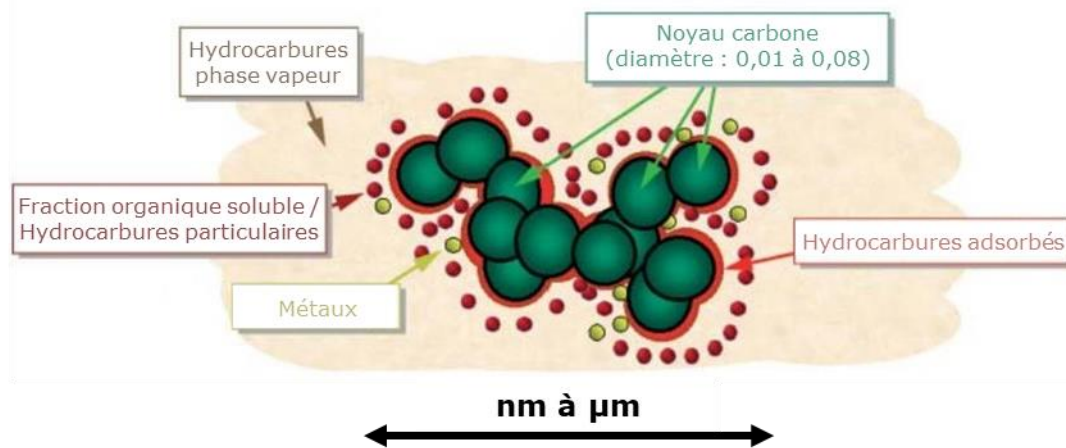


Figure 4 : Exemple de composition chimique d'une particule (Source : ADEME)

Parmi les différents composés retrouvés dans la composition chimique des particules, un intérêt particulier sera porté aux métaux (éléments majeurs et traces métalliques) et aux HAP.

#### II.2.3.1. Éléments majeurs et traces métalliques

La plupart des métaux sont des éléments constitutifs de la croûte terrestre. Il s'agit de polluants primaires dont les sources d'émission peuvent être naturelles (érosion, éruption volcanique, feu de forêt) ou anthropiques, principalement liées aux activités métallurgiques (extraction minière, aciérie, transformation manufacturière...), aux combustions (production énergétique ou incinération de déchets) et aux transports (notamment au trafic routier) (Briffa et al., 2020).

#### II.2.3.2. Hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP)

Les HAP constituent une classe de polluants primaires composée d'atomes de carbone et d'hydrogène, caractérisée par la présence d'au moins deux cycles aromatiques (benzéniques) dans

leur structure. Ces composés résultent de processus de combustion incomplète de matières organiques.

Bien que les HAP puissent être émis par des sources naturelles (10% du total des émissions) telles que les feux de forêts et les éruptions volcaniques, la majorité des émissions (90%) sont d'origine anthropique. Les sources d'origine humaine englobent diverses activités, telles que les émissions domestiques (chauffage individuel, fumée de cigarette, aliments grillés ou fumés), les émissions liées au trafic (routier, ferroviaire, maritime et aérien), industrielles (incinération, métallurgie, sidérurgie, raffinage pétrolier, fumées de bitume, etc.) et agricoles (production d'engrais, brûlage agricole, etc.) (Cecinato et al., 2014).

La quantité et la nature des HAP émis dans l'atmosphère varient considérablement en fonction de leur source. Par exemple, les émissions liées au trafic routier dépendent du type de moteur et de la nature ainsi que de la qualité du carburant utilisé. Les véhicules diesel, par exemple, émettent davantage de HAP que les véhicules fonctionnant à l'essence (Ravindra et al., 2008).

## II.2.4. Exposition de l'Homme aux particules atmosphériques

### II.2.4.1. Voies d'exposition

Les polluants particuliers étant omniprésents dans l'atmosphère, les individus sont exposés à ces polluants quotidiennement et durant toute leur vie. Ces substances nocives entrent en contact avec l'organisme par le biais de diverses voies d'exposition, telles que la voie respiratoire, la voie digestive ou la voie par contact cutané ou oculaire (European Environment Agency, 2016).

La voie principale d'exposition est la voie respiratoire. Chaque jour, un Homme adulte inhale entre 10 000 et 20 000 litres d'air, contenant inévitablement des particules (Santé Publique France, 2022).

### II.2.4.2. Appareil respiratoire

L'appareil respiratoire est un système complexe et essentiel à la vie. Il permet à l'organisme de fournir le dioxygène ( $O_2$ ) aux cellules et d'éliminer le dioxyde de carbone ( $CO_2$ ) produit lors du métabolisme cellulaire. Il se compose d'organes spécifiques qui travaillent de manière coordonnée pour permettre les échanges gazeux entre l'organisme et l'atmosphère.

L'appareil respiratoire est schématisé sur la Figure 5. Il est constitué des voies respiratoires supérieures et inférieures (Ball et al., 2023).

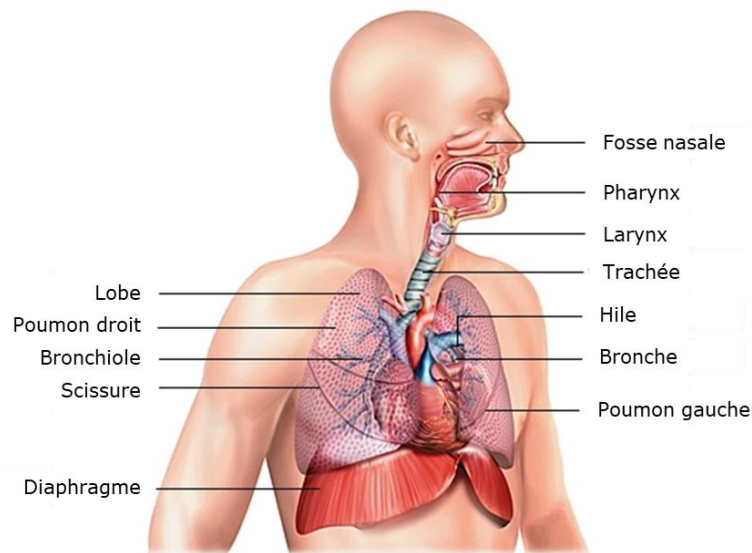


Figure 5 : L'appareil respiratoire (Source : Larousse Médical)

**Les voies respiratoires supérieures** sont constituées du nez, des sinus, du pharynx et du larynx. Il s'agit de voies de conduction, permettant le passage de l'air.

Le nez est, avec la bouche, le point d'entrée de l'air dans le système respiratoire. Il est équipé de poils et de muqueuses qui permettent une première filtration de l'air et un contrôle de la température et de l'humidité de l'air entrant dans les poumons.

Les sinus sont des cavités aériennes situées dans les os du crâne et participent également au filtrage et à l'humidification de l'air.

Le pharynx est situé à l'arrière de la bouche et sert de passage pour l'air et la nourriture.

Le larynx est la partie de l'appareil respiratoire située entre le pharynx et la trachée. Il abrite les organes impliqués dans la production de son lors de la parole, notamment les cordes vocales.

**Les voies respiratoires inférieures** sont constituées de la trachée, des bronches, des bronchioles et des alvéoles. Elles sont constituées d'une zone de conduction (trachée, bronches et bronchioles) et d'une zone de respiration (alvéoles).

La trachée est un tube cartilagineux revêtu d'un épithélium pseudostratifié muco-cilié. Elle relie le larynx aux bronches et permet de transporter l'air vers les poumons.

Les bronches sont les conduits qui se ramifient à partir de la trachée et s'étendent dans les poumons. Elles présentent une structure similaire à celle de la trachée avec un épithélium pseudostratifié muco-cilié mais possèdent des anneaux cartilagineux circulaires complets. Les bronches se divisent en bronchioles de plus en plus petites. Les bronchioles sont dépourvues de cartilage et ont un

diamètre d'environ 1 mm. Initialement ciliées, elles évoluent vers un épithélium simple et leurs cellules de revêtement ne contiennent plus de cellules productrices de mucus.

Les alvéoles constituent la dernière portion de la voie respiratoire. Elles sont revêtues d'une couche cellulaire monocellulaire de pneumocytes et sont en proximité avec les capillaires. Elles contiennent des pneumocytes de type II produisant du surfactant et des cellules de Clara. C'est au niveau des alvéoles qu'ont lieu les échanges gazeux entre l'air inhalé et le sang.

**Les poumons** sont les principaux organes de l'appareil respiratoire. Ils sont situés de part et d'autre du cœur, dans la cavité thoracique. Chaque poumon est entouré par une fine membrane appelée plèvre, qui permet une expansion et une contraction fluides pendant la respiration. Les poumons sont divisés en lobes : trois lobes pour le poumon droit et deux lobes pour le poumon gauche.

L'appareil respiratoire est un système vital qui permet à l'organisme d'obtenir de l'O<sub>2</sub> et d'éliminer le CO<sub>2</sub> produit lors du métabolisme. Cependant, il est également une voie d'entrée privilégiée des polluants atmosphériques, et notamment des particules.

#### II.2.4.3. Pénétration des particules dans l'appareil respiratoire

La taille des particules, représentée par leur Dae moyen, détermine leur comportement dans l'organisme. Plus les particules sont fines, plus elles peuvent pénétrer profondément dans l'appareil respiratoire, voire traverser la barrière alvéolo-capillaire pour atteindre la circulation sanguine et conduire à une distribution systémique (Danel, 2019) (Figure 6).

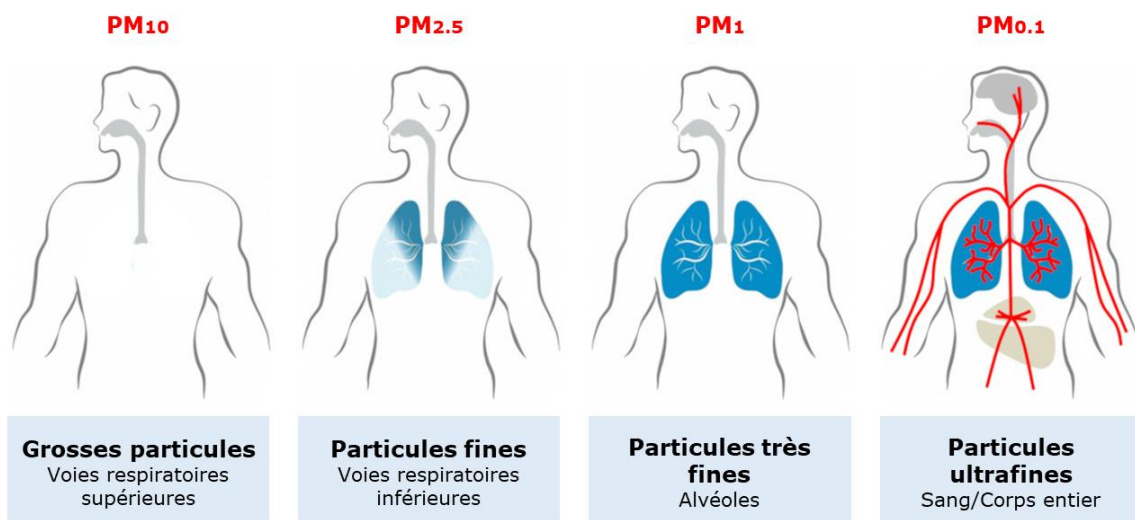


Figure 6 : Pénétration pulmonaire des particules (Source : Encyclopédie de l'environnement)

Le Dae moyen des particules détermine également le processus de dépôt des particules dans le système respiratoire. Ainsi, en fonction du Dae, de la forme et de la charge électrique des particules inhalées, cinq mécanismes de dépôt sont décrits : (1) l'impaction ; (2) la sédimentation ; (3) la diffusion ; (4) l'interception et (5) la déposition électrostatique, liée à la charge des particules (Figure 7) (Fishler et al., 2015; Froehlich & Salar-Behzadi, 2014).

L'impaction est principalement observée pour les particules ayant un Dae supérieur à  $2\ \mu\text{m}$ . Ces particules ont une taille suffisante pour être dotées d'une énergie cinétique et s'impacter au niveau des voies respiratoires supérieures. Pour les particules ayant un Dae compris entre  $1$  et  $2\ \mu\text{m}$ , la sédimentation est le mécanisme de dépôt dominant. Sous l'effet de la gravité, ces particules se déposent dans les voies aériennes de conduction plus petites du tractus trachéobronchique. Les particules ayant un Dae inférieur à  $1\ \mu\text{m}$  sont principalement soumises à l'influence du mouvement brownien. En raison de leur faible masse, elles suivent des trajectoires aléatoires et peuvent ainsi pénétrer plus profondément dans le tractus respiratoire et atteindre les alvéoles.

Le dépôt par interception dépend de la forme des particules. Les particules les plus allongées et les fibres sont soumises à l'interception en raison de leur longueur.

Le dépôt électrostatique, quant à lui, est déterminé par la charge des particules. Les particules chargées positivement sont attirées de manière électrostatique vers les parois des voies respiratoires. En raison de cette force d'attraction supplémentaire, le dépôt des particules chargées peut être plus important que celui des particules neutres.

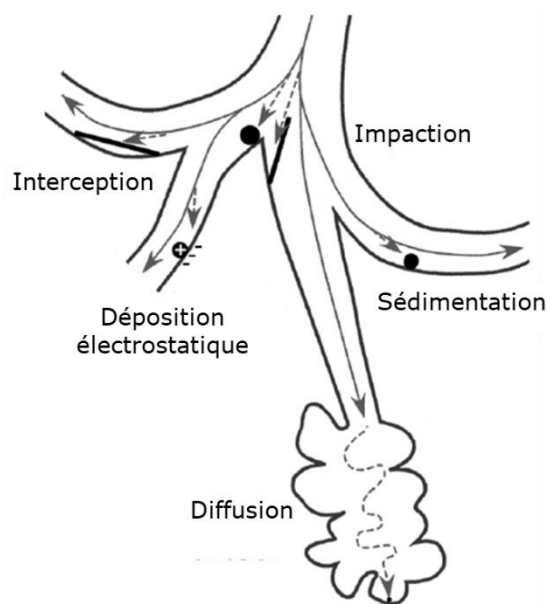


Figure 7 : Processus de dépôt des particules dans le système respiratoire (inspiré de Froehlich & Salar-Behzadi, 2014)

#### II.2.4.4. Clairance pulmonaire des particules

Lorsque des particules pénètrent et se déposent dans l'appareil respiratoire, divers mécanismes de clairance interviennent afin d'éliminer ces polluants et les composés adsorbés à leur surface. Ces processus permettent de réduire la durée potentielle de leur action. Les mécanismes de clairance varient en fonction de la région pulmonaire concernée (région nasale, trachéo-bronchique ou alvéolaire), entraînant une élimination des particules et de leurs composés associés avec une efficacité variable.

Il est important de noter que l'élimination des particules des voies respiratoires ne conduit que rarement à leur élimination totale de l'organisme. En effet, seuls la toux, l'éternuement et le mouchage permettent une élimination effective des particules. Les autres mécanismes de clairance redirigent les particules vers le système digestif, le système lymphatique ou le système sanguin.

**La clairance nasale** implique l'élimination des particules présentes dans la cavité nasale grâce à divers mécanismes dépendant de leur solubilité et de leur localisation. Les particules capturées par les vibrisses nasales dans la partie antérieure du nez peuvent être évacuées directement par éternuement ou par mouchage. L'élimination des particules ayant atteint la partie postérieure du nez dépend de leur solubilité. Les particules insolubles sont transportées avec le mucus nasal grâce aux mouvements ciliaires de l'épithélium respiratoire jusqu'au pharynx, où elles sont ensuite dégluties. Chez un individu adulte en bonne santé, ce processus prend environ une heure. Les particules solubles, quant à elles, peuvent se dissoudre dans le mucus et pénétrer dans les cellules épithéliales ou les vaisseaux sanguins sous-jacents (Casarett et al., 2008).

**La clairance trachéo-bronchique** repose également sur la clairance mucociliaire, permettant le déplacement du mucus contenant des particules insolubles et des macrophages ayant phagocyté des particules jusqu'au larynx en 24 à 48 heures. Le mucus est ensuite, soit dégluti, soit évacué par la toux. Cependant, la clairance mucociliaire diminue progressivement à mesure que le diamètre des voies respiratoires se réduit. Comme dans le cas de la clairance nasale, les particules solubles dans le mucus peuvent pénétrer dans les cellules épithéliales, voire franchir la barrière alvéolo-capillaire et se retrouver au niveau systémique (Casarett et al., 2008).

**La clairance alvéolaire** est principalement assurée par les macrophages alvéolaires, qui phagocytent les particules insolubles. La plupart de ces macrophages sont ensuite éliminés grâce au système mucociliaire après avoir été acheminés jusqu'aux bronchioles par le liquide alvéolaire. Une partie de ces macrophages peut également être évacuée par le système lymphatique. Les particules non phagocytées ou certains de leur composants solubles peuvent se dissoudre dans le surfactant



et rejoindre la circulation sanguine ou lymphatique ou pénétrer dans les cellules épithéliales alvéolaires (Casarett et al., 2008).

Malgré ces mécanismes de clairance visant à protéger l'organisme en éliminant les particules, certaines d'entre elles et leurs composés associés ne sont pas éliminés. Ils peuvent alors pénétrer dans les cellules épithéliales des voies respiratoires ou dans la circulation sanguine ou lymphatique, entraînant ainsi des effets nocifs sur la santé.

## II.2.5. Réglementation des polluants particulaires et des polluants associés

### II.2.5.1. Polluants particulaires

Les polluants particulaires sont particulièrement préoccupants pour la santé humaine. Ils sont associés à une augmentation de la mortalité due à des maladies respiratoires, des maladies cardiovasculaires et des cancers (Thompson, 2018).

La taille et la surface spécifique des particules jouent un rôle central dans l'évaluation de leur dangerosité pour la santé humaine. Les réglementations française et européenne se basent sur des critères de taille pour établir des normes de qualité de l'air afin de protéger la population (Tableau II). Les définitions des normes de qualité de l'air sont les suivantes :

**Objectif de qualité** : niveau de concentration de substances polluantes dans l'atmosphère à atteindre à long terme, sauf lorsque cela n'est pas réalisable par des mesures proportionnées, afin d'assurer une protection efficace de la santé humaine et de l'environnement dans son ensemble ;

**Valeur cible** : niveau de concentration de substances polluantes dans l'atmosphère fixé dans le but d'éviter, de prévenir ou de réduire les effets nocifs sur la santé humaine ou sur l'environnement dans son ensemble, à atteindre, dans la mesure du possible, dans un délai donné ;

**Valeur limite** : niveau de concentration de substances polluantes dans l'atmosphère fixé sur la base des connaissances scientifiques à ne pas dépasser dans le but d'éviter, de prévenir ou de réduire les effets nocifs de ces substances sur la santé humaine ou sur l'environnement dans son ensemble ;

**Seuil d'information et de recommandation** : niveau de concentration de substances polluantes dans l'atmosphère au-delà duquel une exposition de courte durée présente un risque pour la santé humaine des groupes particulièrement sensibles de la population rendant nécessaires des informations immédiates et adéquates ;



**Seuil d’alerte** : niveau de concentration de substances polluantes dans l’atmosphère au-delà duquel une exposition de courte durée présente un risque pour la santé de l’ensemble de la population ou de dégradation de l’environnement justifiant l’intervention de mesures d’urgence.

Tableau II : Valeurs de gestion des polluants particulaires atmosphériques en Europe et en France et recommandation de l’OMS (Sources : Airparif et OMS)

<b>Particules grossières (PM10)</b>		
<b>Valeurs limites européennes</b>	50 µg/m <sup>3</sup>	En moyenne journalière à ne pas dépasser plus de 35 jours par an
	40 µg/m <sup>3</sup>	En moyenne annuelle
<b>Objectif de qualité en France</b>	30 µg/m <sup>3</sup>	En moyenne annuelle
<b>Seuil d’information et de recommandation en France</b>	50 µg/m <sup>3</sup>	En moyenne sur 24 heures
<b>Seuil d’alerte en France</b>	80 µg/m <sup>3</sup>	En moyenne sur 24 heures
<b>Seuil de référence recommandés par l’OMS</b>	15 µg/m <sup>3</sup>	En moyenne annuelle
<b>Particules fines (PM2.5)</b>		
<b>Valeur limite européenne</b>	25 µg/m <sup>3</sup>	En moyenne annuelle
<b>Valeur cible en France</b>	20 µg/m <sup>3</sup>	En moyenne annuelle
<b>Objectif de qualité en France</b>	10 µg/m <sup>3</sup>	En moyenne annuelle
<b>Seuil de référence recommandé par l’OMS</b>	5 µg/m <sup>3</sup>	En moyenne annuelle

Un projet législatif publié en 2022 par la commission européenne propose d’abaisser la valeur limite annuelle de PM10 à 25 µg/cm<sup>3</sup> et celle de PM2.5 à 10 µg/m<sup>3</sup>, afin de se rapprocher des niveaux recommandés par l’OMS et ainsi de permettre une meilleure protection des populations.

Il est important de remarquer que les réglementations actuelles ne prennent pas en compte la composition chimique des particules. Cependant, pour pouvoir faire une évaluation complète de la qualité de l’air ainsi que de son impact sur la santé, il serait essentiel de considérer également la composition chimique des particules (B.-F. Huang et al., 2018; Schwarze et al., 2007, 2007; Shen et al., 2019; L. Yang et al., 2014).

### II.2.5.1. Éléments majeurs et traces métalliques

Lors d’exposition prolongée, certains métaux/métalloïdes peuvent s’accumuler dans l’organisme et engendrer divers problèmes de santé. En effet, ils sont associés à des affections respiratoires

(arsenic, cadmium et nickel), à des troubles cardiovasculaires (arsenic), à des effets sur le système nerveux (plomb, arsenic), à des altérations de la fonction rénale (cadmium). Certains de ces métaux/métalloïdes, comme l'arsenic, le cadmium et le nickel, sont classés cancérigènes certains pour l'Homme (groupe 1 du CIRC) (Briffa et al., 2020).

En France, les concentrations atmosphériques de certains métaux sont réglementées. Il s'agit du plomb, de l'arsenic, du cadmium et du nickel (Tableau III) (Airparif, 2021a).

Tableau III : Valeurs de gestion des éléments métalliques en France et en Europe (Source : Airparif)

Éléments métalliques			
<b>Plomb</b>	Objectif de qualité en France	0,25 µg/cm <sup>3</sup>	En moyenne annuelle
	Valeur limite européenne	0,5 µg/cm <sup>3</sup>	
<b>Arsenic</b>	Valeur cible européenne	6 ng/cm <sup>3</sup>	En moyenne annuelle du contenu total de la fraction PM <sub>10</sub>
<b>Cadmium</b>	Valeur cible européenne	5 ng/cm <sup>3</sup>	
<b>Nickel</b>	Valeur cible européenne	20 ng/cm <sup>3</sup>	

### II.2.5.1. Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP)

Les HAP sont des composés persistants dans l'environnement qui ont des effets très variés sur la santé. Ils présentent une forte capacité d'adsorption sur les particules en suspension dans l'air ainsi qu'un potentiel élevé de bioconcentration dans les organismes vivants. Plusieurs HAP sont reconnus comme étant des substances CMR. Parmi eux, le benzo(a)pyrène est particulièrement bien documenté. Il est classé comme cancérigène certain pour l'homme (groupe 1 du CIRC) et son rôle dans l'induction du cancer du poumon a été établi (CIRC, 2002).

Parmi les HAP, 16 ont été désignés comme prioritaires par l'Agence américaine de protection de l'environnement (US-EPA) en raison de leur dangerosité et leur concentration atmosphérique est à surveiller (Tableau IV) (Ineris, 2005).

Tableau IV : Liste des 16 HAP classés prioritaires par l'US-EPA

Nom	Nombre de cycles aromatiques	Formule chimique
Naphtalène	2	C <sub>10</sub> H <sub>8</sub>
Acénaphtylène	3	C <sub>12</sub> H <sub>8</sub>
Acénaphène		C <sub>12</sub> H <sub>10</sub>
Fluorène		C <sub>13</sub> H <sub>10</sub>
Anthracène		C <sub>14</sub> H <sub>10</sub>
Phénanthrène		C <sub>14</sub> H <sub>10</sub>
Fluoranthène	4	C <sub>16</sub> H <sub>10</sub>
Pyrène		C <sub>16</sub> H <sub>10</sub>
Benzo(a)anthracène		C <sub>18</sub> H <sub>12</sub>
Chrysène		C <sub>18</sub> H <sub>12</sub>
Benzo(a)pyrène	5	C <sub>20</sub> H <sub>12</sub>
Benzo(b)fluoranthène		C <sub>20</sub> H <sub>12</sub>
Dibenzo(ah)anthracène		C <sub>22</sub> H <sub>14</sub>
Benzo(k)fluoranthène		C <sub>20</sub> H <sub>12</sub>
Benzo(ghi)pérylène	6	C <sub>20</sub> H <sub>12</sub>
Indeno(1,2,3-cd)pyrène		C <sub>22</sub> H <sub>12</sub>

En Europe, conformément à la directive 2004/107/CE, la réglementation exige la mesure de 7 HAP à des fins de surveillance : le benzo(a)pyrène, le benzo(a)anthracène, le benzo(b)fluoranthène, le benzo(j)fluoranthène, le benzo(k)fluoranthène, l'indéno(1,2,3,c,d)pyrène et le dibenzo(a,h)anthracène (Anses, 2018).

En France, le benzo(a)pyrène est réglementé dans l'air ambiant avec une valeur cible de 1 ng/m<sup>3</sup>. Cette réglementation est due à sa présence systématique dans les processus de combustion et son impact sanitaire important (classé cancérigène de groupe 1 par le CIRC). Le benzo(a)pyrène est utilisé comme indicateur du risque cancérigène associé aux HAP (Airparif, 2021a).

## II.3. Impact des particules fines sur la santé

Parmi les polluants particulaires, les particules fines (PM<sub>2.5</sub>) sont particulièrement préoccupantes en raison de leur présence ubiquitaire dans l'environnement et de leur impact significatif sur la santé.

Une étude récente a estimé que 56 à 76 % des PM<sub>2.5</sub> inhalées se déposaient dans les voies respiratoires humaines. Ce pourcentage dépend de la morphologie des voies respiratoires et des caractéristiques des PM<sub>2.5</sub>, telles que leur densité, leur forme, leur Dae, etc. (Manojkumar et al., 2019). La majorité des PM<sub>2.5</sub> inhalées atteignent les bronches, et les plus petites peuvent pénétrer dans les bronchioles et les alvéoles voire franchir la barrière alvéolo-capillaire et se retrouver dans la circulation sanguine générale (D. Li et al., 2019).

Une évaluation quantitative d'impact sanitaire, publié en 2016 par Santé Publique France, a établi une relation, pour la France, entre l'exposition aux PM<sub>2.5</sub> et la mortalité. Selon cette étude, plus de 48 000 décès prématurés par an pourraient être imputables à la pollution aux PM<sub>2.5</sub> (Santé Publique France, 2016). L'Agence Européenne de l'Environnement a estimé qu'en 2018 la pollution aux PM<sub>2.5</sub> a été responsable d'environ 417 000 décès prématurés en Europe dont environ 379 000 pour l'Union Européenne (European Environment Agency, 2020). L'OMS considère qu'une part importante de la mortalité liée à la pollution de l'air extérieur (environ 4,2 millions de décès prématurés par an) est imputable à l'exposition aux PM<sub>2.5</sub> (OMS, 2022b).

Dans cette troisième partie de l'état de l'art, un rappel sera fait sur les principales pathologies humaines associées aux expositions aux PM<sub>2.5</sub>. Puis, la physiopathologie de deux pathologies respiratoires fortement associées aux PM<sub>2.5</sub>, l'asthme et la bronchopneumopathie obstructive chronique (BPCO), sera détaillée.

### II.3.1. Données épidémiologiques

Plusieurs études épidémiologiques ont démontré des associations entre l'exposition aux PM<sub>2.5</sub> et différentes pathologies humaines.

La littérature scientifique rapporte des associations entre l'exposition aux PM<sub>2.5</sub> et le développement de pathologies respiratoires telles que l'asthme (Edginton et al., 2021; Jung et al., 2019; Renzi et al., 2022; Yan et al., 2020) la bronchopneumopathie obstructive chronique (BPCO) (H. Chen et al., 2021; S. Liu et al., 2017), ainsi que le cancer du poumon (Hamra et al., 2014; D. Li et al., 2023; X. Wu et al., 2021).

Des études ont également démontré qu'une exposition aux PM<sub>2.5</sub> pouvait entraîner une exacerbation de pathologies respiratoires préexistantes, telles que l'asthme ou la BPCO (N. Li et al., 2022; Tétreault et al., 2016). Certains individus sont plus vulnérables aux effets des PM<sub>2.5</sub>, et les expositions peuvent entraîner une augmentation de la morbidité et de la mortalité en aggravant certaines pathologies respiratoires.

Par ailleurs, plusieurs études épidémiologiques ont démontré l'existence d'une association entre l'exposition aux PM<sub>2.5</sub> et l'incidence de maladies cardiovasculaires (Krittanawong et al., 2023) notamment les accidents vasculaires cérébraux (Shah et al., 2015; S. Zhang & Routledge, 2020), l'insuffisance cardiaques (Shah et al., 2013; S. Zhang & Routledge, 2020), l'hypertension artérielle (K. Huang et al., 2019; Xie et al., 2018), l'arythmie cardiaque (M. Yang et al., 2020; Zheng et al., 2018).

De plus, des travaux de recherches ont suggéré que les PM<sub>2.5</sub> seraient capables de passer la barrière hémato-encéphalique et d'induire une neuro-inflammation au niveau du cerveau (Heusinkveld et al., 2016). Des études épidémiologiques ont démontré une association entre l'exposition aux PM<sub>2.5</sub> et des maladies neurologiques telles que la maladie d'Alzheimer (Åström et al., 2021; L. Yang et al., 2022; Younan et al., 2020), la maladie de Parkinson (R. Liu et al., 2016) ou des tumeurs cérébrales (Jørgensen et al., 2016). Cependant, les associations montrées dans ces études entre PM<sub>2.5</sub> et pathologies neurologiques sont faibles, et il est nécessaire de mener d'autres études pour confirmer ces résultats.

Enfin, des études épidémiologiques ont suggéré un effet reprotoxique des PM<sub>2.5</sub>, en mettant en évidence des associations significatives entre l'exposition aux PM<sub>2.5</sub> pendant la grossesse de la mère et des cas de naissances prématurées ainsi qu'un faible poids de l'enfant à la naissance (Bekkar et al., 2020; Hung et al., 2023).

L'exposition aux PM<sub>2.5</sub> est donc associée à de nombreuses pathologies humaines. L'exposition aux PM<sub>2.5</sub> se faisant principalement par voie respiratoire, nous nous intéresserons ici plus particulièrement à deux pathologies respiratoires bronchiques chroniques : l'asthme et la BPCO.

## II.3.2. Physiopathologie de l'asthme et de la BPCO

### II.3.2.1. Asthme

L'asthme est une maladie respiratoire chronique multifactorielle résultant d'une association entre des prédispositions génétiques et des facteurs environnementaux.

Cette maladie touche des individus de tous âges, des enfants aux adultes, partout dans le monde. En 2019, il a été estimé que 262 millions de personnes souffraient d'asthme et que cette maladie a entraîné environ 461 000 décès (GBD 2019 Diseases and Injuries Collaborators, 2020).

Des variations géographiques importantes dans la prévalence, la sévérité et la mortalité liées à l'asthme sont observées. Bien que cette maladie soit plus fréquente dans les pays à revenu élevé, la majorité des décès liés à cette maladie survient dans les pays à revenu faible à intermédiaire (Dharmage et al., 2019).

L'asthme est une maladie complexe impliquant différents mécanismes physiopathologiques. L'inflammation des voies respiratoires joue un rôle central dans le processus asthmatique. En effet, cette pathologie est caractérisée par une activité anormale des cellules immunitaires présentes dans les tissus bronchiques. Lorsqu'un individu asthmatique est exposé à des déclencheurs tels que l'exercice physique, le froid, les allergènes, les infections respiratoires, les irritants chimiques ou la pollution de l'air, une réponse inflammatoire pathologique se met en place au niveau de l'épithélium bronchique (Figure 8), entraînant la contraction des muscles lisses (bronchoconstriction), une sécrétion excessive de mucus et, dans les cas graves, un remodelage tissulaire aggravant la bronchoconstriction. Cette série d'événements réduit le diamètre des bronches et provoque l'obstruction des voies respiratoires par le mucus, entraînant des symptômes variables d'une personne à l'autre, pouvant aller d'une gêne légère à une détresse respiratoire sévère. Les symptômes typiques comprennent une respiration sifflante, une toux, une sensation d'oppression thoracique et des difficultés respiratoires, en particulier la nuit ou tôt le matin. Ces symptômes sont réversibles, et entre les crises d'asthme, la respiration redevient normale (Inserm, 2023).

La fréquence et l'intensité des crises d'asthme sont variables d'un individu à l'autre. En fonction de la nature de la réponse inflammatoire se mettant en place au niveau bronchique, deux grands groupes d'asthmes sont décrits : les asthmes « Th2 » et les asthmes « non Th2 ».

**Les asthmes « Th2 »** représentent près de 4 cas sur 5. Ils sont caractérisés par une surproduction des cytokines Th2, notamment les interleukines 4, 5 et 13 (IL-4, IL-5 et IL-13) dans les voies respiratoires. Ces cytokines pro-inflammatoires conduisent à une inflammation soit par le biais d'une réaction allergique, entraînant une production excessive d'immunoglobulines IgE (asthme allergique), soit par une réaction non allergique, dans laquelle ce sont des cellules immunitaires récemment découvertes, les cellules lymphoïdes innées (ILC2), qui jouent un rôle majeur et induisent une production excessive d'éosinophiles et un remodelage du tissu bronchique (Pavón-Romero et al., 2021).

Dans l'asthme « Th2 » allergique, les sujets sont prédisposés à développer une sensibilisation allergénique médiée par les IgE, on parle d'atopie. Les cellules dendritiques capturent les allergènes (pollens, poussières, moisissures, etc.), qui sont pris en charge par des endosomes et présentés aux lymphocytes T auxiliaires de type 2 (Th2). Les lymphocytes Th2 synthétisent alors des interleukines de type Th2, telles que l'IL-5, l'IL-4 et l'IL-13. L'IL-5 est une cytokine pro-inflammatoire jouant un rôle crucial dans la maturation, le recrutement, la prolifération et la migration vers les tissus des éosinophiles. Elle est également impliquée dans la survie cellulaire et la prévention de l'apoptose des éosinophiles (Le Borgne-Krams et al., 2016). Les interleukines IL-4 et IL-13, quant à elles, favorisent le changement d'isotype des immunoglobulines dans les lymphocytes B, permettant la production d'IgE. Cette immunoglobuline reconnaît deux types de récepteurs : les récepteurs à haute affinité (FcεRI) et les récepteurs à faible affinité (FcεRII ou CD23). Les récepteurs FcεRI sont exprimés par de nombreuses cellules telles que les mastocytes, les basophiles, les cellules dendritiques, les éosinophiles, les cellules musculaires lisses des voies respiratoires, les cellules épithéliales et les cellules endothéliales. Le couplage entre l'IgE et les récepteurs FcεRI dans les cellules dendritiques amplifie leur capacité à présenter les antigènes, ce qui augmente l'activation des lymphocytes T auxiliaires Th2, et ainsi, la production d'IgE spécifiques des allergènes dans un cycle vicieux. Les récepteurs CD23 sont exprimés par les cellules épithéliales des voies respiratoires et sont impliqués dans le transport des complexes IgE-allergène à travers l'épithélium respiratoire, perpétuant ainsi l'inflammation (Matucci et al., 2018).

Les éosinophiles activés par l'IL-5 libèrent des médiateurs tels que la protéine MBP (*Major Basic Protein*), des espèces réactives de l'oxygène (ERO), les chimiokines GM-CSF (*Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor*) et IL-8, et l'histamine. La protéine MBP et les ERO peuvent induire des lésions au niveau des cellules épithéliales. L'IL-8 permet le recrutement de neutrophiles (Nakagome & Nagata, 2018). L'histamine, quant à elle, est associée à l'induction de la contraction des muscles lisses bronchiques, à la dysfonction de la barrière épithéliale et à l'augmentation de la sécrétion de mucus (Yamauchi & Ogasawara, 2019).

Dans l'asthme « Th2 » non allergique, les cellules épithéliales bronchiques réagissent aux agressions en libérant des molécules pro-inflammatoires appelées « alarmines », en particulier l'IL-25, l'IL-33 et la lymphopoïétine thymique stromale (TSLP, *Thymic Stromal Lymphopoietin*). Ces alarmines stimulent les cellules ILC2, conduisant à la synthèse de cytokines de type Th2 avec une hyperéosinophilie mais sans implication d'IgE spécifiques des allergènes (Kaur & Chupp, 2019).

**Les asthmes « non Th2 »** correspondent aux asthmes dans lesquels il n'existe ni allergie, ni augmentation des éosinophiles. La physiopathologie des asthmes non-Th2 n'est pas encore bien

comprise. Le processus inflammatoire pathologique est lié à la présence en excès d'autres cellules immunitaires telles que les lymphocytes auxiliaires Th1 ou Th17, des neutrophiles ou des mastocytes (Pavón-Romero et al., 2021). Les chercheurs ont identifié au moins quinze sous-groupes de patients exprimant des facteurs d'inflammation différents.

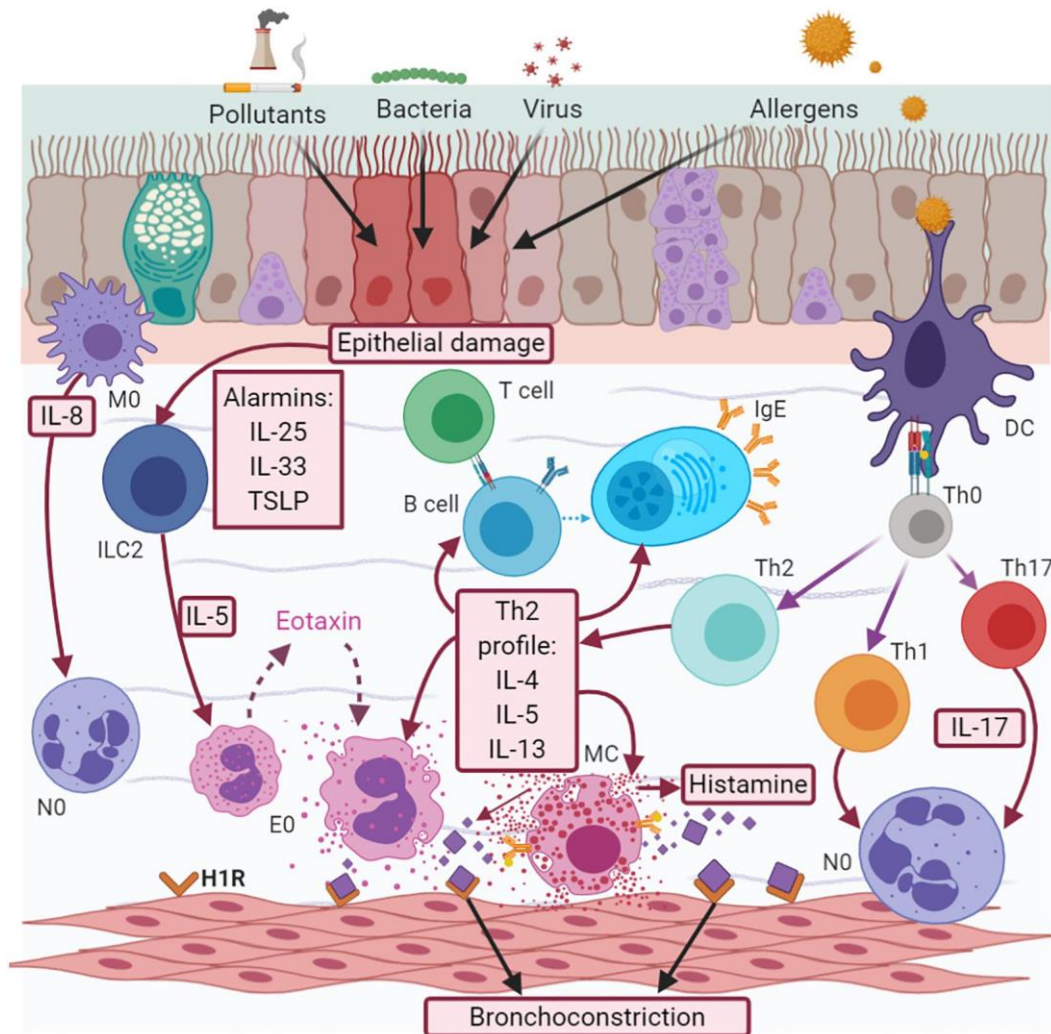


Figure 8 : Physiopathologie de l'asthme (issu de Pavón-Romero et al., 2021)

### II.3.2.2. Bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO)

La bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) est également une maladie respiratoire inflammatoire chronique. Contrairement à l'asthme, elle se définit par une obstruction progressive et persistante des voies aériennes, sans réversibilité. Cette obstruction entrave le flux d'air et provoque des difficultés respiratoires importantes.



La BPCO touche principalement les adultes et représente un fardeau considérable pour la santé mondiale, affectant des millions de personnes et contribuant de manière significative à la morbidité et à la mortalité respiratoire. À l'échelle mondiale, la BPCO représente la troisième cause de décès. En 2019, elle a entraîné 3,23 millions de décès (OMS, 2023a).

Les principales causes de BPCO sont le tabagisme, l'exposition à la pollution atmosphérique, notamment aux PM<sub>2.5</sub>, et les expositions professionnelles aux vapeurs, gaz, poussières et fumées (Murgia & Gambelunghe, 2022; OMS, 2023a).

La physiopathologie de la BPCO implique diverses voies de signalisation qui sont résumées sur la Figure 9.

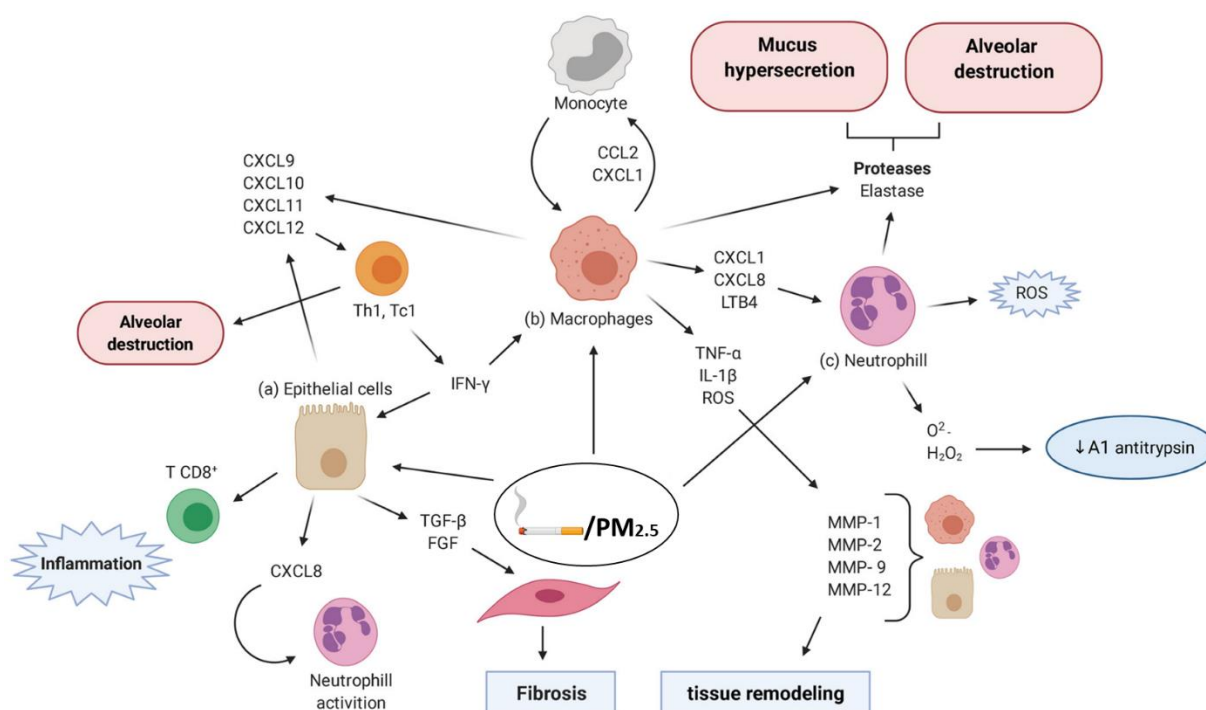


Figure 9 : Physiopathologie de la bronchopneumopathie obstructive chronique (BPCO) (adapté de [Rodrigues et al., 2021](#))

Dans un premier temps, l'exposition à des polluants, tels que la fumée de cigarette ou les PM<sub>2.5</sub>, active les cellules épithéliales et les macrophages des voies respiratoires, déclenchant ainsi une réponse inflammatoire (Rodrigues et al., 2021). L'inflammation mise en place entraîne un remodelage tissulaire, caractérisé par l'épaississement de la paroi des bronches et l'hypertrophie des glandes à mucus, provoquant une hypersécrétion de mucus à plus ou moins long terme. Les voies respiratoires présentent un calibre rétréci et s'obstruent, conduisant à une diminution de la capacité respiratoire. Les symptômes, évoluant progressivement, comprennent une toux persistante, une production accrue de mucus, un essoufflement, une sensation d'oppression thoracique et une

fatigue. Ces symptômes sont généralement plus prononcés pendant l'effort physique et peuvent affecter considérablement la qualité de vie des patients (Brusselle et al., 2011; Inserm, 2017a).

Suite aux expositions, différentes voies de signalisation sont activées dans les cellules épithéliales, libérant des médiateurs pro-inflammatoires tels que l'IL-8, le GM-CSF, l'ICAM-1 (*InterCellular Adhesion Molecule-1*) et le TNF- $\alpha$  (*Tumor Necrosis Factor-alpha*) (W. Gao et al., 2015). L'IL-8 est particulièrement importante dans la réponse inflammatoire de la BPCO car elle favorise le recrutement et l'activation des neutrophiles. Ces neutrophiles, à leur tour, génèrent des ERO tels que  $O_2^-$  et  $H_2O_2$ , qui inactivent l' $\alpha$ 1-antitrypsine, un inhibiteur de protéases et notamment de l'élastase. L'élastase contribue à la régulation de l'expression du gène *MUC5AC*. La surproduction de la mucine MUC5AC par les cellules caliciformes entraîne une hypertrophie et une hyperplasie des voies respiratoires, contribuant au remodelage tissulaire observé dans la BPCO (Fischer et al., 2015).

De plus, les cellules épithéliales des voies respiratoires des patients atteints de BPCO surexpriment TGF- $\beta$  (*Transforming Growth Factor-beta*), un facteur de croissance entraînant la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes. Cette différenciation conduit à la production de matrice extracellulaire et au développement d'une fibrose pulmonaire (Saito et al., 2018).

Les cellules épithéliales libèrent également des chimiokines de type CXCL (*C-X-C motif chemokine Ligand*) tels que CXCL9, CXCL10, CXCL11 et CXCL12, qui attirent les lymphocytes T auxiliaires Th1. Ces lymphocytes libèrent de nombreuses cytokines et notamment l'IFN- $\gamma$  (Interféron-gamma), pouvant conduire à une complication de la BPCO, l'emphysème, en entraînant une destruction des alvéoles (Rodrigues et al., 2021). Les cellules épithéliales attirent également les lymphocytes T CD8+. Ces lymphocytes cytotoxiques produisent des cytokines pro-inflammatoires, notamment l'IL-2, l'IFN- $\gamma$  et le TNF- $\alpha$ , ainsi que des chimiokines, dont CXCL10 et CCL5 (*chemokine CC ligand 5*), qui permettent le recrutement d'autres cellules inflammatoires (Grundy et al., 2013). Enfin, les lymphocytes CD8+ libèrent des perforines, du granzyme B et du TNF- $\alpha$ , provoquant la cytolyse et l'apoptose des cellules épithéliales alvéolaires (Demedts et al., 2006).

L'exposition à la fumée de cigarette ou à des polluants atmosphériques, tels que les PM<sub>2.5</sub>, active également les macrophages, qui peuvent être polarisés en M1 ou M2, différant en termes de récepteurs membranaires, de synthèse de cytokines et d'activité fonctionnelle. Alors que les macrophages M1 sont inflammatoires et microbicides, les macrophages M2 modulent la réponse immune et sont faiblement microbicides. Dans la BPCO, les macrophages M1 prédominent (Chana et al., 2014) et sécrètent des médiateurs pro-inflammatoires tels que CCL2 et CXCL1, favorisant le

recrutement d'autres macrophages. Les macrophages, comme les cellules épithéliales, permettent le recrutement de lymphocytes T auxiliaires Th1 grâce à leur sécrétion de chimiokines CXCL9, CXCL10, CXCL11 et CXCL12 et le recrutement de neutrophiles grâce à leur sécrétion de chimiokines CXCL1, IL-8/CXCL8 et du leucotriène LTB4. De plus, les macrophages sécrètent les chimiokines CCL2 et CXCL1, recrutant un autre type de cellules immunitaires, les monocytes (Barnes, 2016).

Les macrophages libèrent également du TNF- $\alpha$ , de l'IL-1 $\beta$  et des ERO, induisant la sécrétion de métalloprotéases (MMP) par les cellules épithéliales, les macrophages et les neutrophiles. Ces MMP contribuent à la dégradation de la matrice extracellulaire et à la destruction de la paroi alvéolaire, entraînant un remodelage tissulaire (Shibata et al., 2018). De plus, des cytokines telles que TNF- $\alpha$  et IL-1 $\beta$  augmentent également l'expression du gène *MUC5AC*, amplifiant le remodelage tissulaire (Rodrigues et al., 2021).

## II.4. Données toxicologiques sur les PM<sub>2.5</sub>

À côté des études épidémiologiques établissant un lien entre l'exposition aux PM<sub>2.5</sub> et le développement ou l'exacerbation de l'asthme ou de la BPCO, des expérimentations *in vivo* et *in vitro* ont été menées. Elles permettent de mieux appréhender les mécanismes biologiques générés par l'exposition aux PM<sub>2.5</sub> et d'améliorer les connaissances quant aux voies de signalisation contribuant au développement ou à l'aggravation de ces pathologies respiratoires.

### II.4.1. Modèles expérimentaux

Les études *in vivo*, réalisées sur des animaux, ont longtemps été privilégiées pour la recherche en toxicologie. Les modèles murins, rats (G. Wang et al., 2015; L. Zhao et al., 2022) et souris (L. Wang et al., 2019; Xu et al., 2021), ont été très largement employés pour évaluer les effets des PM<sub>2.5</sub> sur l'organisme. Ces modèles offrent l'avantage d'intégrer les interactions complexes entre les organes et les réponses biologiques globales. Cependant, malgré ces avantages, ces modèles présentent des inconvénients majeurs :

- un coût élevé et une complexité des procédures expérimentales ;
- des défis associés à l'extrapolation des résultats aux humains ;
- des préoccupations éthiques liées à l'utilisation d'animaux et aux sacrifices nécessaires pour mener ces études.

Le principe des 3R (*Replace, Reduce, Refine*) est une approche éthique acceptée internationalement ayant pour objectif de réduire l'utilisation d'animaux dans la recherche (Russell & Burch, 1959). Afin de répondre à ces exigences éthiques, la recherche s'oriente de plus en plus vers des méthodes alternatives, notamment des études *in vitro*, basées sur l'utilisation de cultures cellulaires.

Parmi les modèles *in vitro*, les lignées cellulaires humaines sont largement utilisées pour étudier les effets des PM<sub>2.5</sub> sur les voies respiratoires. Parmi celles-ci, les lignées d'origine bronchique comme les cellules BEAS-2B (Abbas et al., 2019; Dergham et al., 2015), 16HBE (Jia et al., 2021), et Calu-3 (Hammond et al., 2022), ou d'origine alvéolaire comme les cellules A549 (Y. Chen et al., 2018; Kouassi et al., 2010), sont fréquemment employées. Ces modèles présentent des avantages notables :

- une rapidité et une facilité d'utilisation, avec une reproductibilité élevée ;
- un coût relativement faible ;
- une utilisation de cellules humaines, éliminant les problèmes de transposition inter-espèces.

Cependant, ces modèles sont des cellules immortalisées. Même si elles ont conservé un certain nombre de fonctions cellulaires et moléculaires des tissus/organes dont elles proviennent, elles ont subi des modifications (génétiques ou autres) qui les éloignent de la physiologie originelle. Il a été démontré que certaines lignées cellulaires pourraient ne plus correspondre aux cellules d'origine, ce qui entraînerait des réponses biologiques différentes de celles observées dans les cellules primaires après une exposition à des xénobiotiques (Balharry et al., 2008).

Afin d'être plus représentatif des réponses biologiques se mettant en place au niveau de l'épithélium respiratoire, et plus particulièrement au niveau bronchique, après exposition aux polluants particulaires, des cellules primaires ou pseudo-primaires peuvent être utilisées, comme par exemple, les cellules hAEC (J. Park et al., 2021) ou NHBE (Boublil et al., 2013). Les cellules primaires, directement isolées du tissu bronchique humain par biopsie, reproduisent plus fidèlement la réponse biologique et sont souvent plus sensibles à leur environnement car leur système enzymatique est intact. Cependant ces modèles ont une limite importante qui est leur durée de vie courte (de quelques jours à quelques semaines) par rapport aux cellules immortalisées (plusieurs années).

Dans les deux cas, cellules immortalisées ou cellules primaires, il s'agit souvent de modèles monocellulaires ne prenant pas en compte les interactions entre les différents types cellulaires co-existant dans un tissu. De plus, ces modèles sont maintenus en culture dans des conditions submergées et sont donc éloignés des situations physiologiques *in situ* de l'épithélium respiratoire. Enfin, ces modèles ne peuvent pas être exposés à l'interface air-liquide (ALI) au-delà de 60 minutes sans un risque d'assèchement de la face apicale des cellules, assèchement qui entraînera la mort cellulaire, ce qui limite leur emploi pour étudier les cumuls ou la chronicité des expositions.

Compte tenu de ces limites, d'autres modèles *in vitro* ont été développés comme des modèles de co-culture permettant d'intégrer les interactions intercellulaires entre différents types de cellules. Ces modèles associent par exemple des cellules immunitaires de type monocyte (THP1) et des cellules épithéliales bronchiques (BEAS-2B) (Persoz et al., 2012) ou alvéolaires (A549) (Longhin, Pezzolato, et al., 2013; Wottrich et al., 2004). Toutefois ces modèles restent difficiles à mettre en place et ont une durée de vie limitée.

Pour se rapprocher des conditions physiologiques, des épithéliums respiratoires reconstruits d'origine humaine, ont été développés (Anderson et al., 2013; S. Huang et al., 2013, 2017). Ces modèles 3D présentent l'avantage d'associer différents types de cellules épithéliales (cellules basales, cellules sécrétrices de mucus et cellules ciliées) pouvant être co-cultivées avec d'autres types cellulaires (fibroblastes, macrophages, etc.). Ces modèles présentent une activité biologique

maintenue dans le temps, se rapprochant de celle observée *in situ*, et une sécrétion de mucus compatible avec l'application d'expositions uniques ou répétées à l'interface air-liquide (Baxter et al., 2015; Bisig et al., 2018; Rossner et al., 2019). Il est important de noter que l'utilisation de ces modèles pour évaluer l'impact des polluants tels que les PM<sub>2.5</sub> est encore peu répandue.

## II.4.2. Principaux mécanismes décrits dans la toxicité des PM<sub>2.5</sub>

Les expérimentations menées à l'aide de modèles *in vivo* ou *in vitro* ont permis de décrire différents mécanismes se mettant en place suite à des expositions aux PM<sub>2.5</sub>. Dans cette partie, nous nous intéresserons plus particulièrement au stress oxydant, à l'inflammation, au métabolisme et aux modifications épigénétiques.

### II.4.2.1. Stress oxydant

Le stress oxydant est défini comme un déséquilibre entre l'accumulation d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) et/ou de l'azote (ERA) et la capacité antioxydante du système biologique. Les ERO et les ERA, instables et cytotoxiques, engagent des réactions avec diverses macromolécules cellulaires telles que les lipides, l'ADN et les protéines, perturbant ainsi l'intégrité cellulaire (Sahiner et al., 2018).

De nombreuses études expérimentales ont permis de mettre en évidence que les PM<sub>2.5</sub> étaient responsables de dommages oxydatifs. Les marqueurs couramment utilisés pour caractériser cet impact sont la quantification des ERO, la mesure de biomarqueurs d'effets (8-OHdG, MDA, etc.) et l'évaluation des réponses antioxydantes.

#### II.4.2.1.1. Espèces réactives de l'oxygène (ERO)

Les ERO sont produites de façon endogène, par les organismes vivants, à partir de l'oxygène moléculaire en conséquence du métabolisme cellulaire normal.

Suite à des agressions, comme par exemple suite à des expositions aux PM<sub>2.5</sub>, les ERO peuvent s'accumuler dans les cellules. Ces ERO se subdivisent en deux groupes : les espèces radicalaires tels que le radical hydroxyde (OH<sup>°</sup>) et l'anion superoxyde (O<sub>2</sub><sup>°-</sup>), et les espèces non radicalaires tels que le peroxyde d'hydrogène H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Plusieurs études expérimentales, utilisant différents modèles *in vivo* murins (L. Wang et al., 2019; Xu et al., 2021) et *in vitro* de cellules 16HBE (M. Gao et al., 2022; Jin et al., 2018), BEAS-2B (Fan et al., 2022; H.-H. Zhang et al., 2018), A549 (H. Wang et al., 2016; J. Yang et al., 2018), ainsi que

des cellules épithéliales bronchiques primaires (Loxham et al., 2015), ont démontré que l'exposition aux PM2.5 entraînait une accumulation des ERO dans les cellules. Les ERO quantifiées dans ces études peuvent avoir deux origines. Elles peuvent, soit se former à l'intérieur de la cellule (oxydants endogènes), soit pénétrer dans la cellule (oxydants exogènes).

Les ERO endogènes sont produits dans la cellule par des réactions de transfert d'électrons à travers des processus enzymatiques et non enzymatiques. Les principales sources des ERO au sein des cellules humaines sont les mitochondries, les cytochromes P450 et les peroxysomes (Valavanidis et al., 2013).

Les ERO exogènes, quant à elles, proviennent de l'environnement extérieur et généralement de polluants atmosphériques, comme par exemple les PM2.5 (Figure 10). En effet, les PM2.5 contiennent plusieurs constituants qui génèrent des ERO par le biais de différentes réactions chimiques et biologiques. Le potentiel oxydant est une notion qui a été définie pour caractériser la capacité des particules, et notamment des PM2.5, à provoquer un stress oxydant, dégradant ainsi les antioxydants cellulaires, ce qui a pour conséquence d'endommager les cellules et les tissus (Crobbedu et al., 2017). Les principaux composés chimiques qui contribuent au potentiel oxydant des PM2.5 sont les métaux de transition dotés de propriétés redox, les HAP, les quinones, les COV (Valavanidis et al., 2013)

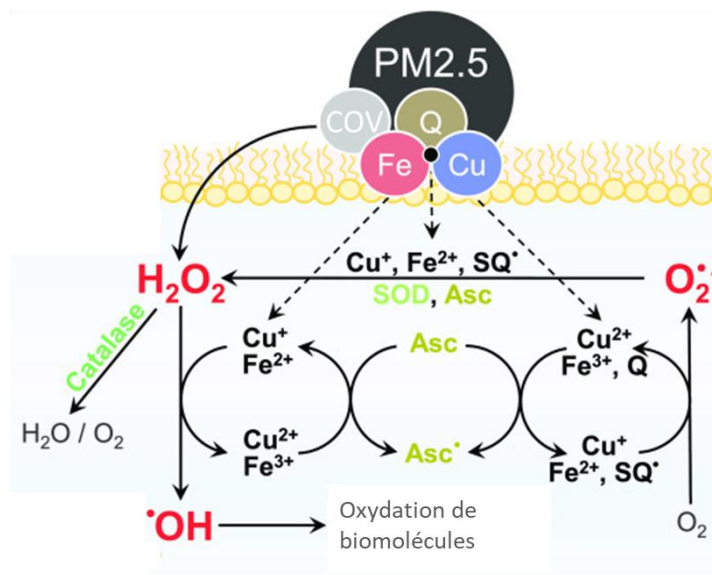


Figure 10 : Production et élimination d'ERO suite à des expositions aux PM2.5 (inspiré de Lelieveld et al., 2021). COV, composés organiques volatils ; Q, quinones ; Fe, fer ; Cu, cuivre ; SOD, superoxyde dismutase ; Asc, ascorbate.

Les HAP, adsorbés à la surface des PM2.5, peuvent également être métabolisés en quinones au sein des tissus pulmonaires, sous l'effet d'enzymes de biotransformation telles que le cytochrome P450,

l'époxyde hydrolase et la dihydrodiol déshydrogénase. Cette conversion accentue encore davantage le stress oxydant (J.-H. Park et al., 2006; Valavanidis et al., 2013).

#### II.4.2.1.2. Biomarqueurs d'effet du stress oxydant

L'ensemble de ces mécanismes conduisent à une accumulation des ERO dans les cellules des voies respiratoires. Lorsque les ERO sont en quantité trop importante dans une cellule, elles vont oxyder des macromolécules, causant ainsi de nombreux dommages cellulaires (Yzydorczyk et al., 2015).

Plusieurs études expérimentales, à la fois *in vivo* et *in vitro*, ont permis de démontrer que des expositions aux PM<sub>2.5</sub> entraînaient l'oxydation de lipides et de l'ADN. Par exemple, une étude *in vitro* mise en place avec des cellules BEAS-2B a démontré que l'exposition aux PM<sub>2.5</sub> induisait une accumulation intracellulaire d'ERO, menant à des dommages oxydatifs attestés par la formation de 8-hydroxy-désoxyguanosine (8-OHdG) et la production de malondialdéhyde (MDA), témoignant respectivement de l'oxydation de l'ADN et des lipides (Dergham et al., 2012).

De même, une étude *in vivo* récente a démontré que les expositions de rats aux PM<sub>2.5</sub> à des concentrations reflétant le milieu environnemental réel (« *real-world air PM<sub>2.5</sub>* ») engendraient une augmentation du taux de 8-OHdG (L. Zhao et al., 2022).

#### II.4.2.1.3. Réponse antioxydante

Face à l'agression engendrée par les ERO, les cellules adoptent généralement une stratégie de défense en intensifiant la production d'antioxydants, notamment d'enzymes antioxydantes.

Il existe deux familles d'antioxydants (Baudin, 2020) :

- Les antioxydants primaires : molécules capables de bloquer les radicaux lipidiques par transfert d'un hydrogène. La superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT), la Glutathion peroxydase (GPx) sont des enzymes antioxydantes primaires qui ont un rôle clé dans la réponse antioxydante. L'ascorbate est un autre exemple d'antioxydant primaire.
- Les antioxydants secondaires : molécules agissant sur les facteurs favorisant l'oxydation (chélation des ions métalliques, réduction de l'oxygène, etc.). La thioredoxine reductase 1 (TRXR1), la glutathion S-transférase mu 1 (GSTM1), l'hème oxygénase 1 (HO-1), la glutathion S-transférase P (GSTP1) et la glutathion peroxydase 1 (GPX1) sont des exemples d'antioxydants secondaires.

Des études *in vitro* ont démontré que l'exposition des cellules respiratoires aux PM<sub>2.5</sub> entraînait une augmentation de la réponse antioxydante. Par exemple, une augmentation de la production de



SOD, de CAT et de HO-1 a été observée dans un modèle de cellules A549 (Fernando et al., 2019). De même, l'activité de la SOD a été accrue suite à des expositions aux PM<sub>2.5</sub> en utilisant un modèle de cellules BEAS-2B (X. Wang et al., 2023).

Sur le plan mécanistique, il a été démontré que l'expression de plusieurs enzymes antioxydantes est liée au facteur de transcription Nrf2 (*Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2*). À l'état basal, le facteur de transcription Nrf2 est maintenu inactif dans le cytoplasme de la cellule sous forme d'un complexe avec les protéines Keap1 (*Kelch-like ECH-associated protein 1*), Cul3 (*Cullin 3*) et Rbx1 (*Ring-box 1*). Ces trois protéines contribuent à la poly-ubiquitination du complexe et sa dégradation par le protéasome (Figure 11.a).

En réponse à un stress oxydant provoqué par des PM<sub>2.5</sub>, Nrf2 est libéré de son complexe avec Keap1 et se transloque vers le noyau de la cellule. Au sein du noyau, Nrf2 peut former un complexe avec sMaf (small musculoaponeurotic fibrosarcoma) et se lier à la région régulatrice appelée élément de réponse aux antioxydants (ARE) présente dans de nombreux gènes codant pour des enzymes antioxydantes (SOD, CAT, HO-1, etc.) et des protéines de détoxification (Figure 11.b) (Ma, 2013).

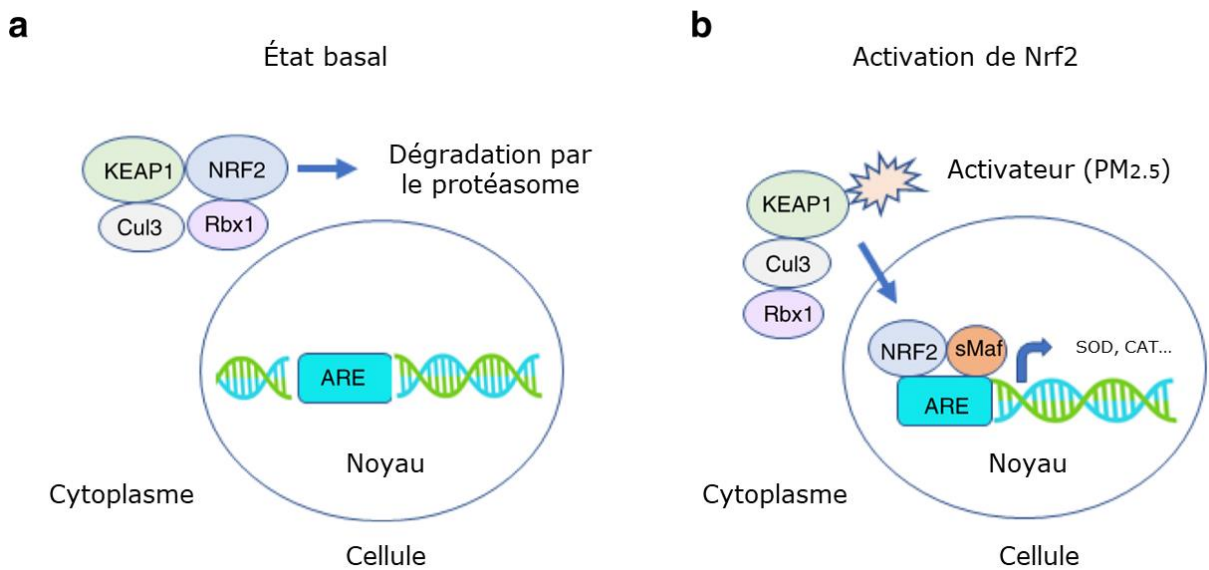


Figure 11 : La voie de signalisation Nrf2 (inspiré de Camiña & Penning, 2022)

Des études *in vivo* ont mis en évidence des résultats contradictoires à ceux obtenus avec des études *in vitro*. Par exemple, chez la souris, il a été observé que les niveaux de SOD et de glutathion réduit (GSH) étaient diminués suite à des expositions aux PM<sub>2.5</sub> (Xu et al., 2021). De même, chez le rat, l'exposition aux PM<sub>2.5</sub> a été corrélée à une diminution de la SOD et de la GPx (G. Wang et al., 2015). Dans le cadre d'un modèle de souris rendues asthmatiques en utilisant un extrait de cafard

une diminution des niveaux de CAT, de GSH, de GPx et de SOD a également été observée en réponse à une exposition aux PM<sub>2.5</sub> (L. Wang et al., 2019). Certaines études *in vitro* ont toutefois confirmé les résultats observés *in vivo*, comme une diminution de l'activité des enzymes CAT et SOD suite à des expositions aux PM<sub>2.5</sub> chez un modèle de cellules A549 (Deng et al., 2013).

L'ensemble de ces observations mettent en lumière l'impact complexe des PM<sub>2.5</sub> sur la réponse antioxydante, influençant l'équilibre entre les ERO et les mécanismes de défenses cellulaires.

#### II.4.2.2. Inflammation

L'inflammation est une réaction du système immunitaire qui survient suite à une agression dans le but de protéger l'organisme.

Lorsqu'une inflammation survient dans l'organisme, de nombreuses cellules, en particulier les cellules du système immunitaire telles que les neutrophiles, les monocytes et les lymphocytes, sont mobilisées. À l'initiation du processus inflammatoire, les cellules du tissu agressé ainsi que les cellules immunitaires environnantes libèrent diverses substances, appelées médiateurs de l'inflammation, comme les cytokines (IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , etc.) et les chimiokines (GM-CSF, CXCL2, CXCL10, etc.). Ces protéines pro-inflammatoires induisent la dilatation des petits vaisseaux sanguins dans le tissu agressé, favorisant ainsi l'augmentation du flux sanguin. Cela permet à davantage de cellules du système immunitaire d'être transportées vers les tissus blessés, où elles contribuent à l'élimination des corps étrangers responsables de l'agression. De plus, les médiateurs de l'inflammation facilitent la sortie des cellules immunitaires des petits vaisseaux sanguins, ce qui augmente leur capacité à pénétrer dans les tissus endommagés (Institute for Quality and Efficiency in Health Care (IQWiG), 2010).

Bien que la réponse inflammatoire soit bénéfique dans des circonstances normales, elle peut devenir préjudiciable lorsqu'elle devient chronique et est reconnue pour contribuer au développement de pathologies inflammatoires chroniques telles que l'asthme ou la BPCO.

##### II.4.2.2.1. PM<sub>2.5</sub> et inflammation

Après inhalation, les PM<sub>2.5</sub> se déposent à la surface des voies respiratoires et peuvent interagir avec les cellules épithéliales et les macrophages. Elles peuvent induire une inflammation au niveau pulmonaire en activant différentes voies de signalisation (Thangavel et al., 2022). Ces voies de signalisation peuvent être activées par différents composants des PM<sub>2.5</sub>, notamment les endotoxines, les HAP et les métaux.

Les endotoxines sont détectées par les récepteurs de reconnaissance de motifs tels que les récepteurs TLR (*Toll Like Receptor*), notamment TLR2 et TLR4. Lorsqu'ils sont activés, ces récepteurs engagent des voies de signalisation impliquant des facteurs de transcription tels que le facteur nucléaire- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) (Figure 12) (N. Ishihara et al., 2022; T. Liu et al., 2017).

NF- $\kappa$ B est une famille de facteur de transcription d'une importance majeure dans l'inflammation. Il régule l'expression génique de plusieurs protéines, notamment des cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-8, IL-33, etc.), des chimiokines (CXCL10, etc.) et des molécules d'adhésion permettant le recrutement des leucocytes au niveau du site de l'inflammation (Hoesel & Schmid, 2013; Zou et al., 2020).

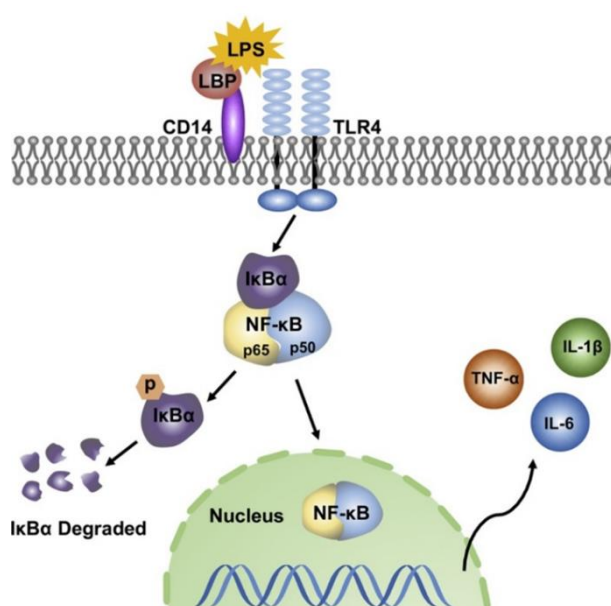


Figure 12 : Activation de la voie de signalisation NF- $\kappa$ B par des endotoxines (inspiré de Han et al., 2020). LPS, lipopolysaccharide; LBP, LPS binding protein; I $\kappa$ B- $\alpha$ , inhibitor of NF- $\kappa$ B alpha

Les HAP peuvent également induire une inflammation. Ils activent notamment les voies de signalisation associées au facteur de transcription AhR, voie de signalisation détaillée dans le paragraphe II.4.2.3 Métabolisme des xénobiotiques (page 45). L'activation de AhR a été associée à l'augmentation de l'expression de nombreux gènes impliqués dans la réponse inflammatoire, tels que l'*IL-33* (Y. Ishihara et al., 2019), l'*IL-1 $\beta$*  (L. Yang et al., 2014), l'*IL-6* (Hollingshead et al., 2008), l'*IL-8* (Vogel et al., 2011), l'*IL-17* (Quintana et al., 2008) et *TNF- $\alpha$*  (Lecureur et al., 2005).

Parmi les cytokines activées par NF- $\kappa$ B et AhR, l'*IL-33* joue un rôle important dans la réponse inflammatoire. Localisée dans le noyau des cellules épithéliales et des macrophages, cette cytokine agit comme une alarmine et peut activer les cellules lymphoïdes innées de type 2 et les mastocytes. Les lymphocytes T Th2 jouent un rôle important dans l'orchestration de l'inflammation allergique

en libérant des cytokines telles que l'IL-5 et l'IL-13 (N. Ishihara et al., 2022; Y. Ishihara et al., 2019). Une autre cytokine activée par NF- $\kappa$ B, l'IL-6, peut également favoriser la différenciation des lymphocytes T Th2 et des lymphocytes T Th17 (Chung et al., 2009; Diehl et al., 2002). L'IL-8, quant à elle, permet la chimiotaxie des lymphocytes, des neutrophiles et des éosinophiles au niveau du tissu agressé (Nakagome & Nagata, 2018). L'ensemble de ces mécanismes suggèrent que l'exposition aux PM<sub>2.5</sub> pourrait contribuer au développement de pathologies respiratoires, et notamment de l'asthme (voir paragraphe II.3.2.1, page 28).

Des études ont également démontré que les métaux associés aux PM<sub>2.5</sub> pouvaient avoir un effet pro-inflammatoire. En effet, une augmentation de la production de TNF- $\alpha$ , d'IL-6 et d'IL-8 a été mise en évidence, en lien avec la présence des métaux lourds comme le Cu, le Zn et le Ni, mais aussi des métaux de transition l'Al, le Fe et le Mn (Schaumann et al., 2004; Shao et al., 2018).

Il apparaît donc, qu'en plus des PM<sub>2.5</sub> dans leur entièreté considérée comme corps étranger par le système immunitaire, plusieurs composants adsorbés à leur surface peuvent induire une réponse inflammatoire. Les mécanismes de signalisation associés à ces divers composants ne sont pas encore entièrement compris mais il est fort probable que des interactions complexes entre ces différents composés interviennent dans la réponse inflammatoire provoquée par des expositions aux PM<sub>2.5</sub>.

#### II.4.2.2.2. Lien entre réponse inflammatoire et stress oxydant

Un lien étroit existe entre la réponse inflammatoire et le stress oxydant. En effet, le stress oxydant peut être à l'origine d'une réponse inflammatoire. Il a été établi que le facteur de transcription NF- $\kappa$ B pouvait être activé en réponse à un stress oxydant. En particulier, il a été démontré que H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pouvait activer NF- $\kappa$ B (Biswas, 2016). Ainsi, les PM<sub>2.5</sub> peuvent déclencher une réponse inflammatoire *via* des voies de signalisation dépendantes du stress oxydant.

De même, la réponse inflammatoire peut induire un stress oxydant. Sur le site de l'inflammation, les cellules inflammatoires activées libèrent non seulement des enzymes et des médiateurs chimiques, mais également des espèces réactives (superoxyde, peroxyde d'hydrogène, radical hydroxyle, acide hypochloreux, etc.) provoquant ainsi un stress oxydant et des lésions tissulaires (Biswas, 2016). La Figure 13 illustre des exemples d'interactions complexes pouvant se mettre en place au niveau des cellules épithéliales respiratoires suite à des expositions aux PM<sub>2.5</sub> (Bezerra et al., 2023).

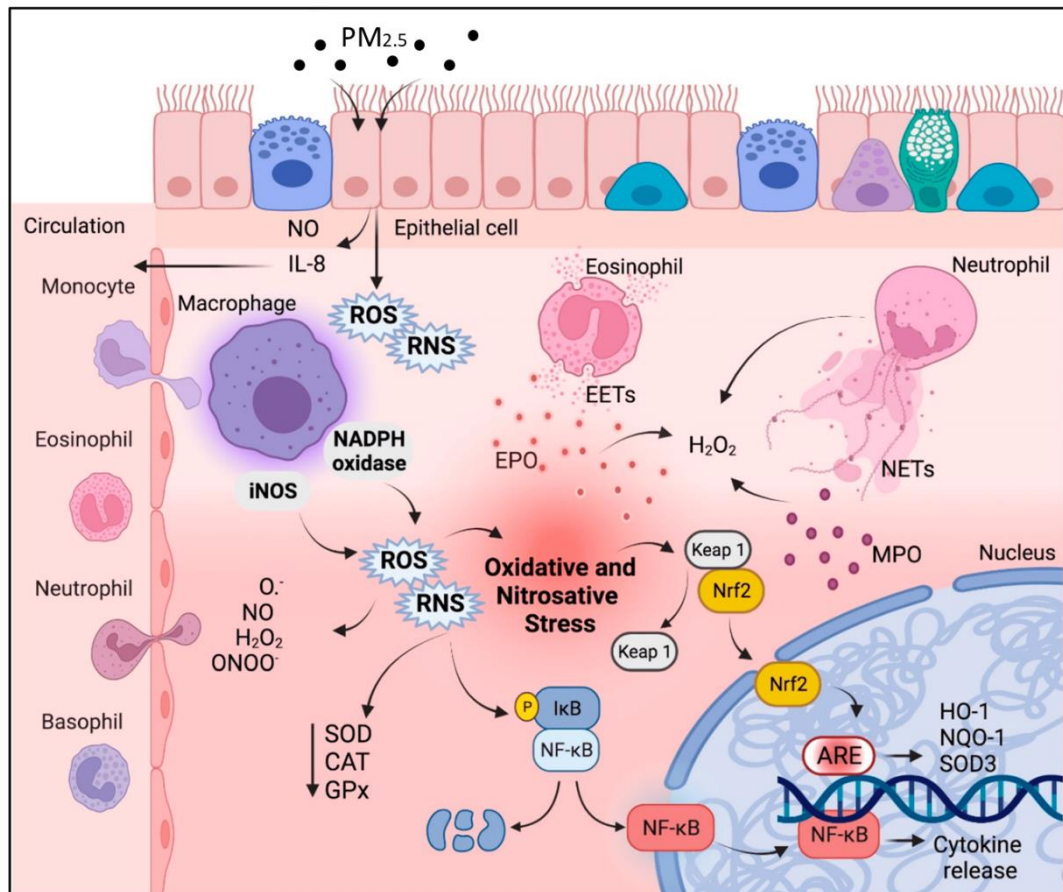


Figure 13 : Représentation schématique du lien entre stress oxydant et inflammation pouvant se mettre en place dans les cellules épithéliales respiratoires suite à une exposition aux PM<sub>2.5</sub> (inspiré de Bezerra et al., 2023). ROS, espèces réactive de l'oxygène (ERO) ; RNS, espèces réactive de l'azote (ERA) ; iNOS, oxyde nitrique synthase ; EPO, peroxydase ; MPO, myeloperoxydas.

#### II.4.2.2.3. Lien entre inflammation des voies respiratoires et remodelage tissulaire

Les PM<sub>2.5</sub> induisent une réponse inflammatoire au niveau des voies respiratoires qui conduit à une infiltration de cellules immunitaires dans les tissus bronchiques.

Des interactions se développent entre les cellules immunitaires et les cellules épithéliales des voies respiratoires, donnant lieu à une augmentation de l'expression et de la libération de médiateurs du remodelage tissulaire tels que les facteurs de croissance TGF- $\beta$  (transforming growth factor-beta) et EGF (epidermal growth factor). Les interactions entre ces facteurs de croissance et leurs récepteurs contribueraient au remodelage bronchique, entraînant un épaissement de la paroi bronchique et une fibrose tissulaire (Feng et al., 2016; Halwani et al., 2011; Latella, 2018).

De plus, EGF peut induire la prolifération de cellules productrices de mucus, conduisant ainsi à une augmentation de la sécrétion de mucines telles que les mucines MUC5AC et MUC5B (Casalino-Matsuda et al., 2006, 2009).

Ce remodelage tissulaire, accompagné de la surproduction de mucus dans les voies respiratoires, peut être responsable de difficultés respiratoires importantes chez les patients.

### II.4.2.3. Métabolisme des xénobiotiques

À côté des réponses antioxydante et inflammatoire mises en place en réaction à des agressions extérieures, une réponse métabolique peut également se déclencher.

Lorsqu'un xénobiotique pénètre dans l'organisme, il peut déclencher un processus métabolique, notamment grâce à l'action des enzymes du métabolisme, afin de favoriser son élimination (Krol et al., 2015).

Le métabolisme des xénobiotiques se compose de deux phases : une phase de fonctionnalisation (phase I) et une phase de conjugaison (phase II). Les réactions de phase I impliquent la création ou la modification d'un groupe fonctionnel dans la molécule substrat. La majorité de ces réactions sont des oxydations, mais des mécanismes de réduction et d'hydrolyse sont également connus. L'objectif des réactions de fonctionnalisation est de rendre les xénobiotiques plus hydrophiles pour permettre leur élimination. Les réactions de phase II sont plus variées et consistent en la conjugaison des xénobiotiques avec des molécules endogènes pour faciliter leur élimination de l'organisme. Les groupements de conjugaison peuvent être de petite taille et hydrophobes (comme le groupe méthyle), de plus grandes molécules hydrophobes (telles que le cholestérol ou le diglycéride) ou de grandes molécules hydrophiles (comme l'acide glucuronique ou le glutathion) (Testa, 2007).

Dans le cas des expositions aux PM<sub>2.5</sub>, une activation d'enzymes du métabolisme et notamment des cytochromes P450 (CYP) CYP1A1 et CYP1B1 a très largement été décrite (Borgie et al., 2015; Dergham et al., 2012; Z. Zhou et al., 2015). Ces enzymes de phase I sont connues pour participer à la biotransformation des HAP, un composant des PM<sub>2.5</sub>.

L'activation de CYP1A1 et de CYP1B1 peut être liée à la présence de HAP dans la composition chimique des PM<sub>2.5</sub>, par le biais de la voie de signalisation AhR (Vogel et al., 2020). Il a également été décrit que ces enzymes du métabolisme (notamment CYP1A1) pouvaient être activées par des métaux lourds. Cependant les voies de signalisation impliquées ne sont pas encore décrites dans la littérature (Korashy & El-Kadi, 2005, 2006).

La protéine AhR (*Aryl hydrocarbon Receptor*) humaine a une masse moléculaire de 96 kDa et appartient à la famille des « *basic helix-loop-helix* » (bHLH). Il s'agit d'un facteur de transcription cytoplasmique capable de moduler l'expression de gènes cibles de manière ligand-dépendante (Shivanna et al., 2022). AhR est impliqué dans la régulation de nombreux mécanismes



cellulaires comme le métabolisme des xénobiotiques mais également l'immunité et la différenciation cellulaire (Esser, 2016 ; Gutiérrez-Vázquez & Quintana, 2018 ; Kawajiri & Fujii-Kuriyama, 2017, Borgie et al., 2015).

AhR est exprimé dans tous les tissus mais sa présence est plus marquée dans certains organes tels que les poumons, le placenta, le thymus, les reins et le foie (Tirona & Kim, 2005). Il reste inactif dans le cytoplasme des cellules sous la forme d'un complexe avec deux molécules Hsp90 (90-*kDa* *heat shock protein*), p23 (co-chaperonne de 23kDa), XAP2 (*hepatitis X-associated protein-2*) et la kinase Src. Hsp90 et p23 protègent AhR de la protéolyse, facilite la liaison du ligand et empêche AhR de se lier à ARNT (*Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator*). XAP2 empêche la translocation de AhR dans le noyau. AhR est activé par sa liaison avec un ligand, endogène ou exogène (HAP notamment). La liaison de AhR avec un ligand entraîne un changement de la conformation du complexe cytosolique, libérant XAP2 et permettant la translocation vers le noyau. Dans le noyau, Hsp90, p23 et la kinase Src se dissocient de AhR, assurant la dimérisation de AhR avec ARNT. Le complexe hétérodimère AhR/ARNT se lie alors à l'élément de réponse aux xénobiotiques (XRE) sur l'ADN, recrute la polymérase ARN II et induit la transcription de plusieurs gènes, notamment des gènes d'enzymes de phase I (*CYP1A1*, *CYP1B1*, etc.) et de phase II (*NQO1*, etc.) (Figure 14) (Shivanna et al., 2022).

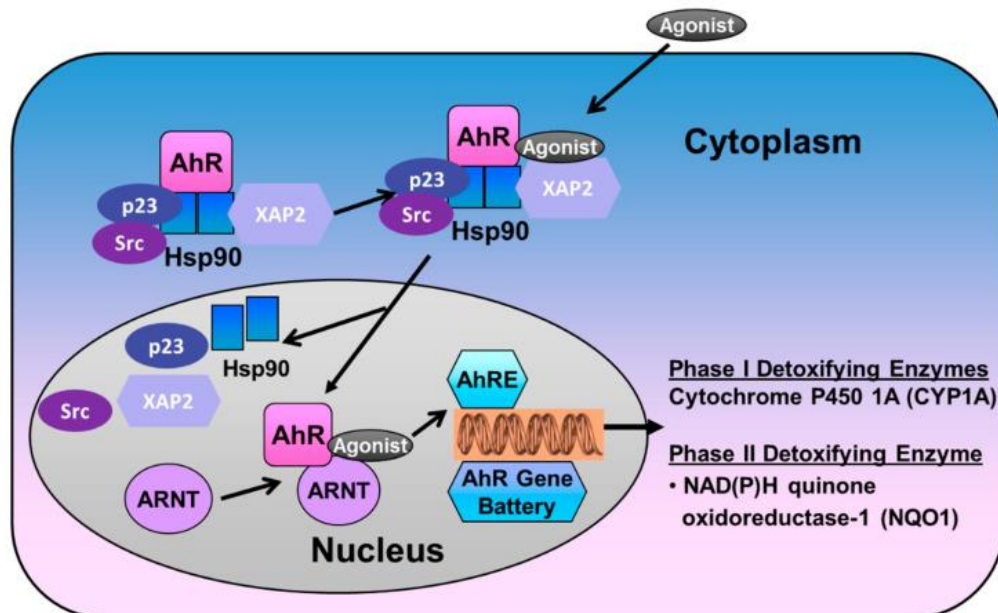


Figure 14 : La voie de signalisation AhR (issu de Shivanna et al., 2022)

Ainsi, lors d'une exposition aux HAP, les enzymes CYP1A1 et CYP1B1 sont activées *via* la voie de signalisation AhR. Ces enzymes de la phase I ont un rôle bien établi dans le métabolisme des HAP,

visant à les éliminer. Cependant, leur biotransformation peut conduire à la formation de métabolites intermédiaires hautement toxiques (Kelly & Fussell, 2012)

En outre, comme mentionné précédemment (voir paragraphe II.4.2.2.1, page 41), l'activation du facteur de transcription AhR entraîne l'expression de nombreux gènes de l'inflammation, contribuant à la toxicité des HAP. De plus, des études ont démontré que le récepteur AhR pouvait induire l'expression de gènes liés à la production de mucus tels que *MUC5B* et *MUC5AC* (Chiba et al., 2012; P. S. Wong et al., 2010). L'inflammation et la surproduction de mucus résultants de l'activation de la voie de signalisation AhR pourraient contribuer aux symptômes observés dans l'asthme ou la BPCO.

#### II.4.2.4. Mécanismes épigénétiques

L'ensemble des mécanismes détaillés ci-dessus peuvent être médiés par des modifications épigénétiques.

L'épigénétique correspond à « l'étude des changements dans l'activité des gènes, n'impliquant pas de modification de la séquence d'ADN et pouvant être transmis lors des divisions cellulaires » (Inserm, 2017b). Les modifications épigénétiques sont liées à l'environnement au sens large et peuvent évoluer tout au long de la vie. Elles sont donc étroitement liées à l'exposome. Elles peuvent être réversibles ou pérennes, c'est-à-dire persistantes lorsque le signal qui les a induites disparaît. Ces modifications sont physiologiques et sont responsables de la différenciation cellulaire, du phénotype d'un individu et de l'ensemble des capacités fonctionnelles d'un organisme permettant son adaptation à l'environnement. Cependant, dans certains cas, les phénomènes épigénétiques peuvent être responsables du développement ou de l'exacerbation d'une pathologie.

Les principaux mécanismes épigénétiques sont (Figure 15) (Surace & Hedrich, 2019) :

- la méthylation et hydroxyméthylation de l'ADN (au niveau des îlots CpG) ;
- la modification post-transcriptionnelle des histones (acétylation, méthylation) ;
- l'expression des ARN non-codants (longs ARN non codants et micro-ARN).



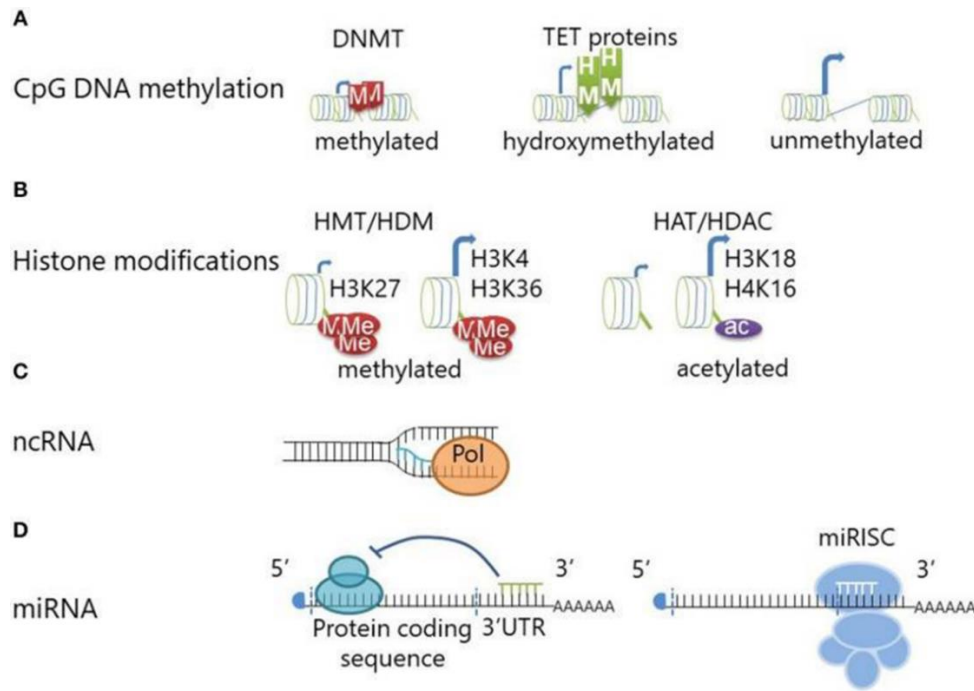


Figure 15 : Les principales modifications épigénétiques : A. Méthylation et hydroxyméthylation de l'ADN, B. Modifications des histones, C et D. ARN non codants (longs ARN non codants et micro-ARN) (Surace & Hedrich, 2019)

Avant de détailler les différents mécanismes épigénétiques, rappelons que l'ADN est une molécule qui s'enroule régulièrement autour de complexes formés par des protéines nommées histones (un complexe est formé de deux exemplaires de chacune des histones H2A, H2B, H3 et H4). Les structures ainsi constituées sont nommés nucléosomes. Ils s'enroulent sur eux-mêmes de manière plus ou moins « serrée », formant ainsi des fibres de chromatine plus ou moins denses (Figure 16). Lorsque la chromatine est très dense (hétérochromatine), les gènes ne sont pas accessibles aux facteurs de transcription et aux ARN polymérase et ne sont donc pas exprimés. Les zones de la chromatine peu condensée (euchromatine) sont en revanche accessibles aux complexes enzymatiques qui permettent l'expression des gènes. Certaines modifications épigénétiques permettent à la chromatine de passer de l'un à l'autre de ces états. Lorsque l'ADN est accessible aux facteurs de transcription et aux ARN polymérase, il est transcrit en ARN messager (ARNm). Suite à un phénomène d'épissage, l'ARNm est traduit en protéine. Certains mécanismes épigénétiques vont empêcher la traduction de l'ARNm évitant ainsi la production de protéine.

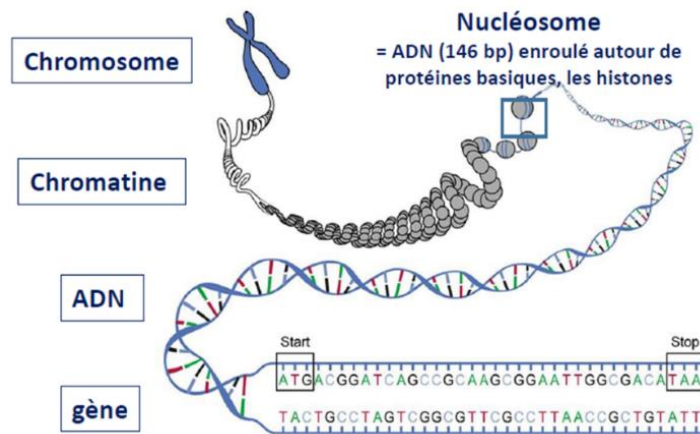


Figure 16 : Organisation de la chromatine (Source : Sawakinome)

#### II.4.2.4.1. Méthylation et hydroxyméthylation de l'ADN

La méthylation de l'ADN correspond à l'ajout d'un ou de plusieurs groupement(s) méthyle(s) (CH<sub>3</sub>) sur les cytosines d'îlots CpG. Les marques de méthylation localisées sur l'ADN modifient l'état de compaction de la chromatine. Généralement, la méthylation de l'ADN obstrue les aires d'arrivée des complexes de transcription, conduisant ainsi à l'inactivation des gènes concernés.

Les enzymes en charge de la méthylation de l'ADN sont les ADN méthyltransférases ou DNMTs. Les DNMT1 et DNMT2 assurent une re-méthylation de l'ADN suite à une division cellulaire permettant ainsi de copier le code épigénétique, c'est-à-dire l'ensemble des marques de méthylation, de la cellule mère aux cellules filles. Les DNMT3a et DNMT3b conduisent, quant à elles, à l'introduire de nouveaux groupes méthyles sur de l'ADN non méthylé. La méthylation *de novo* a un rôle important dans la régulation de l'expression des gènes (Hervouet et al., 2018).

L'**hydroxyméthylation** est événement épigénétique indépendant et stable résultant de l'oxydation des cytosines méthylées par la famille des dioxygénases TET (TET1-3) (Figure 17). Il s'agit d'une transition entre un état méthylé et un état déméthylé pendant laquelle la chromatine est active, permettant l'expression des gènes concernés (Kinde et al., 2015).

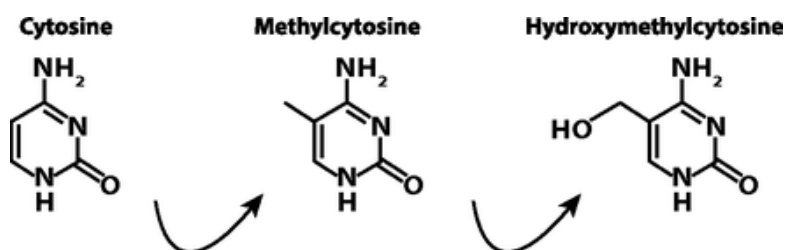


Figure 17 : Méthylation et hydroxyméthylation de la cytosine (issu de Kinde et al., 2015)

#### II.4.2.4.2. Modification des histones

Les histones peuvent subir des modifications post-traductionnelles au niveau de leur extrémité N-terminale selon plusieurs mécanismes comme l'acétylation, la méthylation et la phosphorylation. Ces modifications provoquent un changement de la charge électrique modifiant ainsi l'état de compaction de la molécule d'ADN, favorisant ou limitant l'accessibilité des gènes aux complexes de transcription. Les modifications post-traductionnelles des histones peuvent être (Bannister & Kouzarides, 2011) :

- des méthylations médiées par des histones méthyltransférases (HMT) et des histones déméthylases (HDM). En fonction de la localisation moléculaire et du degré de méthylation des histones, la chromatine peut être compactée ou décompactée ;
- des acétylations médiées par les histones acétyltransférases (HAT) (comme par exemple EP300 et CREBBP) et les histones désacétylases (HDAC). L'acétylation est généralement associée à une décompaction de l'ADN et donc à la transcription de gènes (Figure 18) (Kazantsev & Thompson, 2008) ;
- des phosphorylations.

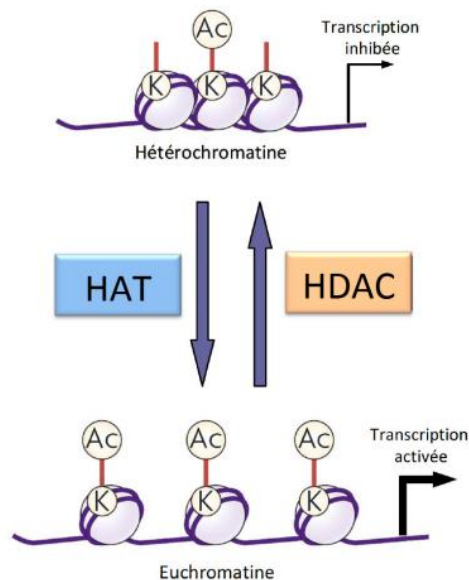


Figure 18 : Équilibre acétylation/désacétylation des histones (issu de Kazantsev & Thompson, 2008)

#### II.4.2.4.3. ARN non codants

Les ARN non codants sont des ARN pouvant provenir d'introns ou d'exons qui ne sont pas traduits en protéines. Il existe plusieurs types d'ARN non codants et notamment les larges ARN non-codants et les micro-ARN (Wei et al., 2017).

Les longs ARN non-codants sont des transcrits de régions inter-géniques permettant de réguler l'accessibilité des gènes voisins en maintenant une structure ouverte de la chromatine. Ils peuvent également médier des interactions entre un promoteur et un amplificateur distal, parfois entre deux chromosomes différents.

Les micro-ARN sont des petits ARN non codants de 21 à 25 nucléotides. Ils permettent une régulation fine de l'expression des gènes. Ils s'apparentent à un ARN messager entraînant ainsi une inhibition de la traduction ou une dégradation de l'ARN messager. Les micro-ARN permettent l'extinction de l'expression d'un gène.

#### II.4.2.4.4. Rôle des mécanismes épigénétiques dans l'impact des PM<sub>2.5</sub>

**La méthylation de l'ADN** est un mécanisme épigénétique essentiel impliqué dans la régulation de l'expression génique. Plusieurs études expérimentales ont exploré son rôle dans l'impact des PM<sub>2.5</sub>.

Une première étude *in vitro* publiée en 2020, a recherché l'effet d'expositions aux PM<sub>2.5</sub> sur la méthylation de l'ADN. Les auteurs ont exposé des cellules 16HBE à différentes concentrations de PM<sub>2.5</sub> durant 24h. Ils ont observé une modification dose-dépendante du niveau de méthylation de l'ADN. Une analyse d'enrichissement fonctionnel a permis de révéler que les sites de méthylation différentielle étaient associés à des gènes impliqués dans les voies de carcinogénèse, suggérant un lien entre la méthylation de l'ADN et une pathologie respiratoire, le cancer du poumon (B. Wang et al., 2020). Cependant, dans cette étude, les auteurs n'ont pas évalué la modulation de l'expression génique, laissant ainsi une question sur l'impact fonctionnel des modifications du méthylome.

Une étude *in vitro* plus récente a exploré à la fois le méthylome et le transcriptome. Des cellules BEAS-2B ont été exposées aux PM<sub>2.5</sub> de façon unique (1 ou 30µg/cm<sup>2</sup> pendant 24h) ou répétée (1µg/cm<sup>2</sup> une fois par jour pendant 7 jours). Les résultats ont montré que les expositions provoquaient des modifications significatives dans la modulation de l'expression de nombreux gènes, notamment de gènes impliqués dans le métabolisme (*CYP1A1*, *CYP1B1*, etc.), l'inflammation (*IL-6*, *IL-1β*, etc.) et le stress oxydant (*Nrf2*, etc.). Ces changements d'expression étaient dose-dépendants et différaient entre les expositions uniques et répétées. De plus, la plupart des gènes différentiellement exprimés présentaient également des changements de méthylation de l'ADN, principalement des hypométhylations. Les sites de méthylation différentielle étaient spécifiques à certaines régions de l'ADN, telles que les régions intergéniques pour l'hypométhylation et les promoteurs et les exons pour l'hyperméthylation. Concernant l'expression des gènes impliqués dans les modifications épigénétiques, aucune modulation de l'expression des

DNMTs n'a été observée. Cependant, l'expression des gènes des enzymes TET (*TET1*, *TET2*, et *TET3*), impliquées dans la déméthylation de l'ADN, était augmentée après des expositions répétées aux PM<sub>2.5</sub>. L'augmentation de l'expression de ces gènes pourrait expliquer en partie les hypométhylations observées (S. K. Huang et al., 2021).

Une étude *in vivo* s'est spécifiquement intéressée au rôle de la méthylation de l'ADN dans la réponse métabolique suite à des expositions aux PM<sub>2.5</sub>. Ainsi, Wu et al. ont exposé des souris pendant 12 semaines à des PM<sub>2.5</sub> à des concentrations retrouvées dans l'atmosphère réelle. Cette étude a montré que l'exposition aux PM<sub>2.5</sub> modulait l'expression des CYP450, avec notamment une augmentation de l'expression de *CYP1A1*. De plus, l'hypométhylation du promoteur de *CYP1A1* était inversement corrélée à son expression, soulignant le lien entre la méthylation de l'ADN et l'expression génique dans le contexte des expositions aux PM<sub>2.5</sub>. Cette étude a également révélé que des modifications épigénétiques se produisaient en réponse à des expositions simulant la réalité de la pollution atmosphérique, soulignant ainsi la toxicité des concentrations de PM<sub>2.5</sub> présentes dans l'atmosphère (M. Wu et al., 2023).

**L'acétylation des histones** est un mécanisme épigénétique moins exploré dans le contexte des expositions aux PM<sub>2.5</sub>. Cependant, quelques études *in vivo* menées sur la souris ont mis en lumière son importance.

Zhou et al., 2019 ont montré, à l'aide d'un modèle de souris rendues asthmatiques par injection intrapéritonéale d'ovalbumine, que l'exposition aux PM<sub>2.5</sub> exacerbait l'asthme en augmentant le pourcentage de lymphocytes T<sub>H</sub>2 au détriment des lymphocytes T<sub>H</sub>1. Cette augmentation était corrélée avec une hyperacétylation des histones H3K9 et H3K14 dans le promoteur du gène *IL-4* des lymphocytes T<sub>H</sub> CD4<sup>+</sup>, suggérant un rôle crucial de l'acétylation des histones dans les effets des PM<sub>2.5</sub> sur l'asthme. L'augmentation de l'expression de *EP300* et la diminution de l'expression de *HDAC1* pourraient en partie expliquer l'hyperacétylation du promoteur de l'*IL-4* observée dans cette étude (Zhou et al., 2019).

Les HDACs semblent donc avoir un effet protecteur lors d'expositions aux PM<sub>2.5</sub>. En effet, dans une autre étude, Gu et al. ont démontré que des souris déficientes en HDAC3 exprimaient davantage de signaux inflammatoires, avec notamment une augmentation de l'expression de *TLR4* et de *NF-κB* après exposition aux PM<sub>2.5</sub>. Ces résultats indiquent un rôle régulateur des HDACs dans la réponse inflammatoire face aux PM<sub>2.5</sub> (Gu et al., 2017).

**Les ARN non codants** ont suscité un grand intérêt dans les études portant sur l'impact des PM<sub>2.5</sub>, et des études expérimentales ont permis de mieux comprendre leurs implications dans ce contexte.

Un article de revue, publié récemment, a synthétisé les principales avancées concernant les ARN non codants impliqués dans la toxicité des PM<sub>2.5</sub> (Aghaei-Zarch et al., 2023). Les études, principalement menées à l'aide de lignées cellulaires ou de modèles animaux, ont révélé que l'exposition aux PM<sub>2.5</sub> pouvait entraîner des altérations dans l'expression de certains micro-ARN et de longs ARN non codants. De plus, il est apparu que ces mécanismes épigénétiques pouvaient exercer une influence régulatrice sur d'autres processus biologiques, notamment l'inflammation et le stress oxydant.

Par exemple, une étude *in vitro* utilisant un modèle de cellules BEAS-2B a démontré que l'exposition aux PM<sub>2.5</sub> entraînait une diminution de l'expression du micro-ARN miR-331. Ce micro-ARN cible l'inhibiteur du NF- $\kappa$ B (IKK $\beta$  : *inhibitor of NF- $\kappa$ B kinase beta*), ce qui conduit à une augmentation de l'expression et de l'activation du NF- $\kappa$ B, un facteur de transcription central dans les réponses inflammatoires. Il en résulte notamment une augmentation de l'expression des gènes des cytokines pro-inflammatoires *IL-6* et *IL-8* (Song et al., 2017). Par ailleurs, dans une autre étude utilisant un modèle de lignée de macrophages alvéolaires, il a été démontré que l'expression du long ARN non codant lncRNA ABR07005593.1 était augmentée après exposition aux PM<sub>2.5</sub>. Cette étude a révélé que lncRNA ABR07005593.1 jouait un rôle pro-inflammatoire en régulant le niveau d'*IL-6* également *via* l'activation de la voie de signalisation NF- $\kappa$ B (Liao et al., 2021).

Chez le rat, une augmentation de l'expression du micro-ARN miR-155 a été constatée dans les tissus pulmonaires après exposition aux PM<sub>2.5</sub>. Cette augmentation était positivement corrélée à une élévation de l'expression de gènes pro-inflammatoires tels que *TNF- $\alpha$* , *IL-6* et *IL-1 $\beta$* , suggérant une implication de miR-155 dans les réponses inflammatoires. Toutefois, les voies de signalisation spécifiques impliquées n'ont pas été élucidées (N. Li et al., 2018).

Par ailleurs, les ARN non-codants jouent également un rôle dans le stress oxydant. Une étude *in vitro* utilisant un modèle de cellules BEAS-2B a montré une augmentation de l'expression du micro-ARN miR-155 après exposition aux PM<sub>2.5</sub>. Ce micro-ARN aggrave l'effet toxique des PM<sub>2.5</sub> en réduisant l'expression des gènes *SOD* et *CAT*, favorisant ainsi un stress oxydant (J. Li et al., 2021). Il est à noter que cette augmentation de miR-155 peut être régulée par le facteur de transcription NF- $\kappa$ B, soulignant, une fois de plus, le lien étroit entre le stress oxydant et l'inflammation (Xiao et al., 2019).

## II.5. Conclusion de l'état de l'art et objectifs

Les PM<sub>2.5</sub> sont omniprésentes dans l'environnement et font partie intégrante de notre exposome. De nombreuses études épidémiologiques ont mis en évidence des associations entre l'exposition aux PM<sub>2.5</sub> et le développement ou à l'exacerbation de pathologies respiratoires telles que l'asthme et la BPCO, faisant des PM<sub>2.5</sub> un enjeu majeur de santé publique.

Caractérisées par un petit Dae ( $\leq 2,5 \mu\text{m}$ ), les PM<sub>2.5</sub> ont la capacité de pénétrer profondément dans l'appareil respiratoire humain. Les nombreux composés organiques et inorganiques adsorbés à leur surface, en lien avec leurs sources d'émission, font des PM<sub>2.5</sub> un mélange hétérogène et complexe à forte réactivité biologique. De nombreuses études publiées indiquent que plusieurs mécanismes, dont l'inflammation, le stress oxydant et les activités métaboliques, peuvent être déclenchés en réponse aux PM<sub>2.5</sub>. Ces différents mécanismes interagissent entre eux au niveau de l'appareil respiratoire, comme illustré sur la Figure 19. Les travaux de recherche publiés ces dernières années suggèrent de plus en plus l'implication de mécanismes épigénétiques complexes dans la régulation de ces différentes voies de signalisation.

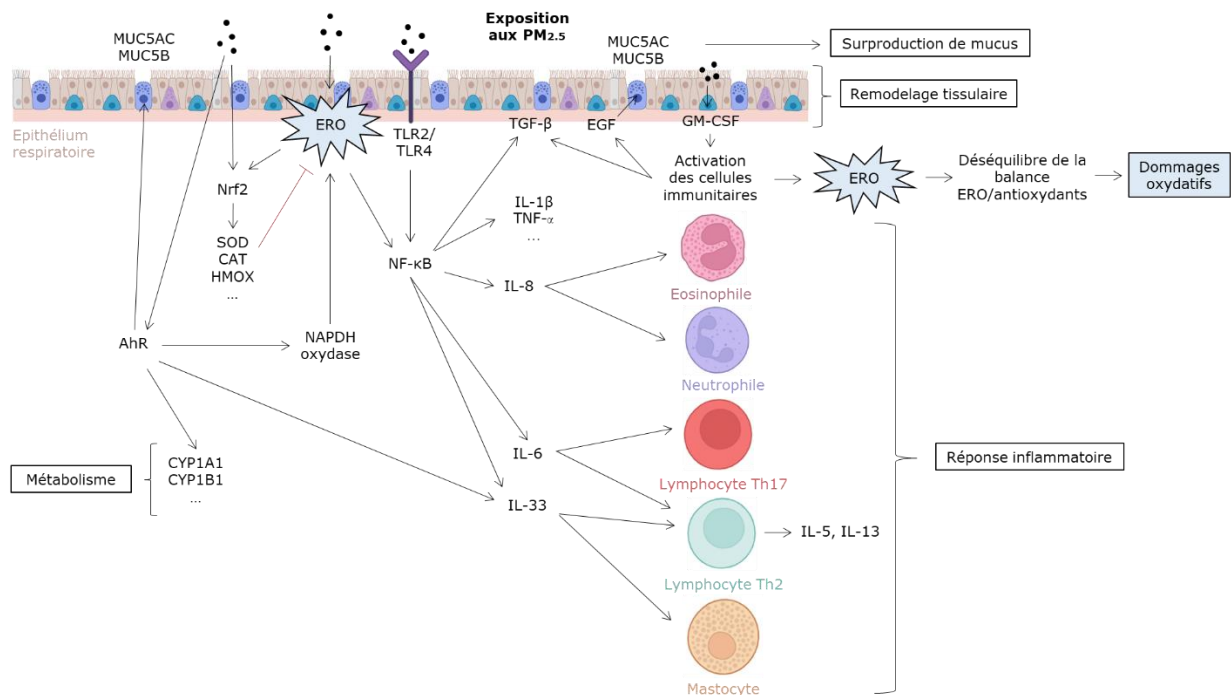


Figure 19 : Exemples de mécanismes se mettant en place au niveau des cellules de l'arbre respiratoire suite à des expositions aux PM<sub>2.5</sub>

Cependant, les mécanismes cellulaires, moléculaires et épigénétiques se mettant en place suite à des expositions aux PM<sub>2.5</sub> demeurent encore imparfaitement élucidés. Ils ne permettent pas, à ce jour,

de déterminer de manière certaine comment les expositions aux PM<sub>2.5</sub> peuvent conduire au développement ou à l'exacerbation de l'asthme ou de la BPCO.

Les études *in vitro* publiés présentent certaines limites. D'une part, la plupart des modèles *in vitro* utilisés sont éloignés de la physiologie de l'épithélium *in situ* et ne permettant pas de considérer différents statuts physiopathologiques et d'autre part, peu d'études prennent en compte le rôle de la composition chimique des PM<sub>2.5</sub> dans l'évaluation de leur impact.

Afin d'approfondir les connaissances sur l'impact des PM<sub>2.5</sub> au niveau des voies respiratoires, de nouvelles pistes de recherche doivent donc être explorées.

Une première voie d'amélioration serait de mettre en place des expérimentations avec des modèles se rapprochant de la physiologie de l'appareil respiratoire *in situ* et des conditions réelles d'exposition. La plupart des études publiées ont recours soit à des modèles *in vivo*, soulevant des problèmes de transposition inter-espèces, soit à des modèles *in vitro* utilisant des cellules immortalisées, qui s'éloignent de la physiologie de l'épithélium respiratoire *in situ*. De plus, les études *in vitro* publiées impliquent généralement des scénarios d'exposition unique sur des durées relativement courtes, qui diffèrent des conditions réelles d'exposition aux PM<sub>2.5</sub>.

Une deuxième voie pour améliorer les connaissances sur l'impact des PM<sub>2.5</sub>, serait de considérer la vulnérabilité de certains individus face à cette pollution particulaire. Il semble important d'explorer les réponses cellulaires et moléculaires faisant suite à des expositions aux PM<sub>2.5</sub> en fonction du statut physiopathologique des individus, une dimension souvent négligée dans les études *in vitro*. Les personnes atteintes d'asthme ou de BPCO présentent une inflammation chronique des voies respiratoires, ce qui pourrait entraîner des réponses cellulaires et moléculaires différentes suite à des expositions aux PM<sub>2.5</sub> par rapport aux individus sans pathologie respiratoire. L'étude des réponses différenciées suite à des expositions aux PM<sub>2.5</sub> en fonction des statuts physiopathologiques devrait permettre de mieux comprendre les vulnérabilités individuelles.

Enfin, une troisième voie d'amélioration serait de considérer le rôle de la composition chimique des PM<sub>2.5</sub> dans l'évaluation de leur impact sur les mécanismes cellulaires et moléculaires au niveau de l'épithélium respiratoire. À ce jour, il existe peu d'études ayant comparé l'impact de PM<sub>2.5</sub> de composition chimique différente, et peu d'études ayant investigué quelle fraction constitutive des PM<sub>2.5</sub> (organique ou inorganique) est principalement responsable des effets observés, ou contribue de manière prédominante à ces effets. Ces données pourraient permettre de reconsidérer la réglementation actuelle des polluants particuliers qui repose uniquement sur leur taille, négligeant leur composition chimique variable en fonction de la source d'émission.



C'est dans ce contexte que s'inscrit ce travail de thèse, dont l'**objectif principal** est de contribuer à l'amélioration des connaissances sur l'impact des PM<sub>2.5</sub> sur les mécanismes cellulaires et moléculaires intervenant après exposition de cellules épithéliales bronchiques humaines.

En utilisant deux modèles *in vitro* complémentaires, un modèle d'épithélium humain reconstruit d'origine bronchique et un modèle de cellules épithéliales bronchiques pseudo-primaires, nous tenterons de répondre aux questions suivantes :

- Existe-t-il un impact différentiel des PM<sub>2.5</sub> sur les réponses cellulaires et moléculaires en fonction du statut physiopathologique des individus ?
- Existe-t-il un impact différentiel des PM<sub>2.5</sub> en fonction de leur source d'émission, et donc de leur composition chimique ?
- Peut-on associer à une fraction constitutive des PM<sub>2.5</sub>, organique ou inorganique, un ou plusieurs effet(s) cellulaire(s) et moléculaire(s) propre(s) ?

### III. Matériel et Méthodes

---



La partie Matériel et Méthodes détaillée ci-après est commune aux différentes études présentées dans la partie Résultats de ce manuscrit. Un complément méthodologique spécifique à chaque étude sera fourni en amont de chacune dans la partie Résultats.

### III.1.Particules étudiées

Les particules fines utilisées dans ce travail sont issues d'un précédent projet, financé par l'Anses (APR EST-2016-1-060). Elles ont été prélevées et caractérisées par l'Unité de Chimie Environnementale et Interactions sur le Vivant (UCEIV, EA4492, A. Verdin, D. Courcot) et le Centre Commun de Mesures (CCM, F. Cazier), Université du Littoral Côte d'Opale, Dunkerque.

*Remarque : Le prélèvement et la caractérisation des particules ont été réalisés avant le début de ma thèse. Je n'ai pas participé à ce travail.*

#### III.1.1. Modalités de collecte des particules

##### III.1.1.1. Sites de collecte

Les particules ont été collectées de février à juin 2017 sur deux sites dans la région Haut de France : Grande Synthe-Dunkerque, une zone avec une forte activité industrielle sidérurgique et chimique (vapocraqueur, stocks pétroliers) et Roubaix, une zone urbaine qui enregistre un trafic routier dense. Les sites de prélèvement sont indiqués sur les Figures 20 et 21.

Dans la suite de ce travail, les particules étudiées seront nommées PMInd pour les particules d'influence industrielle et PMTraf pour les particules d'influence trafic.



Figure 20 : Site de prélèvement de Grande-Synthe-Dunkerque



Figure 21 : Site de prélèvement de Roubaix

Les dispositifs de prélèvement des particules ont été installés sur des stations de mesure ATMO (Fédération des Associations agréées de surveillance de la qualité de l'air) de la région des Hauts de France. Les caractéristiques de ces stations de mesure sont présentées dans le Tableau V.

Tableau V : Caractéristiques des stations de mesure

Station Grande-Synthe - Dunkerque (ref. DK1)	Station Roubaix Serres (ref. MN1)
	
<p><b>Adresse :</b> 4 rue du Comte Jean (jardins communaux) 59760 Grande-Synthe</p>	<p><b>Adresse :</b> Serres Municipales 59100 Roubaix</p>
<p><b>Type de station :</b> Station de proximité <b>industrielle</b></p>	<p><b>Type de station :</b> Station de proximité <b>automobile</b></p>
<p>Latitude : 51° 1' 29" Longitude : 2° 18' 8" Altitude : 2 m</p>	<p>Latitude : 50° 42' 24" Longitude : 3° 10' 51" Altitude : 31 m</p>
<p><b>Polluants mesurés :</b> ----- Particules (PM<sub>10</sub>) Monoxyde de carbone Dioxyde d'azote Monoxyde d'azote Dioxyde de soufre</p>	<p><b>Polluants mesurés :</b> Particules (PM<sub>2.5</sub>) Particules (PM<sub>10</sub>) Monoxyde de carbone Dioxyde d'azote Monoxyde d'azote -----</p>

### III.1.1.2. Méthode de prélèvement des particules

La méthode de prélèvement des particules a été décrite par Cazier et collaborateurs (Cazier et al., 2016). Les dispositifs de prélèvement comprenaient une pompe à haut débit (Staplex, modèle TFIA2, New York, USA) et un impacteur en cascade de type Sierra 235 (Sierra Anderson, Smyrna, New York, USA).

Le principe de la méthode de prélèvement reposait sur l'impaction des particules sur des plaques avec des seuils de coupure spécifiques (Figure 22), avec une efficacité d'impaction de 50%. Les particules dans le flux d'air ont été accélérées à travers une fente, ce qui permettait aux particules animées d'une inertie suffisante de s'écarter de la trajectoire et de s'impacter sur le substrat de collection recouvrant les plaques. Les particules qui n'étaient pas encore impactées, étaient dirigées vers les étages inférieurs. Ainsi, les particules les plus grosses ont été collectées sur les premiers étages, tandis que les plus petites ont été collectées sur les derniers étages.

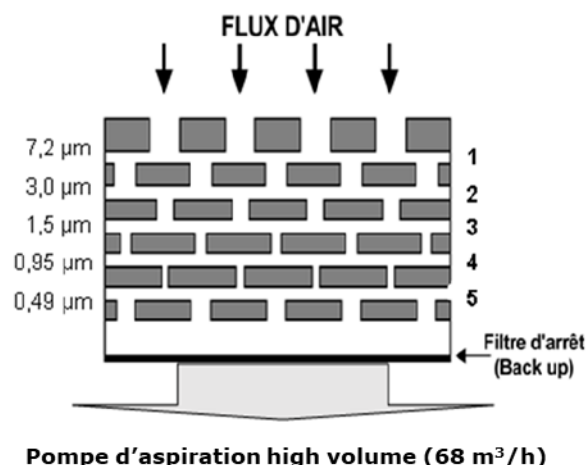


Figure 22 : Schéma d'un impacteur en cascade

Les particules ont ainsi été collectées sélectivement en fonction de leur taille aérodynamique. Après la collecte, les plaques d'impaction ont été séchées sous une hotte à flux laminaire pendant au moins une journée. Les particules ont ensuite été récupérées en balayant les plaques à l'aide d'un pinceau. Pour chaque échantillon, les particules ont été rassemblées dans des récipients en Téflon-PFA. Ensuite, les échantillons ont été soigneusement homogénéisés à l'aide de deux billes magnétiques revêtues de Téflon et d'un agitateur magnétique pendant 2 heures. Les échantillons lyophilisés obtenus ont été stockés à  $-20^{\circ}\text{C}$ , dans des flacons préalablement décontaminés et stérilisés, jusqu'à leur utilisation.

Les particules sélectionnées pour ce travail de thèse avaient une taille comprise entre  $2,5\ \mu\text{m}$  et  $0,33\ \mu\text{m}$ , et sont désignées sous le terme de PM<sub>2.5-0.3</sub>.

### III.1.2. Caractéristiques physico-chimiques des particules

La distribution granulométrique et la morphologie des PM<sub>2.5-0.3</sub> ont été déterminées par microscopie électronique à balayage couplée à une analyse des rayons X par dispersion d'énergie (SEM-EDX; microscope Leo™ 438 VP et système d'analyse IXRF; Zeiss SAS, Le Pecq, France). Les analyses chimiques ont été réalisées à l'aide d'une spectrométrie d'émission atomique à plasma inductif (ICP-AES, iCAP 6000 Series ; Thermo Scientific, MA, États-Unis) pour les métaux, d'une analyse spécifique pour les éléments carbone, hydrogène, oxygène, azote, soufre (C, H, O, N, S) (Flash 2000, Thermo Scientific, MA, États-Unis) et d'une chromatographie en phase gazeuse couplée à une spectrométrie de masse après extraction Soxhlet (GC/MS : CP 3800/1200MS, Varian) pour les composés organiques. Les principaux résultats sont présentés dans les tableaux ci-dessous (Tableau VI, Tableau VII, Tableau VIII).

Tableau VI : Niveau d'hydrocarbures aromatiques polycycliques en µg/g quantifiés dans les PM Traf et les PM Ind

<b>Hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs)</b>	<b>PMTraf (µg/g)</b>	<b>PMInd (µg/g)</b>	<b>PMInd/PMTraf</b>
Naphthalène	0,24	1,07	4,54
Acénaphthylène	0,12	0,18	1,51
Acénaphthène	0,00	0,00	-
Fluorène	0,09	0,31	3,59
Phénanthrène	0,48	1,92	4,00
Anthracène	0,18	0,56	3,14
Fluoranthène	0,86	6,00	7,01
Pyrène	0,83	5,24	6,28
Benzo[a]Anthracène	0,65	10,14	15,57
Chrysène	2,60	20,54	7,92
Benzo[b]Fluoranthène	2,33	19,99	8,58
Benzo[k]Fluoranthène	0,56	7,08	12,69
Benzo[a]Pyrène	1,70	15,47	9,08
Indeno[1,2,3-c,d]Pyrène	4,18	16,93	4,05
Dibenzo[a,h]Anthracène	2,57	18,18	7,07
Benzo[g,h,i]Perylène	2,96	12,77	4,31
<b>Total</b>	<b>17,77</b>	<b>136,39</b>	<b>7,68</b>

Tableau VII : Niveau de composés hydrocarbonés en µg/g quantifiés dans les PM Traf et les PM Ind

<b>Composés hydrocarbonés</b>	<b>PMTraf (µg/g)</b>	<b>PMInd (µg/g)</b>	<b>PMTraf/PMInd</b>
C12	0,43	0,41	1,04
C13	0,35	0,66	0,53
C14	0,22	0,54	0,41
C15	0,55	0,72	0,77
C16	2,22	1,23	1,80
C17	4,07	2,62	1,55
Pristane	1,87	1,20	1,56
C18	4,41	3,33	1,32
Phytane	9,10	7,05	1,29
C19	4,02	2,25	1,79
C20	4,62	3,29	1,40
C21	7,96	5,19	1,54
C22	11,34	9,26	1,22
C23	23,48	13,84	1,70
C24	29,83	13,04	2,29
C25	42,40	22,15	1,91
C26	30,14	10,51	2,87
C27	53,40	35,76	1,49
C28	24,06	7,37	3,27
C29	56,60	45,79	1,24
C30	23,52	4,99	4,71
C31	46,16	25,74	1,79
C32	21,86	3,56	6,15
C33	30,34	12,14	2,50
C34	16,38	2,04	8,03
C35	9,76	1,68	5,80
C36	7,50	0,90	8,31
C37	3,99	1,96	2,04
C38	0,23	0,25	0,94
<b>Total</b>	<b>903,09</b>	<b>235,83</b>	<b>3,83</b>



Tableau VIII : Teneur en métaux totaux en µg/g quantifiés dans les PM Traf et les PM Ind

Métaux totaux	PMTraf (µg/g)	PMInd (µg/g)	PMInd/PMTraf
Al	11,869	23,800	2,01
As	9	9	1,00
Ba	932	285	0,31
Ca	35,691	76,087	2,13
Cd	9	9	1,00
Co	13	20	1,48
Cr	251	266	1,06
Cu	933	276	0,30
Fe	38,078	87,549	2,30
K	8 053	6,677	0,83
Mg	2 701	9,307	3,45
Mn	555	6,692	12,06
Mo	36	22	0,62
Na	23,221	27,051	1,16
Ni	59	467	7,85
P	979	1 030	1,05
Pb	210	246	1,17
S	15,070	16,338	1,08
Sn	270	47	0,17
Sr	153	141	0,92
Ti	1,631	1,288	0,79
V	73	134	1,84
Zn	1,257	1,841	1,46
<b>Total</b>	<b>142,054</b>	<b>259,582</b>	<b>1,83</b>

### III.1.3. Préparation des particules pour les expositions *in vitro*

À partir des PMInd ou des PMTraf lyophilisées, des solutions mères fortement concentrées (1 mg/mL) ont été préparées. Une quantité déterminée de PMInd ou PMTraf a été pesée avec une balance de précision et un volume de milieu de culture hAECT™ (Epithelix©, Suisse), supplémenté avec 0,2 % de Fungizone® (Amphotéricine B, Invitrogen©, États-Unis), a été ajouté.

Afin de minimiser la formation d'agrégats, les solutions mères contenant les PMInd ou les PMTraf en suspension ont été soumises à une sonication dans un bain de sonication (Branson 1800, 40 kHz) pendant 20 minutes. Puis, des dilutions ont été effectuées pour obtenir les concentrations

souhaitées pour les expositions *in vitro*. Les solutions d'exposition résultantes ont été aliquotées et conservées à -20°C jusqu'à leur utilisation.

Le jour des expositions, les solutions d'exposition ont été décongelées, puis soniquées durant 20 minutes afin de réduire la formation d'agrégats particulaires. Les expositions ont été réalisées suite à la sonication.

## III.2. Modèles cellulaires

Deux modèles *in vitro* ont été utilisés au cours de ce travail de thèse : un modèle 3D d'épithélium bronchique humain reconstruit (MucilAir™-HF) et un modèle 2D de cellules épithéliales humaines pseudo-primaires d'origine bronchique (hAECb). Ces deux modèles sont commercialisés par la société Epithelix© (Suisse).

Ces modèles *in vitro* ainsi que les protocoles d'exposition seront détaillés dans le Matériel et Méthodes spécifique en amont de chacune des études de la partie Résultats.

## III.3. Évaluation de l'activité biologique

À la fin des différents scénarios envisagés, les milieux de culture ont été récupérés et conservés au congélateur à -20°C en vue d'évaluer la réponse inflammatoire par tests ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*). Les épithéliums et les cellules ont été congelés à -80°C en vue d'évaluer la modulation de l'expression génique par RT-qPCR (*Reverse Transcription quantitative Polymerase Chain Reaction*).

### III.3.1. Évaluation de l'expression génique par RT-qPCR

#### III.3.1.1. Principe de la RT-qPCR

La RT-qPCR est une technique qui permet d'effectuer une PCR (réaction en chaîne par polymérase) quantitative à partir d'un échantillon d'ARN. L'ARN est tout d'abord rétrotranscrit à l'aide d'une enzyme appelée transcriptase inverse, permettant ainsi la synthèse d'ADN complémentaire (ADNc). Ce dernier est ensuite utilisé pour réaliser une PCR quantitative (qPCR). La qPCR est une méthode de réaction en chaîne par polymérase qui permet de mesurer la quantité initiale d'ADN en déterminant le nombre d'amplicons (portions spécifiques d'ADN définies par un ensemble d'amorces) générés pendant la réaction de PCR en détectant la fluorescence émise par les produits de PCR nouvellement formés (Figure 23).

### Reverse transcription quantitative real-time PCR (RT-qPCR)

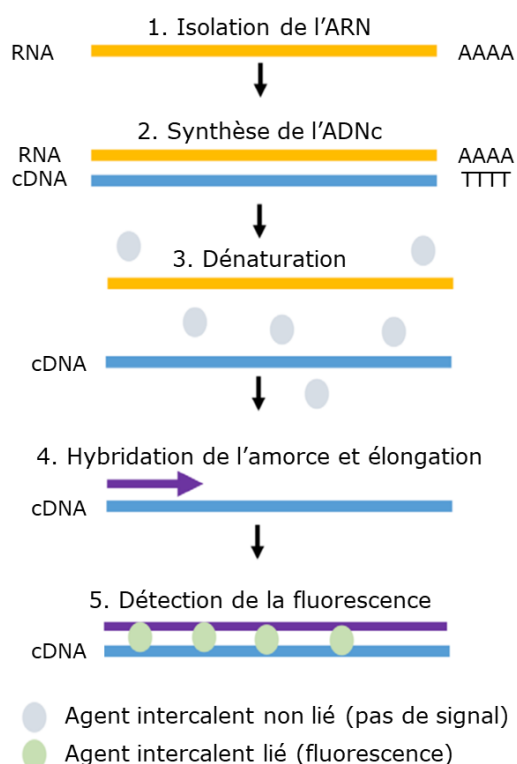


Figure 23 : Principe de la RT-qPCR (source : Adams, 2020)

La RT-qPCR est largement reconnue comme la méthode la plus sensible pour la détection et la quantification des ARN messagers au niveau d'un organe, d'un tissu ou d'une cellule.

#### III.3.1.2. Protocole

La première étape est l'extraction de l'ARN des épithéliums ou des cellules. L'ARN a été extrait à l'aide du kit NucléoSpin® TriPrep (Macherey-Nagel, Allemagne), qui permet d'extraire l'ADN, l'ARN et les protéines à partir des échantillons. Les ARN extraits ont ensuite été convertis en ADN complémentaire (ADNc), un ADN simple brin, par une réaction de transcription inverse (RT, *reverse transcription*) grâce au kit iScript™ cDNA Synthesis (Bio-Rad, États-Unis). L'ADNc représente la partie codante de la région du génome qui avait été transcrite en ARN (Figure 24).

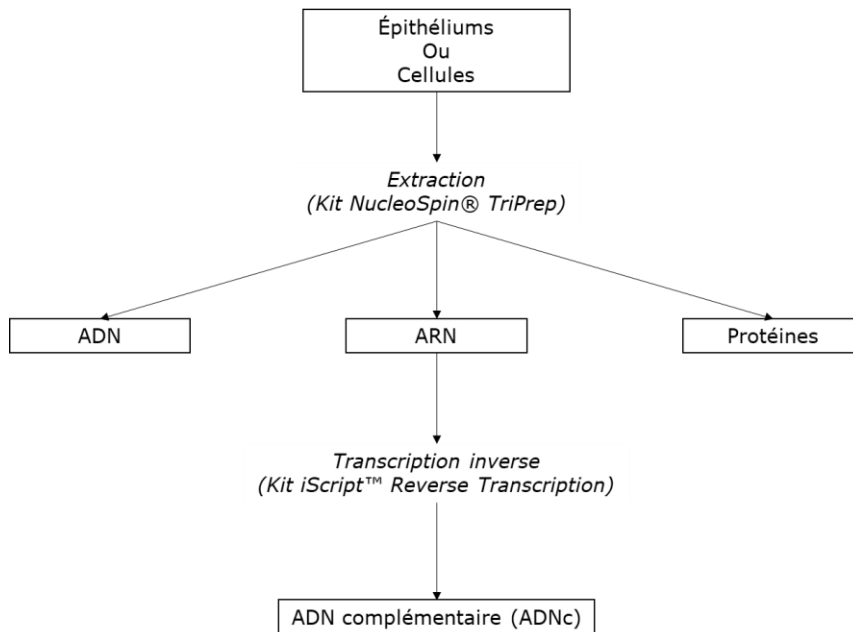


Figure 24 : Protocole d'extraction des ARN et d'obtention des ADN complémentaires

Puis, la quantité d'ADNc a été mesurée par une réaction de polymérisation en chaîne quantitative en utilisant le mix iQ™ SYBR® Green Supermix (Bio-Rad, États-Unis) et des amorces spécifiques (Tableau IX).

La PCR est une technique d'amplification enzymatique permettant d'obtenir un grand nombre de copies identiques d'un fragment d'ADN. Les réactifs nécessaires sont :

- l'ADNc à amplifier,
- des amorces spécifiques de la séquence d'ADNc à amplifier,
- une enzyme, une ADN polymérase thermotolérante, la TAQpolymérase,
- des désoxyribonucléosides triphosphates.

Une PCR se décompose en trois étapes :

- dénaturation : les deux brins d'ADN sont séparés par chauffage (95 °C),
- hybridation : en abaissant la température (50-70 °C), des amorces constituées de courts fragments d'ADN viennent s'hybrider sur les brins d'ADN,
- élongation : une enzyme polymérase, la Taq polymérase, complète la synthèse du brin d'ADN à partir de l'amorce grâce aux désoxyribonucléosides triphosphates.

La qPCR est une technique quantitative déterminant la quantité d'ADN produite par la réaction de PCR à la fin de chaque cycle. Pour cela, un agent intercalant de l'ADN fluorescent, le SYBR Green, a été ajouté au milieu réactionnel. La fluorescence du SYBR Green varie selon que cet agent est

incorporé à une double hélice d'ADN ou est libre dans la solution. Ainsi, une simple mesure de fluorescence permet de connaître la quantité d'ADN présente en solution.

L'évaluation de l'expression d'un gène se fait par la mesure d'un Ct (cycle seuil, Cycle threshold), valeur correspondant au nombre de cycles à partir duquel un signal est détectable (Figure 25). Le Ct est inversement proportionnel à la quantité de matériel génétique présente dans l'échantillon analysé ; plus le Ct est petit, plus le gène est exprimé.

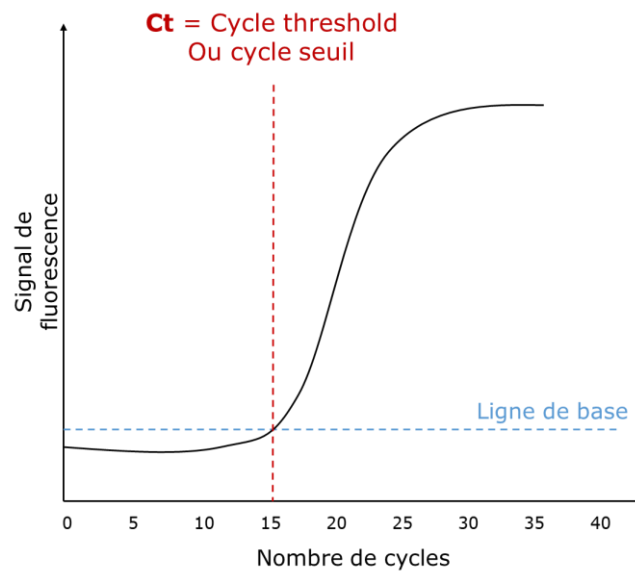


Figure 25 : Courbe d'amplification d'une réaction de PCR et détermination du Ct

Grâce à des réaction de RT-qPCR l'expression de gènes impliqués dans différents mécanismes cellulaires a été évaluée (Tableau IX).

Tableau IX : Gènes de référence et gènes d'intérêt : amorces utilisées pour la réalisation des qPCR

Mécanismes étudiés	Gènes testés	Amorces utilisées			
Référence	<i>GAPDH</i>	F	AAAGGGTCATCATCTCTGCC	R	AGGGGTGCTAAGCAGTTGGT
	<i>HPRT</i>	F	TTGCTTTCCTTGTCAGGCA	R	ATCCAACACTTCGTGGGGTC
	<i>RPL13</i>	F	GAATGGCATGGTCTTGAAGC	R	GCTTGCCGGGCCTTAC
Inflammation	<i>CXCL2</i>	F	TCACAGTGTGTGGTCAACATTT	R	TCTCTGCTCTAACACAGAGGGA
	<i>CXCL10</i>	F	AGCAGAGGAACCTCCAGTCT	R	ATGCAGGTACAGCGTACAGT
	<i>GM-CSF</i>	F	TGATGGCCAGCCACTACAAG	R	CCAGCAGTCAAAGGGGATGA
	<i>IL-1<math>\beta</math></i>	F	GCCATGGACAAGCTGAGGAA	R	TCGTGCACATAAGCCTCGTT
	<i>IL-6</i>	F	GAAAGCAGCAAAGAGGCACTG	R	CCAGTGATGATTTTCACCAGGC
	<i>IL-8</i>	F	CTCCAAACCTTTCCACCCCA	R	TTCCTTGGGGTCCAGACAGA
	<i>MIF</i>	F	ATCGTAAACACCAACGTGCC	R	GAAGGCCATGAGCTGGTCC
	<i>NF-<math>\kappa</math>B</i>	F	GCTTAGGAGGGAGAGCCCAC	R	AACATTTGTTTCAGGCCTTCCC
<i>TLR4</i>	F	CCTGAGGCATTTAGGCAGCTA	R	TGGATGGGGTTTCCTGTCAA	
Métabolisme	<i>AhR</i>	F	CCAGGCCAACAGGCATTTTTTA	R	TCTGACGGATGATGAAGTGGC
	<i>CYP1A1</i>	F	CAACCCTTCCCTGAATGCCT	R	TGCTTCTCCTGACAGTGCTC
	<i>CYP1B1</i>	F	AGTGAGGGCAGCAGGTGT	R	GTTCCGGGCTGAGGCTGG
	<i>CYP2B6</i>	F	CTTCACGGTACACCTGGGAC	R	CGACCATGGCGATTTTTCCC
	<i>CYP2S1</i>	F	TTTGCTGTTTGCTGGGACGA	R	CCGATTCAGCTCCTCACGTA
Stress oxydant	<i>HMOX1</i>	F	CTTTCAGAAAGGGCCAGGTGA	R	GTAGACAGGGGCGAAGACTG
	<i>NOS2</i>	F	GGTGCACACACCTATTCCC	R	GCACATCCCCGCAAACATAG
	<i>NOX1</i>	F	TTGGGTCAACATTGGCCTGT	R	AAGGACAGCAGATTGCGACA
	<i>NRF2</i>	F	TGAGCAAGTTTGGGAGGAGC	R	TGGCTTCTGGACTTGGAAACC
	<i>SOD</i>	F	CATTGCATCATTGGCCGCA	R	CCACAAGCCAAACGACTTCC
Remodelage tissulaire	<i>EGF</i>	F	TTGTCATGCTGCTCCTCCTG	R	CCTGCGACTCCTCACATCTC
	<i>TGF-<math>\beta</math></i>	F	AGGGCTACCATGCCAACTTC	R	CCCGGGTTATGCTGGTTGT
Autophagie	<i>BECN1</i>	F	AAACCAGGAGAGACCCAGGA	R	GGGGGATGAATCTGCGAGAG
Production de mucus	<i>MUC5AC</i>	F	TATGTGCTGACCAAGCCCTG	R	TTGATCACCACCACCGTCTG
	<i>MUC5B</i>	F	TCCCTGCCACATGTGTACC	R	CCGGCCACTCTCTTGTACTC
Épigénétique	<i>DNMT1</i>	F	TCTTCGGCAACATCCTGGAC	R	CTCGGGCTTTGGCCAACATA
	<i>DNMT3a</i>	F	CAGGGCAAAGACCAGCATT	R	CAAGCGGCTCATGTTGGAGA
	<i>DNMT3b</i>	F	GCCCATTGAGTCTGTGCAT	R	CACGGTTCCAACAGCAATGG
	<i>TET1</i>	F	TTCCCCGAATCAAGCGGAAG	R	ACTTCAGGTTGCACGGTCTC
	<i>HDAC1</i>	F	CATCGCTGTGAATTGGGCTG	R	CCCTCTGGTGATACTTTAGCAGT
	<i>HDAC2</i>	F	TGGCCTTCTGAGCTGATTTT	R	AGCCACTGAAACAAGACTTCAT
	<i>HDAC3</i>	F	AGTCAGCCCCACCAATATGC	R	TGTGTAACGCGAGCAGAACT
	<i>HDAC6</i>	F	TGGTTGAAACGCTAGGGGC	R	TCTGCCTACTTCTTCGCTGC
	<i>CREBBP</i>	F	CACAGAACCAGTTCCCGTCA	R	CTGTGACACGCTGTTTGG
	<i>EP300</i>	F	GCAGTGTGCCAAACCAGATG	R	GGGTTTGCCGGGGTACAATA

## III.3.2. Évaluation de la réponse inflammatoire par test ELISA

### III.3.2.1. Principe

Le principe du dosage ELISA consiste à fixer une protéine d'intérêt (cytokine ou chimiokine) sur un anticorps primaire spécifique puis à détecter les molécules capturées grâce à un anticorps secondaire biotinylé. Une peroxydase, liée à la streptavidine, permet dans un second temps, de révéler la quantité de cytokine fixée en catalysant la formation d'un substrat coloré (Figure 26).

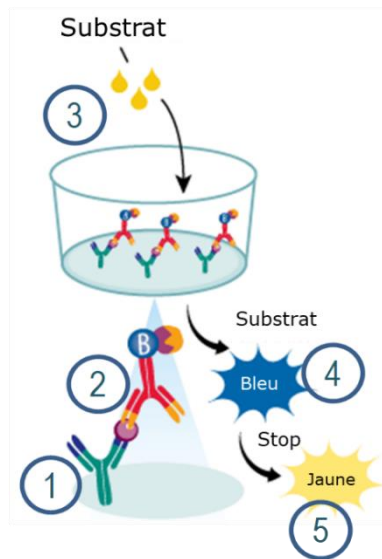


Figure 26 : Principe du test ELISA (Source : R&D Systems®)

### III.3.2.2. Protocole

La réponse inflammatoire a été évaluée par le dosage de différentes cytokines/chimiokine secrétées dans le milieu de culture à l'aide de kits ELISA DuoSet® (R&D Systems®, États-Unis). Les cytokines dosées sont l'IL-6 (#DY206) et l'IL-8 (#DY208) et la chimiokine est GM-CSF (#DY215).

Les différents kits utilisés contiennent une solution d'anticorps primaire, une solution standard, une solution d'anticorps secondaire biotinylé et une solution de streptavidine-peroxydase. Les solutions Substrat (Substrat Solution#DY999, R&D Systems, France) et Stop (Stop Solution#DY994, R&D Systems, France) sont vendues séparément. Certains réactifs comme le tampon de saturation contenant 1% d'albumine sérique bovine (BSA, Sigma-Aldrich, France), le tampon de lavage [(PBS#162323G5, Biosolve Chimie, France) à 0,05 % de Tween 20 (Tween

20#P2287, Sigma-Aldrich, France)] et le tampon de dilution (PBS-Tris) sont à préparer extemporanément.

Les différentes étapes d'un test ELISA sont résumées sur la Figure 26. 24h après avoir recouvert les plaques 96 puits (Nunc immunsorb, Dutscher, France) avec un anticorps de capture (1), 100  $\mu$ L d'échantillons à doser sont déposés dans chaque puits selon un plan de plaque établi. Après un temps d'incubation à l'obscurité et température ambiante, l'anticorps secondaire couplé à la biotine est ajouté (2). Puis la streptavidine-peroxydase va se fixer sur l'anticorps secondaire et réagir en présence d'un substrat (3) en produisant une réaction colorimétrique (4). La réaction est stoppée par l'ajout de la solution STOP (5). L'absorbance est alors mesurée à 490 nm et 540 nm (bruit de fond) à l'aide du spectrophotomètre Multiskan-EX (Thermo Scientific, MA, États-Unis).

Une gamme étalon effectuée en duplicata sur chaque plaque 96 puits permettra la réalisation d'une courbe d'étalonnage et la détermination des concentrations en cytokines/chimiokine produites de nos échantillons. Les résultats sont exprimés en pg/mL. Les limites de quantification sont de 9,37 pg/mL, 31,25 pg/mL et 15,62 pg/mL respectivement pour l'IL-6, l'IL-8 et GM-CSF.

### III.4. Analyse des données

Les données obtenues à la suite des RT-qPCR et des tests ELISA ont été analysées en collaboration avec le laboratoire de Biostatistiques, Traitement et Modélisation des données biologiques (UR 7537) de la faculté de pharmacie de l'Université Paris-Cité.

Les analyses de données ont été réalisées en utilisant le logiciel R version 4.2.2.

#### III.4.1. Analyse des données issues des RT-qPCR

##### III.4.1.1. Méthode classique des $2^{-\Delta\Delta Ct}$

La méthode de référence pour l'analyse des données de qPCR est la méthode des  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak & Schmittgen, 2001). Cette technique repose sur l'utilisation d'un ou plusieurs gènes de référence lors de chaque analyse, ce qui permet de "normaliser" les résultats. Un gène de référence doit être ubiquitaire, c'est-à-dire qu'il est exprimé dans toutes les cellules et tissus, et son niveau d'expression doit rester constant, indépendamment des conditions expérimentales.

Une fois les Ct obtenus, les étapes de calcul sont les suivantes :

- $\Delta Ct = Ct_{\text{gène cible}} - Ct_{\text{gène de référence}}$
- $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{échantillon exposé}} - \Delta Ct_{\text{échantillon contrôle}}$



À partir de ces calculs, une valeur de quantification relative (RQ, *Relative Quantification*) est calculée :

- $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$

Le RQ représente le « *fold change* » c'est-à-dire le niveau de changement de l'expression d'un gène cible dans les conditions « exposées » par rapport au même gène dans les conditions « contrôles ».

Afin de déterminer si la modulation de l'expression d'un gène est significative dans les conditions « exposées » par rapport aux conditions « contrôles », un test de Student au risque  $\alpha$  de 5% est réalisé à partir des valeurs de  $\Delta Ct$  des deux conditions comparées. Puis, afin de prendre en compte la multiplicité des comparaisons, les p-values ont été ajustées en utilisant le FDR (*False Discovery Rate*) (Benjamini & Hochberg, 1995). Les p-values ajustées inférieures à 5% ont été considérées comme significatives.

Différentes représentations graphiques résultant de cette analyse sont possibles. Les représentations sous forme de heatmap ou de diagramme en barre ont été privilégiées.

La représentation sous forme de heatmap utilise les valeurs de «  $-\Delta\Delta Ct$  » et fait correspondre à l'intensité d'une grandeur variable un nuancier de couleurs sur une matrice à deux dimensions :

- rouge lorsque le gène est surexprimé,
- blanc lorsque le gène n'est pas modulé,
- bleu lorsque le gène est sous-exprimé.

La représentation sous forme de diagramme en barre utilise les valeurs de RQ et permet de visualiser l'expression relative des gènes cibles dans les échantillons exposés par rapport aux échantillons contrôles, pour lesquels les valeurs d'expression des gènes sont fixées à 1.

#### III.4.1.2. Méthode d'analyse graphique par réseaux des rapports d'expressions par paire de gènes

La méthode d'analyse par réseaux des rapports d'expression par paire de gènes a été décrite par Curis en 2019 (Curis et al., 2019). Cette méthode utilise les valeurs de Ct obtenues suite aux qPCR et permet de comparer les expressions de l'ensemble des gènes entre eux, pour une condition expérimentale donnée.

Chaque gène est représenté par un nœud (Figure 27). Pour chaque paire de gènes, un test statistique est réalisé afin de déterminer si les rapports d'expression de ces deux gènes sont significativement différents entre deux conditions expérimentales.

Ainsi, l'hypothèse nulle  $H_0'$  « les deux gènes ne sont pas différemment exprimés entre les deux conditions testées » est confrontée à l'hypothèse alternative  $H_1'$  « les deux gènes sont exprimés de façon différentielle entre les deux conditions testées ».

Si le résultat du test est non significatif, l'hypothèse  $H_0'$  n'est pas rejetée ce qui signifie qu'il n'y a pas de différence significative entre les deux conditions. Sur la représentation graphique cela se traduit par la présence d'une arête reliant les nœuds correspondant à ces deux gènes. À l'inverse, si le résultat du test est significatif, il y a une expression différentielle entre les deux conditions testées et par conséquent, une absence d'arête sur la représentation graphique (Figure 27).



Figure 27 : Représentation graphique des hypothèses statistiques  $H_0'$  et  $H_1'$

Afin de comparer les expressions des gènes nommés *gène 1* et *gène 2*, le modèle suivant pour les valeurs observées de  $Ct$  de l'échantillon  $i$  est supposé :

- $Ct_{gène\ 1,i} = \alpha_1 + \beta_1 X_i + \varepsilon_{1i}$
- $Ct_{gène\ 2,i} = \alpha_2 + \beta_2 X_i + \varepsilon_{2i}$

Avec :

- $\alpha_1$  : ordonnée à l'origine
- $\beta_1$  : coefficient directeur de la droite
- $X_i$  : variable explicative, par exemple une variable indicatrice de la condition expérimentale mais pouvant également correspondre à la concentration d'exposition, au temps d'exposition, au statut de l'épithélium de l'échantillon  $i$ .
- $\varepsilon_i$  : erreur résiduelle suivant une loi normale centrée et hétéroscédastique (erreur non constante dans tout l'échantillon).

Donc,

- $\Delta Ct_i = Ct_{gène\ 1,i} - Ct_{gène\ 2,i}$
- $\Delta Ct_i = \alpha_1 - \alpha_2 + (\beta_1 - \beta_2)X_i + \varepsilon_{1i} - \varepsilon_{2i}$

Finalement, l'équation suivant est obtenue :

- $\Delta Ct_i = \Delta\alpha + \Delta\beta X_i + \Delta\varepsilon_i$  (équation 1)

Avec,

- $X_i = 0$  pour l'échantillon  $i$  de la première condition (par exemple « contrôle ») et
- $X_i = 1$  pour l'échantillon  $i$  de la seconde condition (par exemple « exposée »)

Pour le  $i$ -ème échantillon de la condition « contrôle »,  $X_i = 0$ , donc :

- $\Delta Ct_i = \Delta\alpha + \Delta\varepsilon_i$

et pour le  $i'$ -ème échantillon de la condition « exposée »,  $X_{i'} = 1$ , donc :

- $\Delta Ct_{i'} = \Delta\alpha + \Delta\beta + \Delta\varepsilon_{i'}$

Si les deux échantillons  $i$  et  $i'$  sont appariés, pour comparer les deux conditions, la quantité relative suivante peut être calculée, ce qui correspond à la méthode classique :

$$\Delta\Delta Ct = \Delta ct^{i'} - \Delta ct^i = \Delta\beta + \Delta\Delta\varepsilon_{i,i'}$$

Pour chaque mesure de  $Ct_i$  obtenue sur les échantillons indépendants, le modèle de régression linéaire (équation 1) est alors mis en place. Dans cette modélisation l'hypothèse nulle  $H_0$ ' « les deux gènes ne sont pas d'expression différentielle entre les deux conditions testées » est alors équivalente à «  $\Delta\beta = 0$  » et l'hypothèse alternative  $H_1$ ' « les deux gènes sont exprimés de façon différentielle entre les deux conditions testées » à «  $\Delta\beta \neq 0$  ». Dans ce cas simple, il s'agit d'un modèle de régression avec une variable explicative  $X$  à deux modalités. Tester  $H_0$ ' sur le paramètre  $\Delta\beta$  revient donc à réaliser un test de Student, sous l'hypothèse Gaussienne.

Afin de faire des analyses plus fines et de prendre en compte l'influence de plusieurs facteurs, le modèle statistique ci-dessus (équation 1) peut être complexifié en ajoutant une ou plusieurs autres variables (concentration, temps, type de particule, statut physiopathologique, etc.). Pour les variables qualitatives d'autres variables doivent être alors ajoutées dans le modèle ainsi que des facteurs d'interaction, s'il existe des effets croisés entre les variables.

En fonction de la question scientifique posée, chaque gène est ainsi comparé à l'ensemble des autres gènes grâce à des tests individuels. À partir de l'ensemble des tests individuels, un graphe peut être construit. La construction de ce graphe correspond à un test global d'hypothèse  $H_0$  : « Il n'y a pas de gène différentiellement exprimé entre les conditions testées » qui s'oppose à l'hypothèse alternative  $H_1$  : « Il y a au moins un gène différentiellement exprimé entre les conditions testées ». De cette analyse, différents graphes peuvent être obtenus :

- un **graphe connexe** (Figure 28a) reflétant des expressions géniques équivalentes entre tous les gènes,
- des **graphes disjoints** (Figure 28b) où deux groupes de gènes statistiquement différents entre eux peuvent apparaître, et
- un **graphe en limite de séparation** (Figure 28c) où les gènes présentant peu de connexions aux autres gènes sont en limite d'expression différentielle.

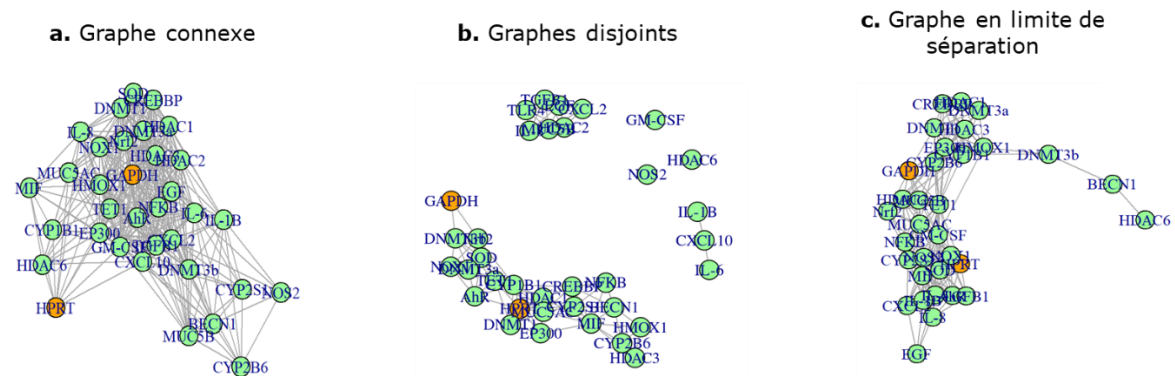


Figure 28 : Représentation des différents graphes obtenus après analyse

Afin d'avoir un risque global  $\alpha$  égale à 5 %, chaque test individuel doit être réalisé à un niveau judicieusement calibré. Sous l'hypothèse  $H_0$ , le graphe est connexe et le risque  $\alpha$  global correspond sous cette hypothèse à un graphe qui aurait au moins un nœud détaché par erreur. Soit la probabilité  $\alpha_1$  sous  $H_0$  de détacher un gène, puis, la probabilité  $\alpha_2$  sous  $H_0$  de détacher 2 gènes, et ainsi de suite. Le cumul de ces probabilités d'erreur doit être inférieur au risque global  $\alpha$  fixé à 5%. On comprend ainsi que la probabilité d'obtenir un graphe disjoint par erreur est fonction des probabilités d'erreur pour chaque comparaison individuelle des gènes deux à deux. Cette dernière probabilité est le niveau de test individuel optimal recherché. Pour déterminer ce niveau de test optimal, ce qui est difficile en pratique, une simulation dans le logiciel R à l'aide du package « SARP.compo », a été réalisée en renseignant la structure de données ainsi que la méthode statistique utilisée afin de faire les comparaisons nécessaires. Les simulations imitent l'expérience sous l'hypothèse  $H_0$  globale d'absence de gènes différenciés. Il a été considéré 6000 simulations pour lesquelles différents seuils candidats ont été testés de 5% à 60%. Pour chaque niveau testé, la probabilité d'avoir un graphe disjoint parmi les 6000 graphes simulés a été estimée. Finalement, le niveau de test optimal est choisi comme la valeur seuil maximisant la probabilité d'avoir un graphe disjoint, telle qu'elle soit inférieure au risque global 5 %. C'est ce niveau de test optimal qui sera utilisé pour chaque test de comparaisons. Plus exactement, c'est à ce niveau optimal que la p-value obtenue dans chaque test sera comparée.

### III.4.2. Analyse des données issues tests ELISA

La concentration de cytokines secrétées dans le milieu de culture est déterminée à l'aide d'une gamme étalon. Des équations ont été générées à partir des points de la gamme étalon pour lesquels la concentration est connue et la valeur d'absorbance mesurée.

Une fois les concentrations établies, un coefficient de variation (CV) a été calculé pour chaque couple de réplicats techniques ; si le CV est supérieur à 10%, les deux réplicats techniques ont été retirés de l'analyse. Une moyenne ajustée est alors calculée avec les réplicats biologiques restants.

Des analyses statistiques ont ensuite été envisagées afin de réaliser différentes comparaisons :

- comparaison du niveau de sécrétion d'une cytokine/chimiokine donnée (IL-6, IL-8 ou GM-CSF) suite aux expositions à un échantillon particulaire donné par rapport au contrôle ;
- effet « dose » et effet « temps » : pour un échantillon particulaire donné, une cytokine/chimiokine donnée (IL-6, IL-8 ou GM-CSF) et un statut physiopathologique donné (sain, asthme ou BPCO);
- effet « fraction particulaire » : pour une concentration donnée ( $3 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  ou  $6 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ ), une durée d'exposition (6h ou 24h), une cytokine/chimiokine donnée (IL-6, IL-8 ou GM-CSF) et un statut physiopathologique (sain, asthme ou BPCO).

Pour les comparaisons par rapport aux contrôles et l'analyse des effets dose et fraction, un test de Tukey (test de comparaisons multiples) a été appliqué pour déterminer les différences significatives entre les moyennes ajustées des groupes dans une analyse de variance.

Pour l'analyse de l'effet « temps », il a été nécessaire d'ajuster les quantités de cytokines/chimiokine produites par rapport à la production des échantillons contrôles. Pour pouvoir faire cet ajustement un modèle de régression linéaire a été mis en place et les comparaisons des moyennes entre les groupes ont été obtenues par une analyse de contraste des paramètres du modèle à l'aide du package multcomp (test de Wald avec correction de multiplicité « Single-Step method »).

Les p-values ajustées inférieures à 5% ont été considérées comme significatives.

## IV. Résultats et discussion

---



## IV.1. Évaluation de l'impact de PM2.5-0.3 d'influence trafic (PMTraf) ou industrie (PMInd) sur la modulation de l'expression génique après exposition d'épithéliums bronchiques reconstruits sains ou asthmatiques.

Cette première étude a fait l'objet d'une publication sous forme d'article original dans la revue scientifique *Environmental Research* et de deux communications orales.

### **Publication :**

Despréaux P, Jeanton C, Desaulle D, Al Zallouha M, Verdin A, Momas I, Achard S. *Innovative graph analysis method to assess gene expression modulation after fine particles exposures of 3D human airway epithelia*. Environ Res. 2023 Mar 15;221:115296. doi: 10.1016/j.envres.2023.115296. Epub 2023 Jan 12. PMID: 36642119.

### **Communication orale lors d'une conférence internationale :**

Despréaux P, Jeanton C, Desaulle D, Al Zallouha M, Verdin A, Momas I, Achard S. *Assessment of gene expression modulation using graph analysis on pairwise expression ratios. Impact of PM2.5-0.3 on 3-D bronchial epithelium model*. BOHS Inhaled Particles / NanOEH Conference 2023, Manchester (Angleterre), Mai 2023.

### **Communication orale lors d'un colloque national :**

Despréaux P, Al Zallouha M, Verdin A, Momas I, Achard S. *Impact des particules fines sur les mécanismes épigénétiques après expositions répétées d'épithéliums humains reconstruits d'origine bronchique*. Colloque de restitution des actions du DIM Qi<sup>2</sup>, Paris, Décembre 2021





### IV.1.1. Contexte et objectif

En raison de leur petite taille, les PM<sub>2.5</sub> peuvent pénétrer profondément dans les voies respiratoires, atteignant les bronches. Plusieurs études épidémiologiques ont mis en évidence des associations entre l'exposition aux PM<sub>2.5</sub> et le développement ou l'exacerbation de pathologies respiratoires telles que l'asthme.

Les PM<sub>2.5</sub> sont constituées d'un noyau carboné sur lequel sont adsorbés différents éléments chimiques et biologiques, leur conférant ainsi une grande réactivité biologique. Des PM<sub>2.5</sub> provenant de sources d'émission différentes ont des compositions chimiques diverses et pourraient donc avoir des impacts distincts au niveau des voies respiratoires humaines.

Dans ce contexte, l'objectif de cette première étude est d'évaluer l'impact d'expositions répétées à des PM<sub>2.5-0.3</sub> au niveau de l'épithélium bronchique en tenant compte :

- de la composition chimique des PM<sub>2.5-0.3</sub> ;
- du statut physiopathologique de l'épithélium bronchique.

### IV.1.2. Matériel et Méthodes

#### IV.1.2.1. Choix du modèle *in vitro*

Pour cette première étude, le modèle MucilAir™-HF (Epithelix©, Suisse) a été utilisé. Il s'agit d'un modèle d'épithélium humain d'origine bronchique co-cultivé avec des fibroblastes humains. Ce modèle est innovant et est encore très peu utilisé pour la recherche en toxicologie environnementale. Il présente comme avantage d'être proche de la physiologie *in situ* des épithéliums bronchiques humains.

Les épithéliums ont été reconstruits à partir de cellules primaires humaines obtenues après biopsie de donneurs non-fumeurs. Après 48 jours de reconstruction, les épithéliums présentent des cellules différenciées et fonctionnelles assurant une production de mucus, des mouvements ciliaires et des jonctions serrées (Figure 29).

Les épithéliums sont cultivés à l'interface air-liquide, dans des petites chambres de culture (inserts avec une surface de 0,33 cm<sup>2</sup> et des pores de 0,4 µm - Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), déposées dans des plaques 24 puits (TTP, Dutscher, France), avec 700 µL de milieu de culture MucilAir™ (Epithelix©, Genève, Suisse) en partie basale (Figure 30).

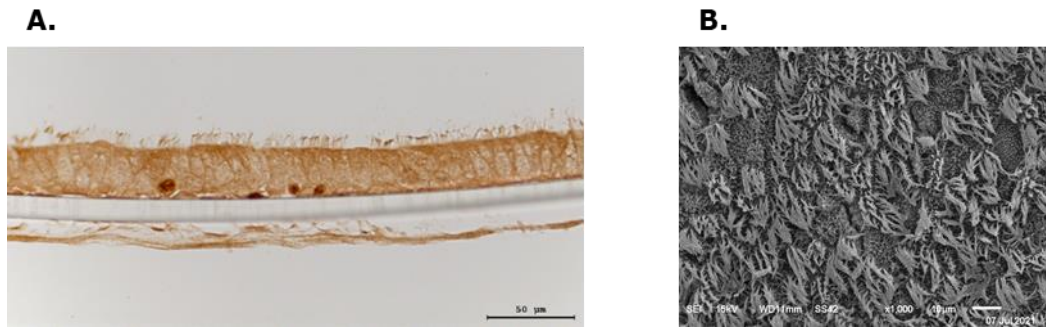


Figure 29 : Observations microscopiques d'épithéliums humains d'origine bronchique (MucilAir™-HF) **A.** en microscopie confocale **B.** en microscopie électronique à balayage.

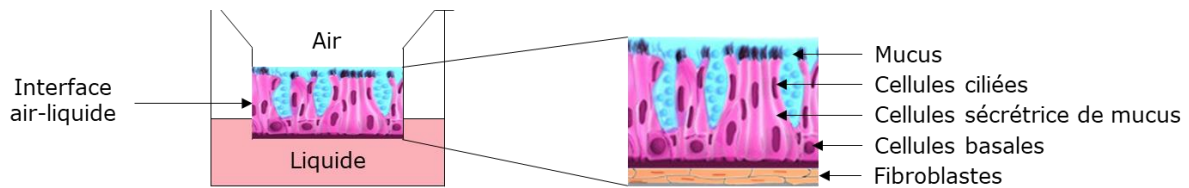


Figure 30 : Épithélium respiratoire humain reconstruit - MucilAir™ (Source : Epithelix©)

Les épithéliums ont été maintenus en culture dans un incubateur (37°C, 5% CO<sub>2</sub> et 95% d'humidité relative constante, MCO-18AIC, Sanyo, Japon). Le milieu de culture en partie basale a été changé tous les deux ou trois jours pour maintenir l'homéostasie tissulaire. Une fois par semaine, la partie apicale a été lavée avec du milieu de culture afin d'éliminer le mucus et les cellules desquamantes. L'intégrité tissulaire a été évaluée chaque fin de semaine en calculant la résistance électrique transépithéliale (TEER, *Transsepithelial Electrical Resistance*). La résistance ( $\Omega$ ) de chaque épithélium a été mesurée trois fois à l'aide d'un voltohmmètre (EVOM<sup>2</sup>, World Precision Instruments, États-Unis). Les trois valeurs de résistance ont été moyennées et le calcul suivant a été appliqué :

$$\text{TEER } (\Omega \cdot \text{cm}^2) = (R_M - R_0) \times S$$

Avec :

- $R_M$  : Résistance moyenne de l'épithélium ( $\Omega$ )
- $R_0$  : Résistance du blanc (insert sans cellules) ( $\Omega$ )
- $S$  : Surface de la membrane de l'insert (0,33 cm<sup>2</sup>).

Selon le fournisseur Epithelix©, un épithélium est considéré comme ayant une bonne intégrité tissulaire si la valeur de TEER est supérieure ou égale à 200  $\Omega \cdot \text{cm}^2$ .

Le modèle MucilAir<sup>TM</sup>-HF peut être maintenu en culture jusqu'à 12 mois ce qui permet de réaliser des expositions longues et répétées afin de mimer une chronicité et/ou l'effet cumulé des expositions.

Dans cette étude, deux statuts physiopathologiques différents ont été considérés. Pour cela, les épithéliums ont été reconstruits à partir de cellules épithéliales bronchiques prélevées chez un donneur non-fumeur sans pathologie respiratoire ou avec une pathologie de type asthme. Dans la suite de ce manuscrit, les épithéliums sans pathologie respiratoire seront nommés « Epi-S » et les épithéliums pathologiques « Epi-A ».

Il est important de noter que les épithéliums utilisés pour cette étude sont issus de deux reconstructions différentes, R1 et R2. Les épithéliums d'un même statut physiopathologique ont toujours été reconstruits à partir de cellules primaires issues du même donneur, mais à des dates différentes, ce qui les distingue.

Les caractéristiques des épithéliums sont résumées dans le Tableau X.

Tableau X : Caractéristiques des donneurs et informations sur les reconstructions des épithéliums humains d'origine bronchique (MucilAir™-HF). Les certificats d'analyse ont été fournis par Epithelix©.

		<b>Épithélium humain d'origine bronchique</b>	
		<b>Sain (Epi S)</b>	<b>Asthme (Epi A)</b>
<b>Fournisseur</b>		Epithelix©	Epithelix©
<b>Nom du produit</b>		MucilAir™-HF	MucilAir™-HF
<b>Numéro de lot</b>		HF-MD0720	HF-MD0744
<b>Informations sur les donneurs</b>			
<b>Age</b>		41	47
<b>Sexe</b>		Homme	Femme
<b>Origines</b>		Caucasien	Caucasien
<b>Fumeur</b>		Non	Non
<b>Pathologies</b>		Absence de pathologie respiratoire	Asthme
<b>Antécédents du donneur</b>		N.A	N.A
<b>Informations sur les cellules et dates de reconstruction</b>			
<b>Type cellulaire</b>		Cellules épithéliales humaines d'origine bronchique	Cellules épithéliales humaines d'origine bronchique
<b>R1</b>	<b>Date d'ensemencement</b>	1er mars 2021	3 mai 2021
	<b>Date de mise en culture à l'interface air-liquide</b>	8 mars 2021	10 mai 2021
	<b>Date de la co-culture avec les fibroblastes</b>	29 mars 2021	31 mai 2021
<b>R2</b>	<b>Date d'ensemencement</b>	25 mai 2021	10 janvier 2022
	<b>Date de mise en culture à l'interface air-liquide</b>	31 mai 2021	17 janvier 2022
	<b>Date de la co-culture avec les fibroblastes</b>	21 juin 2021	7 février 2022
<b>Contrôle qualité des épithéliums reconstruits</b>			
<b>Stérilité</b>		Oui	Oui
<b>Mycoplasma</b>		Negative	Negative
<b>R1</b>	<b>Intégrité tissulaire TEER (<math>\Omega.cm^2</math>)</b>	542 $\pm$ 22	649 $\pm$ 33
	<b>Blanc de la résistance membranaire (<math>\Omega</math>)</b>	174	174
	<b>Fréquence de battements ciliaires (Hz)</b>	8,8 $\pm$ 0,3	5,8 $\pm$ 0,1
<b>R2</b>	<b>Intégrité tissulaire TEER (<math>\Omega.cm^2</math>)</b>	284 $\pm$ 10	366 $\pm$ 10
	<b>Blanc de la résistance membranaire (<math>\Omega</math>)</b>	174	100
	<b>Fréquence de battements ciliaires (Hz)</b>	8,2 $\pm$ 0,5	11,6 $\pm$ 0,4
<b>Morphologie</b>		Normal	Normal
<b>Mucus</b>		Présent	Présent
<b>Détection de virus (HIV-1 ; HIV-2 ; Hépatite B ; Hépatite C)</b>		Négatif	Négatif

### IV.1.2.2. Protocole d'exposition

Après réception, les épithéliums ont été laissés à l'incubateur durant une semaine afin de les acclimater aux conditions de culture du laboratoire (37°C, 5% de CO<sub>2</sub>, hygrométrie constante). 72h avant la 1ère exposition, la partie apicale des épithéliums a été lavée et l'intégrité tissulaire a été évaluée en mesurant la TEER. Le lavage est une étape importante car il permet d'avoir un film muqueux d'épaisseur similaire pour tous les épithéliums lors des expositions.

Les épithéliums ont été exposés par dépôt sur la partie apicale de 10 µL de PM<sub>2.5-0.3</sub> (PMInd ou PMTraf) en suspension dans le milieu de culture à la concentration souhaitée (45 ou 90 µg/cm<sup>2</sup>) (Figure 31). Il s'agit d'expositions en « semi air-liquide ».

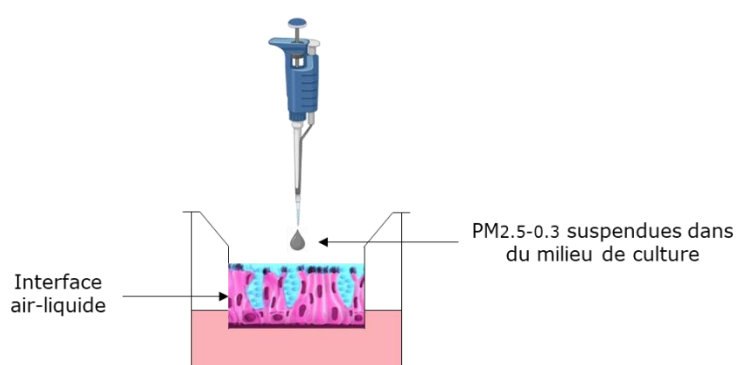


Figure 31 : Exposition du modèle Mucilair™-HF aux PM<sub>2.5-0.3</sub>

Après le dépôt, les PM<sub>2.5-0.3</sub> se répartissent sur toute la surface de l'épithélium grâce aux mouvements ciliaires. Le système d'exposition choisi n'endommage pas la partie apicale des épithéliums et permet d'avoir une bonne maîtrise de la quantité déposée lors de l'exposition.

Les expositions ont été réalisées deux fois par semaine à 48 heures d'écart pendant trois semaines d'affilée (Figure 32).

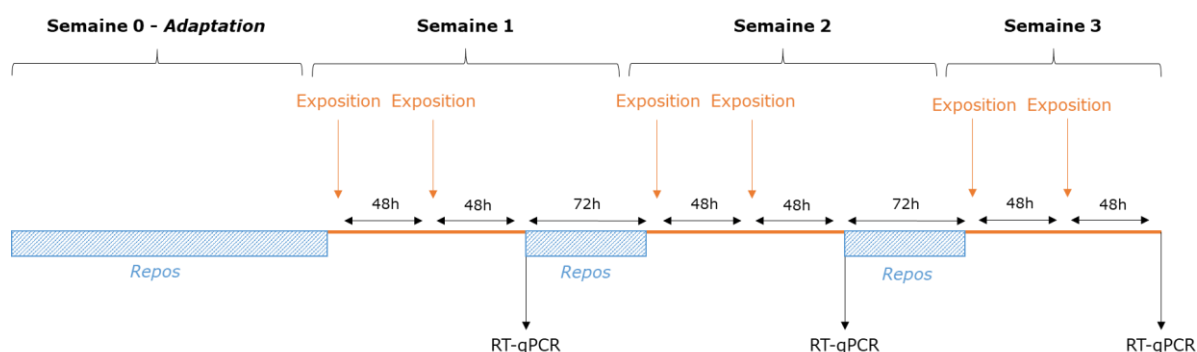


Figure 32 : Protocole d'exposition des épithéliums humains reconstruits d'origine bronchique aux PM<sub>2.5-0.3</sub> de différentes sources d'émission (PMInd ou PMTraf).

En parallèle de ces expositions, deux conditions contrôles ont été envisagées :

- Contrôle incubateur (Cont) : absence d'exposition, les épithéliums restent à l'incubateur durant 3 semaines après la phase d'adaptation ;
- Témoin milieu (TMil) : 10  $\mu$ L de milieu sans particule sont déposés sur la partie apicale des épithéliums dans les mêmes conditions expérimentales que les épithéliums exposés.

#### IV.1.2.3. Évaluation de l'impact des PM<sub>2.5-0.3</sub> sur la modulation de l'expression des gènes

À la fin de chaque semaine, la partie apicale des épithéliums a été lavée, l'intégrité tissulaire évaluée (TEER) et deux épithéliums par condition ont été « sacrifiés » pour évaluer l'expression de certains gènes par RT-qPCR. Les mécanismes étudiés sont l'inflammation, le métabolisme, la réponse antioxydante, la sécrétion de mucus, l'autophagie et les modifications épigénétiques.

Après vérification que le dépôt de 10  $\mu$ L de milieu de culture sur la partie apicale des épithéliums n'avait pas modifié de manière significative l'intégrité tissulaire et l'expression des gènes étudiés, les deux conditions contrôles ont été combinées pour former un seul groupe contrôle CONT, afin d'augmenter la puissance statistique des analyses.

Pour l'analyse des résultats, deux gènes de référence (*HPRT* et *GAPDH*) ont été utilisés, et deux méthodes d'analyse statistiques ont été envisagées : la méthode classique des  $\Delta\Delta$ Ct (Livak & Schmittgen, 2001) et la méthode d'analyse graphique par réseaux (Curis et al., 2019). Pour des raisons de puissance statistique, les analyses ont été réalisées tous temps confondus (semaine 1, semaine 2 et semaine 3).

Afin de faciliter la lecture des résultats présentés en complément de l'article, les résultats obtenus avec la méthode classique sont représentés sous forme de heatmap avec les p-values correspondant à chacun des gènes étudiés. Un code couleur est utilisé pour représenter les p-values :

- **rouge** : une différence significative a été mise en évidence avec les deux méthodes d'analyse (classique et par réseaux),
- **orange** : une différence significative a été obtenue avec la méthode classique et une limite de séparation est observée pour la méthode d'analyse par réseaux,
- **bleu** : une significativité est mise en évidence uniquement avec la méthode classique.

## IV.1.3. Résultats et discussion

### IV.1.3.1. Intégrité tissulaire

Avant d'étudier la modulation de l'expression des gènes, l'intégrité tissulaire des Epi-S et des Epi-A a été évaluée pour s'assurer de la non toxicité des PMInd et des PMTraf aux concentrations testées. Les mesures ont été réalisées avant exposition (semaine 0) puis, à la fin de chaque semaine d'exposition, durant 3 semaines. Les résultats sont présentés dans le Tableau XI.

Tableau XI : Évaluation de l'intégrité tissulaire par la mesure de la résistance transmembranaire des épithéliums (TEER), chez le groupe CONT et chez les groupes exposés, avant exposition et après 1, 2 et 3 semaines d'exposition.

			Semaine 0	Semaine 1	Semaine 2	Semaine 3
<b>Epi S</b>	45 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	CONT	589 $\pm$ 162	525 $\pm$ 165	276 $\pm$ 91	339 $\pm$ 121
		PMInd	503 $\pm$ 101	602 $\pm$ 150	290 $\pm$ 35	236 $\pm$ 56
		PMTraf	680 $\pm$ 190	517 $\pm$ 172	377 $\pm$ 50	305 $\pm$ 6
	90 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	CONT	540 $\pm$ 112	510 $\pm$ 110	464 $\pm$ 167	497 $\pm$ 56
		PMInd	605 $\pm$ 166	605 $\pm$ 166	474 $\pm$ 170	289 $\pm$ 69
		PMTraf	596 $\pm$ 80	596 $\pm$ 80	428 $\pm$ 139	373 $\pm$ 7
<b>Epi A</b>	45 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	CONT	588 $\pm$ 115	757 $\pm$ 175	997 $\pm$ 172	834 $\pm$ 192
		PMInd	634 $\pm$ 110	522 $\pm$ 175	590 $\pm$ 231	428 $\pm$ 26
		PMTraf	786 $\pm$ 225	560 $\pm$ 119	612 $\pm$ 141	520 $\pm$ 271
	90 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	CONT	292 $\pm$ 36	311 $\pm$ 54	319 $\pm$ 51	337 $\pm$ 22
		PMInd	453 $\pm$ 125	428 $\pm$ 43	394 $\pm$ 48	388 $\pm$ 20
		PMTraf	278 $\pm$ 37	261 $\pm$ 18	259 $\pm$ 62	230 $\pm$ 26

Pour toutes les conditions testées, les valeurs de TEER sont toujours supérieures à 200  $\Omega.\text{cm}^2$ . Ces résultats attestent du maintien d'une bonne intégrité tissulaire tout au long de l'expérimentation pour les deux statuts physiopathologiques et les deux concentrations d'exposition testées.



#### IV.1.3.2. Modulation de l'expression des gènes chez les Epi-S et les Epi-A suite à des expositions répétées à PM<sub>2.5-0.3</sub> provenant de sources d'émissions différentes

Les résultats d'expression génique obtenus avec la méthode classique et la méthode d'analyse graphique par réseaux ont été analysés séparément puis comparés. La méthode d'analyse graphique s'est avérée avoir de meilleures propriétés statistiques que la méthode classique et a permis de démontrer que des expositions répétées aux PM<sub>2.5-0.3</sub> induisaient une augmentation dose-dépendante de l'expression d'un gène du métabolisme (*CYP1B1*) et une diminution de l'expression d'un gène de l'inflammation (*CXCL10*). Ces modulations étaient plus importantes après les expositions aux PMInd qu'après les expositions aux PMTraf, quel que soit le statut physiopathologique des épithéliums. Cette différence dans la modulation de l'expression des gènes semble être en lien avec la composition chimique des particules : les PMInd sont 8 fois plus riches en hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) que les PMTraf (136 µg/g *versus* 18 µg/g). Par ailleurs, les effets des PM<sub>2.5-0.3</sub> se sont avérés plus importants après exposition des épithéliums Epi-A qu'après exposition des Epi-S. Ce résultat souligne l'importance de l'état physiopathologique de l'épithélium dans la sensibilité aux particules.

L'article original paru dans la revue scientifique *Environmental Research* est présenté ci-après et les données complémentaires (*supplementary data*) en Annexe 2.



## Innovative graph analysis method to assess gene expression modulation after fine particles exposures of 3D human airway epithelia

Philomène Despréaux<sup>a</sup>, Capucine Jeanton<sup>a</sup>, Dorota Desaulle<sup>b</sup>, Margueritta Al Zallouha<sup>a</sup>, Anthony Verdin<sup>c</sup>, Isabelle Momas<sup>a</sup>, Sophie Achard<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Université Paris Cité, Faculté de Pharmacie, CRESS INSERM UMR 1153, équipe HERA (Health Environmental Risk Assessment), Paris, France

<sup>b</sup> Université Paris Cité, Faculté de Pharmacie, UR 7537 - BioSTM (Biostatistique, Traitement et Modélisation des données biologiques), Paris, France

<sup>c</sup> Université du Littoral Côte d'Opale, Unité de Chimie Environnementale et Interactions sur le Vivant (UCEIV) UR4492, SFR Condorcet CNRS 3417, Dunkerque, France

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Fine particles  
Repeated air-liquid exposures  
Healthy or asthma epithelium  
Innovative statistical analysis to assess qPCR data  
Industrial or urban PM sources

### ABSTRACT

Environmental particles have dramatic consequences for health, especially for the most vulnerable people, such as asthmatics. To better understand the impact on gene expression modulation of fine particles (PM<sub>2.5-0.3</sub>) from different emission sources, a 3D-airway model, a human bronchial epithelium (MucilAir-HF™) reconstructed from primary cells from healthy (EpiH) or asthmatic (EpiA) donors, was used. Repeated air-liquid exposures were performed, and epithelia were sacrificed to extract RNAs and assess gene expression. Data were analyzed according to the emission sources, physiological status, and exposure doses using a recent model consisting in a graph analysis on pairwise expression *ratio*. The results were compared with those from the classical  $\Delta\Delta Ct$  method. The graph analysis method proved to have better statistical properties than the classical  $\Delta\Delta Ct$  method and demonstrated that repeated PM<sub>2.5-0.3</sub> exposures induced a dose-dependent up-regulation of the metabolic gene (*CYP1B1*) and a down-regulation of the inflammation gene (*CXCL10*). These modulations were greater for "industrial" than for "urban traffic" fine particles, and the effects were found to be greater after exposure of EpiA than EpiH, thus emphasizing the importance of the epithelium's physiological status in sensitivity to particles. Our study is original in terms of the experimental conditions and the graphical statistical analysis model established. The results highlight the importance of particle chemistry on the modulation of cellular and molecular responses, which may vary according to the individual's vulnerability.

### 1. Introduction

Environmental particles (PM) represented a complex and heterogeneous mixture of air pollutants. Among them, fine particles (PM<sub>2.5</sub>), characterized by an aerodynamic diameter of less than or equal to 2.5  $\mu\text{m}$ , are constituted of a carbonaceous core on which inorganic compounds (e.g., metals and salts), organic compounds (e.g., polycyclic aromatic hydrocarbons: PAHs), and biological contaminants (e.g., pollen, bacteria, and fungi) are adsorbed. These compounds, in relation to emission sources, contribute to PM's high surface reactivity. Once inhaled, PM<sub>2.5</sub> penetrate in the airway lower regions to reach the bronchial epithelium. Carbonaceous core and compounds such as PAHs or metals may interact with epithelial cells to cause numerous biological reactions. To limit such deleterious mechanisms, airway epithelium rapidly establishes a defense system. Insoluble compounds can be handled by mucociliary function, while some compounds, such as PAHs,

can be metabolized to make them more water-soluble. Activation of some receptors such as aryl hydrocarbon receptors (AhR) leads to the transcription of metabolic enzymes, such as cytochromes P450, promoting metabolic activities (Øvrevik et al., 2015; Chen et al., 2018). However, PAH metabolization can induce free radicals formation responsible for an oxidative stress (Øvrevik, 2019). To limit such deleterious mechanisms, antioxidant enzymes, such as superoxide dismutase (SOD) or heme oxygenase (HMOX), allowing elimination of excess radical species, are produced (Zelko et al., 2002). Nevertheless, repeated exposures to low doses of PM over prolonged periods of time, defense system can become overwhelmed and ineffective, resulting in cellular and molecular damages. Thus, many nuclear transcription factors regulating the expression of genes involved in a variety of cellular processes such as cell growth, mucus production, and inflammation could be activated and lead to various respiratory pathologies.

Cell-signaling protein activation, such as NF- $\kappa$ B, TLRs, and Nrf2, can cause increased pro-inflammatory cytokines expression, for instance

\* Corresponding author.

E-mail address: [sophie.achard@u-paris.fr](mailto:sophie.achard@u-paris.fr) (S. Achard).

<https://doi.org/10.1016/j.envres.2023.115296>

Received 9 November 2022; Received in revised form 27 December 2022; Accepted 11 January 2023

Available online 12 January 2023

0013-9351/© 2023 Elsevier Inc. All rights reserved.

Abbreviations	
AhR	aryl hydrocarbon receptor
ALI	air-liquid interface
ARN18S	18S ribosomal RNA
CREBBP	CREB (c-AMP response element-binding protein) binding protein
Ct	cycle threshold
Epi (H) or (A)	CXCLx, C-X-C motif chemokine ligand x (CXCL10, CXCL2, ...)
CYP	cytochrome (CYP1A1, CYP1B1, CYP2B6)
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
EGF	epidermal growth factor
EpiH or EpiA	reconstituted epithelium Healthy or Asthma
HF	human airway fibroblasts
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
HDAC	histone deacetylase (HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC6)
HMOX	heme oxygenase
IL <sub>n</sub>	interleukine (IL-6, IL-1 $\beta$ , ...)
HPRT	hypoxanthine phosphoribosyltransferase
MUC	mucins (MUC5B, MUC5AC)
NF- $\kappa$ B	nuclear factor-kappa B
NOS	nitric oxide synthase
Nrf2	Nuclear Factor Erythroid 2-related factor 2
PAH	polycyclic aromatic hydrocarbon
PM	particulate matter
PMInd or PMTraf	particles from Industrial or Traffic emission sources
PM2.5	fine particles
RNA	ribonucleic acid
RPL13	ribosomal protein L13A
RT-qPCR	reverse transcription quantitative polymerase chain reaction
SOD	superoxide dismutase
TEER	transepithelial electric resistance
Tet1	Tet (ten-eleven translocation) methylcytosine dioxygenase 1
TGF- $\beta$ , 3D	transforming growth factor- $\beta$ ; three-dimensional
TLR	toll-like receptors
TNF- $\alpha$	tumor Necrosis Factor

TNF- $\alpha$ , IL-6, or IL-1 $\beta$  (Kaspar et al., 2009; Lee and Yang, 2012; Mishra et al., 2018). Up-regulation of the epidermal growth factor (EGF) can lead to goblet cell proliferation and therefore increased secretion of major mucins like MUC5B and MUC5AC (Casalino-Matsuda et al., 2006, 2009). Transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) excretion by epithelial cells can lead to tissue remodeling (Halwani et al., 2011; Latella, 2018) and ciliophagy, notably by increasing the mRNA expression levels of autophagy-associated proteins such as Beclin1 (Kiyono et al., 2009; McAlinden et al., 2019). Finally, epigenetic mechanisms, especially DNA methylation and histone modifications, seem to regulate certain cellular signaling pathways, as those described above, and more specifically inflammation development and maintenance in chronic inflammatory pathologies (Potaczek et al., 2020). The biological responses described above are largely associated with the chemical part of PM, and will be differentially modulated according to the vulnerability of people, such as those suffering from a respiratory pathology, such as asthma. To improve the understanding of cellular and molecular mechanisms taking place in the bronchial epithelium following PM exposures, modulation of the expression of certain genes involved in such mechanisms can be evaluated. Reverse transcription quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) is the method of choice for such assessments because it has high sensitivity, relatively low cost and high adaptability to a wide range of experimental designs. Data obtained after qPCR are classically analyzed using the  $\Delta\Delta$ Ct method (Livak and Schmittgen, 2001). To ensure data reliability, this method is based on a normalization using an endogenous control. Thus, in each sample, each target gene expression level is normalized by the expression level of one housekeeping gene. A housekeeping gene's expression level does not vary under different experimental conditions. However, the strong assumption that such genes' expression levels are not affected by the condition(s) tested is not always verified (Ling and Salvaterra, 2011; Radonić et al., 2004; Xu et al., 2015). Several methods described in the literature could circumvent this limitation, including one based on graph analysis on pairwise expression ratio (Cuis et al., 2019). This method, combined with a statistical procedure that controls the type I error, compares each target gene to all other genes, thus avoiding the difficulties associated with unexpected variations in the expression level of the housekeeping gene. This procedure uses an equivalence test to prove the hypothesis that a given pair of genes undergoes the same change in expression under two different conditions.

In this work, our objectives were to assess the modulation of gene

expression after repeated exposure of human epithelia to PM using RT-qPCR and applying an innovative graph analysis method to analyze the different modulations observed. The strengths of our study were to have used an *in vitro* model respecting the main route of exposure to PM, a reconstructed human epithelium of bronchial origin (MucilAir-HF<sup>TM</sup>), and to have considered the notion of individual vulnerability to PM2.5-0.3 from two different emission sources by using epithelia reconstituted from cells of healthy and asthmatic donors. Finally, the novelty of this work lies in the use of two different methods of gene expression analysis, graph analysis on pairwise expression ratio and the classical  $\Delta\Delta$ Ct method.

## 2. Material and methods

### 2.1. Collection and physicochemical characterization of fine particles (PM2.5-0.3)

PM was sampled from February to June 2017 in two sites in northern France: Grande Synthe, for industrial activities (PMInd), and Roubaix, an urban area with dense road traffic (PMTraf). A five stages plus back-up cascade impactor (model 235 TFIA-2, Staplex®, USA) was used to collect particles (Cazier et al., 2016). The resulting PM2.5-0.3 was carefully collected and stored at -20 °C until use. After collection PM2.5-0.3 were carefully stored at -20 °C until use, conditions ensuring their chemical composition stability for several years (Dergham et al., 2015; Cazier et al., 2016).

Chemical analyses were performed using inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry (iCAP 6000 Series, Thermo-Scientific) for metals, and gas chromatography coupled to mass spectrometry after Soxhlet extraction (CP 3800/1200MS, Varian) for organic compounds. The main results discussed in this work are presented in Table 1 (All data concerning the physicochemical characterization of PM2.5-0.3 are in supplementary data Table S1).

### 2.2. 3D *in vitro* model of reconstituted human bronchial epithelia (MucilAir-HF<sup>TM</sup>)

The 3D *in vitro* model used was reconstituted human bronchial epithelia co-cultured with human airway fibroblasts (HF) (MucilAir-HF<sup>TM</sup>, Epithelix®, Geneva, Switzerland). Epithelia were reconstituted from human bronchial primary cells obtained from biopsies of



**Table 1**  
Concentrations of total Organic compounds (PAHs) in fine particles (PM<sub>2.5-0.5</sub>) from Urban (PMTraF) and Industrial (PMInd) sites.

Organic compounds (PAHs)	m/z	PMTraF (µg/g)	PMInd (µg/g)	PMInd/PMTraF
Naphtalene	128	0.24	1.07	4.54
Acenaphthylene	152	0.12	0.18	1.51
Acenaphthene	154	0.00	0.00	-
Fluorene	166	0.09	0.31	3.59
Phenanthrene	178	0.48	1.92	4.00
Anthracene	178	0.18	0.56	3.14
Fluoranthene	202	0.86	6.00	7.01
Pyrene	202	0.83	5.24	6.28
Benzo [a]Anthracene	228	0.65	10.14	15.57
Chrysene	228	2.60	20.54	7.92
Benzo [b]Fluoranthene	252	2.33	19.99	8.58
Benzo [k]Fluoranthene	252	0.56	7.08	12.69
Benzo [a]Pyrene	252	1.70	15.47	9.08
Indeno [1,2,3-c,d]	276	4.18	16.93	4.05
Pyrene				
Dibenzo [a,h]	278	2.57	18.18	7.07
Anthracene				
Benzo [g,h,i]Perylene	276	2.96	12.77	4.31
<b>Total</b>		<b>17.77</b>	<b>136.39</b>	<b>7.68</b>

nonsmoker donors - without reported respiratory pathologies (EpiH, one donor) and with asthma (EpiA, one donor). The supplier obtained the donors' signed, informed consent and ethical approval. Donors' characteristics provided by Epithelix® are summarized in Table S2 (supplementary data).

The primary cells from biopsies were differentiated at the air-liquid interface (ALI) leading to the progressive reconstruction of a pseudostratified epithelium, physiologically close to human bronchial epithelium, composed of basal, ciliated, and goblet cells, and characterized by tight junctions, metabolic activity, ciliary beats, and mucus secretion. Reconstituted epithelia (Epi) were maintained in small culture chambers (0.33 cm<sup>2</sup> insert surface, 0.4 µm pore size, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) at the ALI in an incubator (37 °C, 5% CO<sub>2</sub> and 95% constant relative humidity, MCO-18AIC, Sanyo, Japan) with 700 µL of MucilAir nutrient medium (Epithelix®, Geneva, Switzerland) in the basal side. The culture medium was changed every two or three days to maintain tissue homeostasis. Once a week, the apical side was washed with nutrient medium to remove mucus and surface desquamating cells, and the tissue integrity was assessed by measuring the transepithelial electrical resistance (TEER) using a VoltOhmmeter (EVOM<sup>2</sup>, World Precision Instruments, USA). According to Epithelix®, tissue integrity is considered good if the TEER value is greater than or equal to 200 Ω cm<sup>2</sup>. Whatever our experimental conditions, the TEER values measured were greater than or equal to 200 Ω cm<sup>2</sup> indicating no toxic effect of PM.

### 2.3. Epithelia exposures

Epithelia were exposed to PM<sub>0.3-2.5</sub> at the ALI by depositing a 10 µL drop of PMInd or PMTraF at concentrations of 45 or 90 µg/cm<sup>2</sup> on the apical side, as described by Achar et al. (2019). Particles, at the target concentrations, were suspended in the nutrient medium then dispersed using an ultrasonic bath (M1800, Branson, USA) for at least 20 min to avoid the presence of particulate aggregates. After deposition, PM<sub>2.5-0.3</sub> was rapidly distributed across the entire epithelia surface by ciliary beats allowing homogeneous tissue exposure. Exposures were performed twice a week for three consecutive weeks. Duplicates were considered for each experimental condition and exposure time. Two control groups were considered: Incubator Control, epithelia maintained without exposure in the incubator during one, two, or three weeks; Medium Control, epithelia repeatedly exposed to nutrient medium without PM<sub>2.5-0.3</sub> during one, two, or three weeks.

### 2.4. Gene expression evaluation

At the end of each week, two of the six epithelia exposed per condition were sacrificed to extract total RNA using NucleoSpin® TriPrep (Macherey-Nagel, Germany). The extracted RNA was quantified using Qubit® 2.0 Fluorometer (model QFX, Denovix, USA). RT of total RNA was performed using iScript™ cDNA Synthesis (Bio-Rad, USA). Expressions of four candidate housekeeping genes and of target genes involved in inflammation, oxidative stress, cell growth, autophagy, mucus production, metabolism, and epigenetic mechanisms (Table S3 - supplementary data) were assessed by qPCR performed using iQ™ SYBR® Green Supermix (Bio-Rad, USA) and specific primers following manufacturer recommendations. Briefly, cDNA was amplified using a thermocycler (CFX Connect Optics Module, Bio-Rad, USA) under the following conditions: 30 s at 98 °C; 40 cycles of 5 s at 95 °C, 10 s at 60 °C, and 10 s at 72 °C; 1 min at 65 °C; and 50 s at 95 °C.

Gene expression modulation quantification used the cycle threshold (Ct) values corresponding to the number of cycles needed for the fluorescence signal to reach a specific threshold level of detection. Ct values were inversely correlated with the amount of template nucleic acid present in the reaction (Walker, 2002).

### 2.5. Gene expression and statistical analyses

Two methods were investigated to analyze Ct values obtained by RT-qPCR: the classical ΔΔCt method (Livak and Schmittgen, 2001) and the recent method using graph analysis based on pairwise expression ratio comparisons (Curis et al., 2019).

Given the low number of replicates for performing Student tests, the statistical analyses were performed "all exposure times combined" for each experimental condition; estimation of Cts variability with n = 6.

Statistical analyses were performed using R (version 4.1.3, R Core Team (2022)). A Student test under Gaussian assumption was performed to evaluate whether the expressions between two genes differ in exposed and unexposed conditions.

#### 2.5.1. Classical ΔΔCt method

The classical ΔΔCt method is based on the relative expression of each gene normalized to one housekeeping gene. To ensure accuracy, four housekeeping genes were tested (*GAPDH*, *HPRT*, *ARN18S*, and *RPL13*) (Radonic et al., 2004).

Relative normalization of target nucleic acid in the sample was calculated as:  $\Delta Ct = Ct(\text{target gene}) - Ct(\text{housekeeping gene})$ . The difference between target mRNA levels in exposed and unexposed epithelia was considered as  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{exposed}) - \Delta Ct(\text{unexposed})$ .

The classical ΔΔCt method results were represented as heatmaps generated by Morpheus software (Morpheus, <https://software.broadinstitute.org/morpheus>) from -ΔΔCt values calculated with validated housekeeping genes. Heatmaps' color-coded representations allow visualization of the direction of gene expression modulation: red indicates an up-regulation (-ΔΔCt > 1) and blue a down-regulation (-ΔΔCt < -1). The -ΔΔCt values, between -1 and 1 (white), indicate no gene expression modulation.

For each target gene, only comparisons with *HPRT* and *GAPDH* were considered, and the false discovery rate was used to take into account the multiplicity of comparisons (Benjamini and Hochberg, 1995). P. adjusted < 0.05 was considered significant.

#### 2.5.2. Graph analysis on pairwise expression ratio method

The graph analysis on pairwise expression ratio method compares each RNA amount to all the other RNA amounts in each experimental condition.

In this analysis, the housekeeping genes were treated in the same way as the target genes. The logarithm of ratio of two RNA amounts was equivalently quantified as the Ct difference for the corresponding genes. More precisely, for any pair of gene x and y, the Ct differences [Ct (gene

$x) - Ct(\text{gene } y)]$  were calculated for each exposed and unexposed epithelium. An individual statistical test then evaluated whether the expressions between the two genes  $x$  and  $y$  differed between exposed and unexposed conditions, i.e., the alternative hypothesis. The null hypothesis states no difference between conditions. The corresponding test results were converted into a graph - a network-based visualization - using an R package, SARP. compo, developed by Curis.<sup>1</sup> On the graphs, each gene is represented by a node (orange for housekeeping genes, green for target genes). Two nodes can be connected or not by an edge. If the change in the *ratio* of corresponding RNA amounts between conditions is not significant, the two nodes are connected by an edge. If the *ratio* change is significant, the edge between the two nodes is absent.

Graph interpretation is as follows: i/Connected graph: If all nodes are connected, there is no significant difference in the gene expression in exposed epithelia and unexposed epithelia; ii/Limit of differential expression: If one gene is connected to one or very few other genes, it is considered as being at the limit of differential expression between exposed and unexposed conditions; iii/Disjoint subgraphs: If a node or set of nodes is not connected by an edge to another node or set of nodes, the gene expressions in each node or set of nodes are considered significantly different in the exposed and unexposed conditions.

Simulations were performed for each graph construction to calibrate the choice of significance level for individual *ratio* tests. The objective was to maintain the risk of obtaining disjoint subgraphs by error (overall type I error) below 0.05.

### 3. Results

#### 3.1. Housekeeping genes selection

Quantitative real-time PCR was used to determine the mRNA transcript profiles of four housekeeping genes - *GAPDH*, *HPRT*, *ARN18S* and *RPL13* - to select the most suitable for our experimental conditions (unexposed and exposed epithelia). To evaluate the different RNA transcription levels, the Ct values were compared directly (supplementary data Fig. S1). First, for each housekeeping gene, the transcription range - the difference between the lowest RNA transcription (high Ct value) and the highest RNA transcription (low Ct value) - was evaluated in all epithelia. To evaluate the stability of candidate RNA transcription depending on the test conditions, the average RNA transcription levels in unexposed and exposed epithelia were compared.

The *ARN18S* expression level was too high compared to those of the genes of interest in our study. *HPRT* had the lowest transcription range (1.9 Ct value) of the candidate housekeeping genes, thus indicating its constant RNA transcription. When comparing experimental conditions, the *HPRT* RNA transcription level was the same for unexposed and exposed epithelia, thus indicating that PM2.5-0.3 exposure had no influence on *HPRT* expression. *GAPDH* and *RPL13* had the same transcription range (5 Ct value). However, *GAPDH* expression was the least impacted by experimental conditions, as indicated by the average gene expression levels between unexposed and exposed conditions.

Thus, to continue the analysis, the two housekeeping genes *HPRT* and *GAPDH* were chosen.

#### 3.2. Control groups validation

Two control groups were envisaged: Incubator Control (epithelia maintained in incubator without exposure) and Medium Control (epithelia exposed to 10  $\mu\text{L}$  of medium). To determine whether the deposition of 10  $\mu\text{L}$  of medium on the epithelium's apical side impacted tissue integrity, TEER values obtained in both control groups were

compared over a four-week period (week 0: week before exposure; weeks 1, 2 and 3: weeks after exposure, or not) (supplementary data Fig. S2). No significant difference was observed after comparison of Medium Control versus Incubator Control.

Similarly, to verify that repeated exposure by deposition of medium on apical surface did not modulate gene expression, the graph analysis on pairwise expression *ratio* was applied for EpiH (Fig. 1A) and EpiA (Fig. 1B). For the two epithelia (EpiH and EpiA), networks obtained by graph analysis on pairwise expression *ratio* display one "connected graph" indicating no significant gene modulation between the two control groups. *GM-CSF*'s connection to the other genes in the EpiH group through only one edge put it at the limit of differential expression. However, that gene's modulation was not significant. These results allowed us to combine the two control groups to form one single control group "CONT" to increase the analyses' statistical power.

#### 3.3. Modulation of epithelia gene expression after repeated PM2.5-0.3 exposures

After epithelia exposures to PMInd and PMTraf, a graph analysis on pairwise expression *ratio* was considered to assess gene expression modulation for EpiH (Fig. 2) and EpiA (Fig. 3). These results were then compared to those from the classical  $\Delta\Delta\text{Ct}$  method after constructing heatmaps using the  $-\Delta\Delta\text{Ct}$  values obtained for the domestic genes *HPRT* or *GAPDH*.

##### 3.3.1. EpiH (healthy epithelia) exposures

Following exposures to PMInd or PMTraf at 45  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , the graph analysis method showed connected graphs indicating no significant difference in the gene expression of the exposed and CONT groups, whereas some gene expressions appeared significantly modulated in the classical  $\Delta\Delta\text{Ct}$  method, regardless of the housekeeping gene used (Fig. 2. A and Fig. 2. C). At 90  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , regardless of the analysis method used, one gene for PMInd (Fig. 2B) and three genes for PMTraf (Fig. 2D) were significantly modulated. One common gene, *CYP1B1*, was up-regulated for both PM types.

After PMInd exposures, the classical method indicated that *CYP1B1* was always up-regulated (Fig. 2A and Fig. 2B), whereas this over-expression appeared at the higher concentration with the graph analysis method (Fig. 2B). Whatever the analysis method used, *CYP1B1* was gradually overexpressed after PMTraf exposures from 45 to 90  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ . It was important to note that no significant modulation of *AHR* expression was observed, whatever the experimental conditions, whereas this gene is linked to *CYP1B1* expression, involved in the metabolism of PAHs. Furthermore, the graph analysis method gave a greater impact of PMTraf on EpiH than PMInd, whereas the classical analysis method suggested the opposite, gave a greater impact of PMInd than PMTraf.

Considering the effects of PM2.5-0.3 according to their sources, the graph analysis method indicated that after PMInd exposures at 45  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , three genes were at the limit of differential expression (*CYP1B1*, *NOS2*, and *CYP2B6*), whereas four genes (*CYP1B1*, *NOS2*, *GM-CSF*, and *TET1*) were up-regulated, but not significantly, with the classical analysis, whatever the housekeeping gene used (Fig. 2A). At the 90  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  of PMInd, both methods showed that *CYP1B1* was expressed differently (up-regulation) in EpiH. Another metabolism gene, *CYP1A1*, was also up-regulated, but it could not be included in our graphs or heatmaps because the Ct values for the control groups (unexposed) were above 40, which is too high for reliability. However, following repeated exposures to PMInd, Ct values were around 25, indicating an increase in expression of this gene following exposure. This result was also observed for the other experimental conditions (EpiH exposed to PM Traf and EpiA exposed to PMInd or PMTraf). Graph analysis revealed that one inflammation gene, *CXCL10*, was at the limit of differential expression after exposure. However, although there was a tendency for the expression to decrease, the classical  $\Delta\Delta\text{Ct}$  method (Fig. 2B) revealed no significant modulation.

<sup>1</sup> Emmanuel Curis et al. (2019). SARP.compo: Network-Based Interpretation of Changes in Compositional Data. R package version 0.1.5. <https://CRAN.R-project.org/package=SARP.compo>.



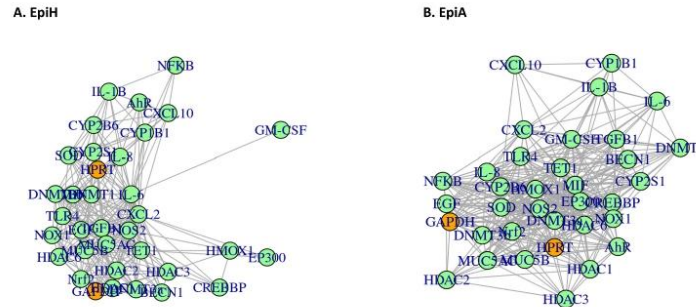


Fig. 1. Comparison of gene expression in Incubator Control group and Medium Control group in A. EpiH (Healthy epithelia) and B. EpiA (Asthma epithelia) using graph analysis on pairwise expression ratio. Each graph was constructed with n = 6.

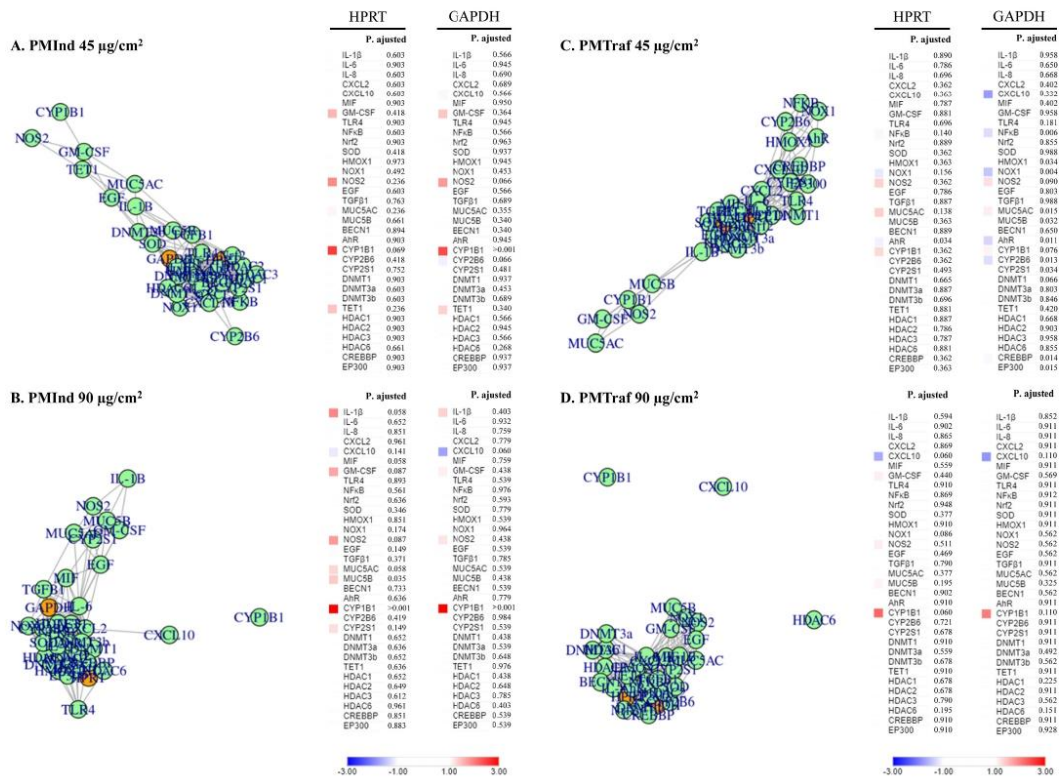


Fig. 2. Determination of gene expression modulation after exposure of EpiH to A. PMInd at 45 µg/cm<sup>2</sup>; B. PMInd at 90 µg/cm<sup>2</sup>; C. PMTraf at 45 µg/cm<sup>2</sup>; D. PMTraf at 90 µg/cm<sup>2</sup>, compared to the CONT group, using graph analysis on pairwise expression ratio and heatmap constructions with *HPRT* or *GAPDH*. For both analyses, representations were constructed with at least five epithelia in each group. P. adjusted was considered statistically significant when <0.05.

For PMTraf exposures at 45 µg/cm<sup>2</sup>, graph analysis indicated one gene cluster, *MUC5AC*, *GM-CSF*, *NOS2*, *CYP1B1*, and *MUC5B*, showing a tendency to disconnect from the main network (Fig. 2C). Only *CYP1B1* was significantly disjointed from the gene cluster after exposures at 90 µg/cm<sup>2</sup>. Two other genes were found to be differentially expressed at this concentration, *CXCL10* and *HDAC6*, which are involved in

inflammatory and epigenetic mechanisms, respectively (Fig. 2D). No significant modulation was observed with the classical  $\Delta\Delta Ct$  method, whatever the housekeeping gene used.

### 3.3.2. EpiA (asthma epithelia) exposures

Two general observations could be made from the results presented

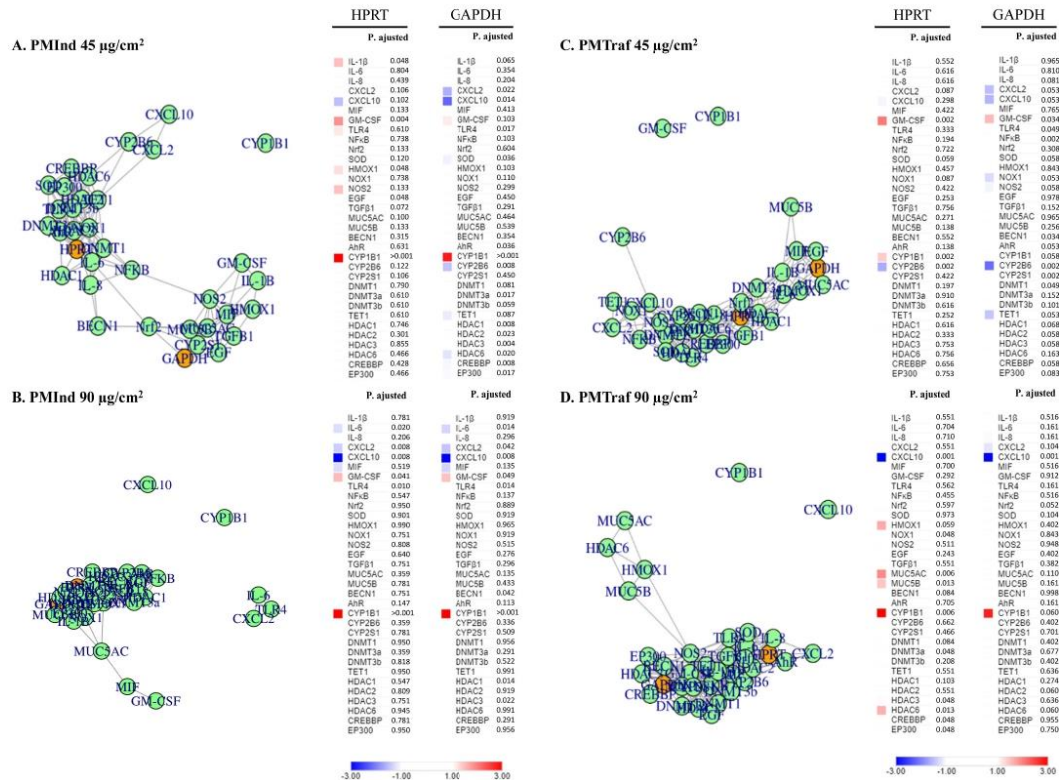


Fig. 3. Determination of gene expression modulation after exposure of EpiH to: A. PMInd at 45 µg/cm<sup>2</sup>; B. PMInd at 90 µg/cm<sup>2</sup>; C. PMTraF at 45 µg/cm<sup>2</sup>; D. PMTraF at 90 µg/cm<sup>2</sup>, compared to the CONT group, using graph analysis on pairwise expression ratio and heatmap constructions with *HPRT* or *GAPDH*. For both analyses, representations were constructed with at least six epithelia in each group. P. adjusted was considered statistically significant when <0.05.

below. The first was that gene expression modulation was greater after exposures to fine particles of EpiA (Fig. 3). Than EpiH (Fig. 2). The second was that, for all experimental conditions tested, the graph analysis highlighted the formation of numerous gene clusters with one gene, *CYP1B1*, significantly disconnected from the main network. Finally, while the network analysis did not show this, the classical method with housekeeping gene *GAPDH* indicated that, for both types of particles tested at 45 µg/cm<sup>2</sup>, genes involved in inflammation (*CXCL2*, *CXCL10*, and *TLR4*), metabolism (*AHR*, *CYP1B1*, and *CYP2B6*), and epigenetic mechanisms (*HDAC1*, *HDAC2*, *HDAC3*, *HDAC6*, and *CREBBP*) were significantly modulated.

After repeated exposures to PMInd at 45 µg/cm<sup>2</sup>, graph analysis highlighted one disjoint gene, *CYP1B1*. That is consistent with classical  $\Delta\Delta Ct$  method results, regardless of the housekeeping gene used (Fig. 3A). When the exposure concentration was increased, gene expression modulation became more important. Indeed, after repeated exposures to PMInd at 90 µg/cm<sup>2</sup>, subgraphs appeared (Fig. 3B). A network containing the two housekeeping genes and the majority of the target genes was shown; three genes, *MUC5AC*, *MIF*, and *GM-CSF*, were at the limit of disjunction. A subgraph consisting of three inflammation genes, *CXCL2*, *IL-6*, and *TLR4* - indicating these genes were coregulated - was also observed. Finally, two genes fully disjoint from the other subgraphs, *CYP1B1* and *CXCL10*, were also revealed (Fig. 3B). Consistent results were obtained with the classical  $\Delta\Delta Ct$  method regardless of the

housekeeping gene used. Indeed, *CYP1B1*, *CXCL10*, *CXCL2*, *IL-6*, and *TLR4* were significantly modulated following exposure to PMInd at 90 µg/cm<sup>2</sup>. *GM-CSF*, which was at the limit of differential expression when using graph analysis, was significantly up-regulated when the classical  $\Delta\Delta Ct$  method was applied (Fig. 3B).

For PMTraF exposures at 45 µg/cm<sup>2</sup>, *CYP1B1* and *GM-CSF* were fully disjoint, thus indicating their differential expression between unexposed and exposed conditions. The classical  $\Delta\Delta Ct$  method supported these observations: these genes were significantly up-regulated, *CYP1B1* with *HPRT* analysis and *GM-CSF*, regardless of the housekeeping gene used (Fig. 3C). Graph analysis indicated that two other genes were at the limit of differential expression: one metabolic gene, *CYP2B6*, and one involved in mucus production, *MUC5B*. Only *CYP2B6* appeared significantly down-regulated with the classical  $\Delta\Delta Ct$  method, regardless of the housekeeping gene used (Fig. 3C). PMTraF tested at 90 µg/cm<sup>2</sup> revealed significantly differential expression of *CYP1B1* and *CXCL10* in the graph analysis. The classical  $\Delta\Delta Ct$  method consolidates these results, with *CXCL10* significantly down-regulated regardless of the housekeeping gene used and *CYP1B1* significantly up-regulated only with the *HPRT* analysis. A gene cluster consisting of *MUC5AC*, *HDAC6*, *HMOX1*, and *MUC5B* was slightly disconnected from the main network. Only *HMOX1*, involved in antioxidant response, did not stand out as significantly modulated in the classical method. The other three were, but only after analysis using *HPRT* as the housekeeping gene (Fig. 3D).



#### 4. Discussion

Many recent studies have described the harmful effects on human health of fine particles (PM<sub>2.5</sub>) initiating or promoting numerous pathologies as respiratory, cardiovascular, or neurodegenerative diseases, and cancers (Lu et al., 2021; Thangavel et al., 2022). However, due to the complex chemical and biological composition of PM<sub>2.5</sub>, the significant spatiotemporal variation with emission sources, and human intra- or inter-individual variability, the health outcomes remain difficult to determine.

In the present study, we evaluated the impact of repeated exposures to PM<sub>2.5-0.3</sub> of various chemical compositions on gene expression modulation in reconstructed bronchial epithelium of different physiological statuses. The study's originality is in establishing a graph analysis on pairwise expression *ratio* which allow to take into account the existing variabilities between the biological samples, for example between healthy and asthmatic subjects, or between various experimental situations, such as the origin of particles. The statistical significance of the expression modulation of certain genes after exposures could be demonstrated with the graph analysis method and, corroborated using the classical  $\Delta\Delta C_T$  method. Associations have been demonstrated between gene expression modulation and, particle chemistry in relation to emission sources and epithelium's physiological status in relation to individuals' vulnerability. However, the sampling process presents a limitation by obliging us to make grouping choices and work "all exposure times combined."

Numerous experimental studies have been conducted to improve knowledge of PM<sub>2.5</sub> impact on human respiratory health. As a replacement for animal studies and in accordance with the 3Rs principle (Replace, Reduce, and Refine) (Russell and Burch, 1959), a need for *in vitro* models was felt. The literature was thus enriched by numerous *in vitro* studies. The most frequently used *in vitro* models to study the impact of PM<sub>2.5</sub> on airways are monolayer cell cultures including primary cells as hAECs (Park et al., 2021), bronchial cell lines such as BEAS-2B (Abbas et al., 2019; Dergham et al., 2015), 16HBE (Jia et al., 2021), and Calu-3 (Hammond et al., 2022), or alveolar cell lines like A549 (Chen et al., 2018; Kouassi et al., 2010). Although these models have many advantages, such as human origin and, ease of obtainment and use, they are monocellular-monolayer models maintained in submerged culture that do not consider the interactions between cells and the airways physiology to reflect the normal route of exposure. Such models cannot be exposed at the air-liquid interface (ALI) beyond 60 min, as drying of the apical side leads to cell death (Bardet et al., 2014; Persoz et al., 2010; personal data). Given these limitations, other *in vitro* models have been developed to increase exposure times. Co-cultures, consisting of human blood monocyte-derived macrophages (THP1) with bronchial epithelial cells (BEAS-2B) (Persoz et al., 2010) or alveolar epithelial cells (A549) (Longhin et al., 2013; Wottrich et al., 2004) appear to be more robust than monocultures for pollutant impact studies but remain difficult to implement. Thus, *in vitro* impacts' studies of gaseous or particulate aerosols seems limited by the availability of relevant *in vitro* models reflecting the inhalation exposure route with a maintain of the biological activities over time. Hence, over the past 20 years, primary cells grown at the ALI have been developed to reconstruct human airway epithelium (Anderson et al., 2013). These models show polarized mucociliary differentiation, essential function for applying ALI exposures (Baxter et al., 2015; Bisig et al., 2018; Rossner et al., 2019). Unfortunately, the use of these 3D models to assess the impact of pollutants on the respiratory epithelium is not very common. In this context, our approach is original and innovative.

The impact of repeated exposures to fine particles (PM<sub>2.5-0.3</sub>) from different emission sources on the expression modulation of genes involved in various signaling pathways, in relation to chronic respiratory diseases was researched in this work. This study was conducted on a 3D *in vitro* model of reconstituted human bronchial epithelium (MucilAir-HF<sup>TM</sup>) with two different physiological statuses: "healthy" and

"asthma." The MucilAir-HF<sup>TM</sup> model is composed of ciliated, mucus-secreting cells and basal cells, thus allowing a closer approximation of human respiratory tract physiology. The presence of mucus on the apical side enables repeated long-term ALI exposures without tissue drying (Baxter et al., 2015; Cervená et al., 2019; Fricke Kuper et al., 2015; Kooter et al., 2016; Zavala et al., 2016). ALI exposure consists in applying an aerosol directly on the apical side of cells or tissues maintained at the air-liquid interface on a transwell porous membrane, using different ALI exposure devices. Müllhopt et al. developed a device using Vitrocell® exposure modules connected to an aerosol generation system. Thus, thanks to a continuous air flow, the suspension of particles generated was deposited on the surface of tissues. Quantification of the deposited particles was made possible by a quartz crystal microbalance integrated into an exposure module (Müllhopt et al., 2016). Gualtieri et al. used an exposure system composed of Cultex RFS modules placed in a mobile laboratory. A complex unmodified gas-particle mixture collected directly from the native atmosphere was deposited, thanks to a continuous air flow, onto cells grown at the air-liquid interface (Gualtieri et al., 2018). In our study, due to the limited amount of particles collected, epithelia were exposed to a suspension of PM<sub>2.5-0.3</sub> deposited directly on the apical surface. Ciliary beating allowed rapid distribution of PM<sub>2.5-0.3</sub> over the entire epithelial surface ensuring homogeneous tissue exposure. The small volume (10  $\mu$ L) deposited on the apical surface was negligible and evaporated rapidly once at 37 °C in the incubator, thus maintaining culture and exposure conditions at the air-liquid interface. Note that if mucociliary function allows homogeneous distribution of PM on the epithelium surface, it also leads to the elimination of excess PM. Thus, 2 h after deposition, we observed that a quantity of PM, estimated at 80% of the initial deposit, was found against the walls of inserts. This phenomenon led us to work with higher PM concentrations than in some studies conducted on monocultures (Gualtieri et al., 2011; Dergham et al., 2015; Abbas et al., 2019; Badran et al., 2020).

To evaluate the effects of PM<sub>2.5-0.3</sub> on the expression modulation of genes involved in inflammation, mucus overproduction, tissue remodeling, metabolism, epigenetic mechanisms, a graph analysis on pairwise expression *ratio* method was applied. The data obtained with this method were compared to the classical  $\Delta\Delta C_T$  method results and discussed according to the type of particles in relation with the emission sources, exposure level, and physiological status of the epithelium. The major results showed dose-dependent gene expression modulation after repeated exposures to PM<sub>2.5-0.3</sub>, regardless of the physiological status of epithelia, EpiH or EpiA, mainly for the genes involved in PAHs metabolism and inflammation. This modulation was higher in EpiA than in EpiH. However, our results did not show that repeated exposures could lead to a significant modulation of the expression of specific genes such as mucus overproduction or tissue remodeling, involved in development (after exposures to EpiH) or exacerbation (after exposure to EpiA) of asthma.

Whatever the PM<sub>2.5-0.3</sub> emission sources - industrial or urban traffic sites - an up-regulation of two metabolic genes, *CYP1A1* and *CYP1B1*, was observed after repeated EpiH and EpiA exposures. These overexpressions were higher after PMInd than PMTraff exposures. The results were consistent with the concentration of PAHs in PM, namely 136  $\mu$ g/g for PMInd versus 18  $\mu$ g/g for PMTraff (Table S1). Although this observation has never been described with a human bronchial reconstituted epithelium model, some studies using bronchial cell lines such as BEAS-2B (Borgie et al., 2015) and 16HBE (Zhou et al., 2015) showed such induction of metabolism genes (*CYP1A1*, *CYP1B1*) linked to the presence of PAHs on the fine particles surface.

Similarly, exposure to PM<sub>2.5-0.3</sub> resulted in decreased *CXCL10* expression in EpiH and EpiA. Meldrum et al. demonstrated that exposure to diesel exhaust particulate extract, containing PAHs, induced an attenuation in *CXCL10* expression in human primary bronchial epithelial cells (Meldrum et al., 2017). *CXCL10* is a chemokine that enables the recruitment of Th1-type CD4<sup>+</sup> T cells (Griffith et al., 2015). Modulation



of its expression in the airways may be a mechanism by which pollutants can modify respiratory activity by counterbalancing the Th2-type immunity seen in allergic asthma, for example. In our study, the down-regulation of *CXCL10* may suggest that PM<sub>2.5-0.3</sub> is involved in modifying the pulmonary immune response by preventing Th1-type CD4<sup>+</sup> cells recruitment to the bronchial epithelium.

Interestingly, the regulation of *CYP1B1*, *CYP1A1*, and *CXCL10* expressions are often described as related to the activation of a cytosolic transcription factor, AhR. AhR plays a role in the regulation of metabolism, immunity, and cellular differentiation (Esser, 2016; Gutiérrez-Vázquez and Quintana, 2018; Kawajiri and Fujii-Kuriyama, 2017; Borgie et al., 2015). This transcription factor is, as a tetrameric complex, kept inactive by its binding to several chaperone proteins. It can be activated in response to endogenous ligands or exogenous xenobiotic ligands such as PAHs. In our experimental conditions, no AhR expression modulation was observed after PM<sub>2.5-0.3</sub> exposures. This can be explained by the early induction of the expression of this transcription factor following environmental exposure. Gupta et al., demonstrated AhR involvement in early responses with an activation of AhR-dependent pathways 30 min after exposure of bronchial cells (BEAS-2B) to wood smoke particles at 100 µg/mL (Gupta et al., 2021). Bardan et al., demonstrated exposure of BEAS-2B cells to PM<sub>2.5</sub> at 3 or 12 µg/cm<sup>2</sup> induced a significant increase of AhR expression after 6 and 24 h (Badran et al., 2020). Gualtieri et al., reported that the expression of *CYP1A1*, an AhR-regulated gene, was significantly increased in BEAS-2B cells after 24 h of PM<sub>2.5</sub> exposure at 0.5, 2.5 or 5 µg/cm<sup>2</sup>, but AhR level was rather decrease after 24 h of exposure (Gualtieri et al., 2011). In our study, the presence of PAHs on PM<sub>2.5-0.3</sub> probably lead to early activation of AhR by PAH ligand binding, allowing translocation of AhR to the nucleus and generating subsequent biological responses. Upon ligand binding, AhR activates the transcription of metabolic genes such as *CYP1B1* and *CYP1A1* that can catalyze the biotransformation of various xenobiotics generating metabolites that can be highly reactive (Petrulis and Perdew, 2002; Shimada, 2006). Besides, recent studies demonstrated that AhR activation decreases *CXCL10* expression (Rael et al., 2018; Zablocki-Thomas et al., 2020), but the mechanisms involved remain unclear. Therefore, the main effects observed in our study seem to be related to the presence of PAHs on the surface of PM<sub>2.5-0.3</sub>, likely via the AhR-activation pathway. However, we did not find this modulation after analysis with the graphic and classical methods, probably because we worked "all exposure times combined" to increase the statistical power of our analyses.

Another inflammation biomarker, GM-CSF, is of particular interest. GM-CSF is a monomeric glycoprotein that functions as a Th2 cytokine stimulating the production of granulocytes (neutrophils, eosinophils, and basophils). Recent studies show that GM-CSF is a critical factor regulating pulmonary accumulation of eosinophils and neutrophils; an important mechanism which facilitates allergen sensitization, airway eosinophilia, and thus asthma exacerbation (Kim et al., 2020; Nakagome and Nagata, 2018; Nobs et al., 2021). In our study, a significant differential expression of GM-CSF was observed after exposures of EpiA to PMTraf at 45 µg/cm<sup>2</sup>, regardless of the analysis method used. However, no expression modulation was observed at 90 µg/cm<sup>2</sup>. Concerning PMInd, although graph analysis on pairwise expression ratio did not allow a differential expression of GM-CSF to be observed, this gene was at the limit of disjunction from the network after exposures of 90 µg/cm<sup>2</sup>. A significant dose-dependent up-regulation was observed when the classical  $\Delta\Delta C_t$  method was applied. Comparatively no significant modulation of GM-CSF expression was observed after EpiH exposure to PMInd or PMTraf. Our results suggest that PM<sub>2.5-0.3</sub> induces a greater inflammatory response in EpiA than in EpiH. Sotty et al. corroborate that when using healthy and diseased organotypic mucociliary-phenotype models to study the impact of fine and ultrafine particles. They demonstrate that GM-CSF secretion is significantly increased in asthma-diseased human bronchial epithelial cells after acute or repeated exposure to ultrafine particles while observing no secretion modulation

in healthy cells. Those authors conclude that asthmatic cells are more sensitive than healthy cells to particles (Sotty et al., 2019).

Comparing the amount of corresponding RNA transcripts present in the samples is often mentioned as one of the main difficulties in comparing gene expression levels. To determine whether the amount of target RNA changes between several conditions, RTqPCR is the method of choice. This method is applicable to all experimental conditions, is very sensitive, and provides Ct values which are assumed to be proportional to the target RNA amounts. However, RTqPCR's main limitation is that any change in any RNA amount will modify the total RNA (several thousands of different RNAs) quantification. Thus, changes in quantified amounts are not directly understandable. To interpret the results, the  $\Delta\Delta C_t$  method is classically used (Livak and Schmittgen, 2001). This method is based on choosing a housekeeping gene, which is supposed to have the same expression level in all samples and is used as an internal control in each sample. It is an easy method to use and allows gene expression modulation, up- or down-regulated or unchanged compared to the control condition, to be presented graphically or in heatmaps, as in our study. When applying the classical  $\Delta\Delta C_t$  method, we often found significant gene expression modulation following repeated PM<sub>2.5-0.3</sub> exposures, whatever the particles type and epithelium status, but several limitations are noted. This method relies on comparing target genes with a housekeeping gene, thus it does not allow classification of genes into groups and identification of co-regulations. Furthermore, choosing the housekeeping gene is a delicate issue. Indeed, the supposition that the housekeeping gene's expression level is the same in all samples and conditions is rarely verified. Several studies show the expression of some commonly used housekeeping genes in humans to be modified depending on the experimental conditions tested (Gu et al., 2021; Panagodimou et al., 2022; Raaijmakers et al., 2002). To limit the impact of unexpected variations in housekeeping genes, data normalization by geometric averaging of several housekeeping genes is recommended (Vandesompele et al., 2002). In our study, we chose to introduce two housekeeping genes, *HPRT* and *GAPDH*, and the significance of the results obtained differed depending on the gene used in the classical  $\Delta\Delta C_t$  analysis. The classical  $\Delta\Delta C_t$  method allow to visualize the direction of the gene expression modulation (up or down-regulation) but results remain statistically weak.

To optimize our results analysis, we implemented, in addition to the  $\Delta\Delta C_t$  method, a graph analysis on pairwise expression ratio (Curis et al., 2019). This method is more robust than, and can be seen as a generalization of, the classical  $\Delta\Delta C_t$  method. Housekeeping genes are considered in the same way as target genes. Individual tests are performed to determine whether a given pair of genes experience the same expression change in two different experimental conditions. If the logarithm of ratio of two RNA amounts does not change (the test is not significant), both target genes share similar expression actions between the tested conditions. Groups of genes of homogeneous behavior are built, thus allowing easier graphical interpretation. In our study, graph analysis method results indicated some genes, such as those involved in metabolism and inflammation, were significantly modulated (up- or down-regulated), as corroborated by the classical analysis. To improve our results, we should consider repeating the experiments using more samples for each experimental condition. In this way, the statistical power would be increased, and it would be possible to highlight subtler modulations in gene regulation.

## 5. Conclusion

The originality of this work was to apply a recent graph analysis method to assess gene expression modulation of bronchial epithelium reconstituted from healthy or asthmatic donors, after exposures to fine particles from different emission sources. The graphical analysis on pairwise expression ratio method has better statistical properties than the classical  $\Delta\Delta C_t$  method. Indeed, unlike the classical method, it accounts for co-expressions between all genes and gives an overview of all

gene associations related to the comparison of the experimental conditions. This methodology is still very little used and needs to be refined to answer more specific questions arising from our study, for example, by modeling gene expressions over exposure time to a greater understanding of their trajectory.

#### CRedit

Philomène Despréaux: Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Writing—original draft; Capucine Jeanton: Methodology, Formal analysis; Dorota Desaulle: Methodology, Formal analysis, Proof-reading; Margueritta Al Zallouha: Methodology, Formal analysis, Proof-reading; Anthony Verdin: Proof-reading; Isabelle Momas: Supervision, Proof-reading; Sophie Achar: Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Investigation, Writing original draft, Visualization, Resources, Data curation, Funding acquisition, and Supervision.

#### Funding

Collection and characterization of fine particles were supported by the French National Agency for Food, Environment, and Occupational Health Safety (ANSES, EST 01-60). Philomène Despréaux received a doctoral grant from the French Agency for the Environment and Energy Management (ADEME) and the Air Quality Research Network Paris Region (DimQI<sup>2</sup>).

#### Declaration of competing interest

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

#### Data availability

No data was used for the research described in the article.

#### Acknowledgments

The authors would like to thank Dr Emmanuel Curis and Dr Anne-Laure Schang for their helpful discussions and advice. They would also like to thank The Proofreading Company Limited Tate & Clayburn, for their proofreading services.

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.envres.2023.115296>.

#### References

- Abbas, I., Badran, G., Verdin, A., Ledoux, F., Roumie, M., Lo Guidice, J.-M., Courcot, D., Garçon, G., 2019. In vitro evaluation of organic extractable matter from ambient PM<sub>2.5</sub> using human bronchial epithelial BEAS-2B cells: cytotoxicity, oxidative stress, pro-inflammatory response, genotoxicity, and cell cycle deregulation. *Environ. Res.* 171, 510–522. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.01.052>.
- Achard, S., Seurat, E., Achawi, S., Schang, A.-L., Verdin, A., Cazier, F., Courcot, D., 2019. Biological response modulation of human reconstituted airway epithelium repeatedly exposed to PM<sub>0.3-2.5</sub>. *Toxicol. Lett.* 314, S102–S102.
- Anderson, S.E., Khurshid, S.S., Meade, B.J., Lukomska, E., Wells, J.R., 2013. Toxicological analysis of limonene reaction products using an in vitro exposure system. *Toxicol. Vitro: An International Journal Published in Association with BIBRA* 27 (2), 721–730. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2012.11.017>.
- Badran, G., Ledoux, F., Verdin, A., Abbas, I., Roumie, M., Genevray, P., Landkocz, Y., Lo Guidice, J.-M., Garçon, G., Courcot, D., 2020. Toxicity of fine and quasi-ultrafine particles: focus on the effects of organic extractable and non-extractable matter fractions. *Chemosphere* 243, 125440. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125440>.
- Bardet, G., Achar, S., Lore, T., Desauziers, V., Momas, I., Seta, N., 2014. A model of human nasal epithelial cells adapted for direct and repeated exposure to airborne pollutants. *Toxicol. Lett.* 229 (1), 144–149. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2014.05.023>.
- Baxter, A., Thain, S., Banerjee, A., Haswell, L., Parmar, A., Phillips, G., Minet, E., 2015. Targeted omics analyses, and metabolic enzyme activity assays demonstrate maintenance of key mucociliary characteristics in long term cultures of reconstituted human airway epithelia. *Toxicol. Vitro* 29 (5), 864–875. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2015.03.004>.
- Benjamini, Y., Hochberg, Y., 1995. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J. Roy. Stat. Soc. B* 57 (1), 289–300.
- Bisig, C., Comte, P., Güdel, Jan, Czerwinski, M., Mayer, A., Müller, L., Petri-Fink, A., Rothen-Rutishauser, B., 2018. Assessment of lung cell toxicity of various gasoline engine exhausts using a versatile in vitro exposure system. *Environ. Pollut.* 235, 263–271. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.12.061>.
- Borgie, M., Ledoux, F., Verdin, A., Cazier, F., Greige, H., Shirali, P., Courcot, D., Dagher, Z., 2015. Genotoxic and epigenotoxic effects of fine particulate matter from rural and urban sites in Lebanon on human bronchial epithelial cells. *Environ. Res.* 136, 352–362. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2014.10.010>.
- Casalino-Matsuda, S.M., Monzon, M.E., Day, A.J., Forteza, R.M., 2009. Hyaluronan fragments/CD44 mediate oxidative stress-induced MUC5B up-regulation in airway epithelium. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 40 (3), 277–285. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2008-00730C>.
- Casalino-Matsuda, S.M., Monzon, M.E., Forteza, R.M., 2006. Epidermal growth factor receptor activation by epidermal growth factor mediates oxidant-induced goblet cell metaplasia in human airway epithelium. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 34 (5), 581–591. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2005-0386OC>.
- Cazier, F., Genevray, P., Dewaele, D., Nouali, H., Verdin, A., Ledoux, F., Hachimi, A., Courcot, L., Billet, S., Bouhsina, S., Shirali, P., Garçon, G., Courcot, D., 2016. Characterisation and seasonal variations of particles in the atmosphere of rural, urban and industrial areas: organic compounds. *J. Environ. Sci.* 44, 45–56. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2016.01.014>.
- Cervená, T., Vrbova, K., Rossnerova, A., Topinka, J., Rossner, P., 2019. Short-term and long-term exposure of the MucilAir™ model to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Alternatives to Laboratory Animals* 47 (1), 9–18. <https://doi.org/10.1177/0261192919841484>.
- Chen, Y., Luo, X.-S., Zhao, Z., Chen, Q., Wu, D., Sun, X., Wu, L., Jin, L., 2018. Summer–winter differences of PM<sub>2.5</sub> toxicity to human alveolar epithelial cells (A549) and the roles of transition metals. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 165, 505–509. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.09.034>.
- Curis, E., Courtin, C., Geoffroy, P.A., Laplanche, J.-L., Saubamé, B., Marie-Claire, C., 2019. Determination of sets of covarying gene expression using graph analysis on pairwise expression ratios. *Bioinformatics* 35 (2), 258–265. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty629>.
- Dergham, M., Lepers, C., Verdin, A., Cazier, F., Billet, S., Courcot, D., Shirali, P., Garçon, G., 2015. Temporal–spatial variations of the physicochemical characteristics of air pollution Particulate Matter (PM<sub>2.5-0.3</sub>) and toxicological effects in human bronchial epithelial cells (BEAS-2B). *Environ. Res.* 137, 256–267. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2014.12.015>.
- Esser, C., 2016. The aryl hydrocarbon receptor in immunity: tools and potential. In: Cuturi, M.C., Aneon, I. (Eds.), *Suppression and Regulation of Immune Responses: Methods and Protocols*, ume II. Springer, pp. 239–257. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3139-2\\_16](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3139-2_16).
- Frieke Kuper, C., Grollers-Mulderij, M., Maarschalkerweerd, T., Meulendijks, N.M.M., Reus, A., van Acker, F., Zondervan-van den Beuken, E.K., Wouters, M.E.L., Bijlma, S., Kooter, I.M., 2015. Toxicity assessment of aggregated/agglomerated cerium oxide nanoparticles in an in vitro 3D airway model: the influence of mucociliary clearance. *Toxicol. Vitro: An International Journal Published in Association with BIBRA* 29 (2), 389–397. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2014.10.017>.
- Griffith, J.W., Sokol, C.L., Luster, A.D., 2015. Chemokines and chemokine receptors: positioning cells for host defense and immunity. *Annu Rev Immunol.* 32, 659–702. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032713-120145>.
- Gu, Y., Tang, S., Wang, Z., Cai, L., Lian, H., Shen, Y., Zhou, Y., 2021. A pan-cancer analysis of the prognostic and immunological role of β-actin (ACTB) in human cancers. *Bioengineered* 12 (1), 6166–6185. <https://doi.org/10.1080/21655979.2021.1973220>.
- Gualtieri, M., Grollino, M.G., Consales, C., Costabile, F., Manigrasso, M., Avino, P., Auferheide, M., Cordelli, E., Di Liberto, L., Petralia, E., Raschella, G., Stracquadanio, M., Wiedensohler, A., Pacchierotti, F., Zanini, G., 2018. Is it the time to study air pollution effects under environmental conditions? A case study to support the shift of in vitro toxicology from the bench to the field. *Chemosphere* 207, 552–564. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.05.130>.
- Gualtieri, M., Ovreivik, J., Mollerup, S., Asare, N., Longhin, E., Dahlman, H.-J., Camatini, M., Holme, J.A., 2011. Airborne urban particles (Milan winter-PM<sub>2.5</sub>) cause mitotic arrest and cell death: effects on DNA, mitochondria, AhR binding and spindle organization. *Mutat. Res.* 713 (1–2), 18–31. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2011.05.011>.
- Gupta, A., Sasse, S.K., Gruca, M.A., Sanford, L., Dowell, R.D., Gerber, A.N., 2021. Deconvolution of multiplexed transcriptional responses to wood smoke particles defines rapid aryl hydrocarbon receptor signaling dynamics. *J. Biol. Chem.* 297 (4), 101147. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.101147>.
- Gutiérrez-Vázquez, C., Quintana, F.J., 2018. Regulation of the immune response by the aryl hydrocarbon receptor. *Immunity* 48 (1), 19–33. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.12.012>.
- Halwani, R., Al-Muhsen, S., Al-Jahdali, H., Hamid, Q., 2011. Role of transforming growth factor-β in airway remodeling in asthma. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 44 (2), 127–133. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2010-0027TR>.
- Hammond, J., Maher, B.A., Gonet, T., Bautista, F., Allsop, D., 2022. Oxidative stress, cytotoxic and inflammatory effects of urban ultrafine road-deposited dust from the



- UK and Mexico in human epithelial lung (Calu-3) cells. *Antioxidants* 11 (9). <https://doi.org/10.3390/antiox11091814>. Art. 9.
- Jia, H., Liu, Y., Guo, D., He, W., Zhao, L., Xia, S., 2021. PM2.5-induced pulmonary inflammation via activating of the NLRP3/caspase-1 signaling pathway. *Environ. Toxicol.* 36 (3), 298–307. <https://doi.org/10.1002/tox.23035>.
- Kaspar, J.W., Niture, S.K., Jaiswal, A.K., 2009. Nrf2:Keap1 (Keap1) signaling in oxidative stress. *Free Radical Biol. Med.* 47 (9), 1304–1309. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.07.035>.
- Kawajiri, K., Fujii-Kuriyama, Y., 2017. The aryl hydrocarbon receptor: a multifunctional chemical sensor for host defense and homeostatic maintenance. *Exp. Anim.* 66 (2), 75–89. <https://doi.org/10.1538/expanim.16-0092>.
- Kim, Y.-M., Kim, H., Lee, S., Kim, S., Lee, J.-U., Choi, Y., Park, H.W., You, G., Kang, H., Lee, S., Park, J.-S., Park, Y., Park, H.-S., Park, C.-S., Lee, S.-W., 2020. Airway G-CSF identifies neutrophilic inflammation and contributes to asthma progression. *Eur. Respir. J.* 55 (2) <https://doi.org/10.1183/13993003.00827-2019>.
- Kiyono, K., Suzuki, H.I., Matsuyama, H., Morishita, Y., Komuro, A., Kano, M.R., Sugimoto, K., Miyazono, K., 2009. Autophagy is activated by TGF-beta and potentiates TGF-beta-mediated growth inhibition in human hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Res.* 69 (23), 8844–8852. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-4401>.
- Kooter, I.M., Grollers-Mulderij, M., Steenhof, M., Duistermaat, E., van Acker, F.A.A., Staal, Y.C.M., Tromp, P.C., Schoen, E., Kuper, C.F., van Someren, E., 2016. Cellular effects in an in vitro human 3D cellular airway model and a549/BEAS-2B in vitro cell cultures following air exposure to cerium oxide particles at an air-liquid interface. *Applied In Vitro Toxicology* 2 (1), 56–66. <https://doi.org/10.1089/aivt.2015.0030>.
- Kouassi, K.S., Billet, S., Garçon, G., Verdin, A., Diouf, A., Cazier, F., Djaman, J., Courcot, D., Shirali, P., 2010. Oxidative damage induced in A549 cells by physically and chemically characterized air particulate matter (PM2.5) collected in Abidjan, Cote d'Ivoire. *J. Appl. Toxicol.* 30 (4), 310–320. <https://doi.org/10.1002/jat.1496>.
- Latella, G., 2018. Redox imbalance in intestinal fibrosis: beware of the tgfβ-1, ROS, and Nrf2 connection. *Dig. Dis. Sci.* 63 (2), 312–320. <https://doi.org/10.1007/s10620-017-4887-1>.
- Lee, I.-T., Yang, C.-M., 2012. Role of NADPH oxidase/ROS in pro-inflammatory mediators-induced airway and pulmonary diseases. *Biochem. Pharmacol.* 84 (5), 581–590. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2012.05.005>.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif.)* 25 (4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.
- Longhin, E., Pezzolato, E., Mantecchia, P., Holme, J.A., Franzetti, A., Camatini, M., Gualtieri, M., 2013. Season linked responses to fine and quasi-ultrafine Milan PM in cultured cells. *Toxicol. Vitro* 27 (2), 551–559. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2012.10.018>.
- Lu, X., Li, R., Yan, X., 2021. Airway hyperresponsiveness development and the toxicity of PM2.5. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 28 (6), 6374–6391. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-12051-w>.
- McAlinden, K.D., Deshpande, D.A., Ghavami, S., Xenaki, D., Sohal, S.S., Oliver, B.G., Haghii, M., Sharma, P., 2019. Autophagy activation in asthma airways remodeling. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 60 (5), 541–553. <https://doi.org/10.1165/rmb.2018-01690C>.
- Meldrum, K., Gant, T.W., Leonard, M.O., 2017. Diesel exhaust particulate associated chemicals attenuate expression of CXCL10 in human primary bronchial epithelial cells. *Toxicol. Vitro: An International Journal Published in Association with BIBRA* 45 (Pt 3), 409–416. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2017.06.023>.
- Mishra, V., Banga, J., Silveyra, P., 2018. Oxidative stress and cellular pathways of asthma and inflammation: therapeutic strategies and pharmacological targets. *Pharmacol. Therapeut.* 181, 169–182. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.08.011>.
- Mülhopt, S., Dilger, M., Diabaté, S., Schlager, C., Krebs, T., Zimmermann, R., Buters, J., Oeder, S., Wascher, T., Weiss, C., Paur, H.-R., 2016. Toxicity testing of combustion aerosols at the air-liquid interface with a self-contained and easy-to-use exposure system. *J. Aerosol Sci.* 96, 38–55. <https://doi.org/10.1016/j.jaerosci.2016.02.005>.
- Nakagome, K., Nagata, M., 2018. Involvement and possible role of eosinophils in asthma exacerbation. *Front. Immunol.* 9, 2220. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02220>.
- Nobs, S.P., Pohlmeier, L., Li, F., Kayhan, M., Becher, B., Kopf, M., 2021. GM-CSF instigates a dendritic cell-T-cell inflammatory circuit that drives chronic asthma development. *J. Allergy Clin. Immunol.* 147 (6), 2118–2133. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2020.12.639> e3.
- Øvrevik, J., 2019. Oxidative potential versus biological effects: a review on the relevance of cell-free/abiotic assays as predictors of toxicity from airborne particulate matter. *Int. J. Mol. Sci.* 20 (19), 4772. <https://doi.org/10.3390/ijms20194772>.
- Øvrevik, J., Refsnes, M., Låg, M., Holme, J.A., Schwarze, P.E., 2015. Activation of proinflammatory responses in cells of the airway mucosa by particulate matter: oxidant- and non-oxidant-mediated triggering mechanisms. *Biomolecules* 5 (3), 1399–1440. <https://doi.org/10.3390/biom5031399>.
- Pangodimou, E., Koika, V., Markatos, F., Kaponis, A., Adonakis, G., Georgopoulos, N.A., Markantes, G.K., 2022. Expression stability of ACTB, 18S, and GAPDH in human placental tissues from subjects with PCOS and controls: GAPDH expression is increased in PCOS. *Hormones (Basel)* 21 (2), 329–333. <https://doi.org/10.1007/s42000-022-00372-z>.
- Park, J., Lee, K.-H., Kim, H., Woo, J., Heo, J., Lee, C.-H., Yi, S.-M., Yoo, C.-G., 2021. The impact of organic extracts of seasonal PM2.5 on primary human lung epithelial cells and their chemical characterization. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 28 (42) <https://doi.org/10.1007/s11356-021-14850-1>, 59868–59880.
- Persoz, C., Achard, S., Leleu, C., Momas, I., Seta, N., 2010. An in vitro model to evaluate the inflammatory response after gaseous formaldehyde exposure of lung epithelial cells. *Toxicol. Lett.* 195 (2–3), 99–105. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2010.03.003>.
- Petrulis, J.R., Pertew, G.H., 2002. The role of chaperone proteins in the aryl hydrocarbon receptor core complex. *Chem. Biol. Interact.* 141 (1), 25–40. [https://doi.org/10.1016/S0009-2797\(02\)00064-9](https://doi.org/10.1016/S0009-2797(02)00064-9).
- Potaczek, D.P., Miethe, S., Schindler, V., Alhamdan, F., Garn, H., 2020. Role of airway epithelial cells in the development of different asthma phenotypes. *Cell. Signal.* 69, 109523. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2019.109523>.
- Raaijmakers, M.H.G.P., van Emst, L., de Witte, T., Mensink, E., Raymakers, R.A.P., 2002. Quantitative assessment of gene expression in highly purified hematopoietic cells using real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Exp. Hematol.* 30 (5), 481–487. [https://doi.org/10.1016/S0301-472X\(02\)00787-7](https://doi.org/10.1016/S0301-472X(02)00787-7).
- Radonić, A., Thulke, S., Mackay, I.M., Landt, O., Siegt, W., Nitsche, A., 2004. Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 313 (4), 856–862. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2003.11.177>.
- Rael, L.T., Bar-Or, R., Banton, K.L., Mains, C.W., Roshon, M., Tanner, A.H., Lieser, M.J., Acuna, D.L., Bar-Or, D., 2018. The anti-inflammatory effect of LMWF5A and N-acetyl kynurenine on macrophages: involvement of aryl hydrocarbon receptor in mechanism of action. *Biochemistry and Biophysics Reports* 15, 61–67. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2018.06.006>.
- Rossner Jr., P., Cervena, T., Vojtisek-Lom, M., Vrbova, K., Ambroz, A., Novakova, Z., Elzeinova, F., Margaryan, H., Beranek, V., Pechout, M., Macoun, D., Klem, J., Rossnerova, A., Ciganek, M., Topinka, J., 2019. The biological effects of complete gasoline engine emissions exposure in a 3D human airway model (MucilAir™) and in human bronchial epithelial cells (BEAS-2B). *Int. J. Mol. Sci.* 20 (2), 5710. <https://doi.org/10.3390/ijms20225710>.
- Russell, W.M.S., Burch, R.L., 1959. *The Principles of Humane Experimental Technique*. Methuen.
- Shimada, T., 2006. Xenobiotic-metabolizing enzymes involved in activation and detoxification of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. *Drug Metabol. Pharmacokinet.* 21 (4), 257–276. <https://doi.org/10.2133/dmpk.21.257>.
- Sotty, J., Garçon, G., Denayer, F.-O., Alleman, L.-Y., Saleh, Y., Perdrix, E., Riffault, V., Dubot, P., Lo-Guidice, J.-M., Canivet, 2019. Toxicological Effects of Ambient Fine (PM2.5-0.18) and Ultrafine (PM0.18) Particles in Healthy and Diseased 3D Organotypic Mucociliary-Phenotype Models. Elsevier Enhanced Reader. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.108538>.
- Thangavel, P., Park, D., Lee, Y.-C., 2022. Recent insights into particulate matter (PM2.5)-Mediated toxicity in humans: an overview. *Int. J. Environ. Res. Publ. Health* 19 (12), 7511. <https://doi.org/10.3390/ijerph19127511>.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paep, A., Speleman, F., 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 3 (7) <https://doi.org/10.1186/gb-2002-3-7-research0034>. RESEARCH0034.
- Walker, N.J., 2002. Tech.Sight. A technique whose time has come. *Science (New York, N. Y.)* 296 (5567), 557–559. <https://doi.org/10.1126/science.296.5567.557>.
- Wottrich, R., Diabaté, S., Krug, H.F., 2004. Biological effects of ultrafine model particles in human macrophages and epithelial cells in mono- and co-culture. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 207 (4), 353–361. <https://doi.org/10.1078/1438-4639-00300>.
- Xu, H., Bionaz, M., Sloboda, D.M., Ehrlich, L., Li, S., Newnham, J.P., Dudenhausen, J.W., Henrich, W., Plagemann, A., Challis, J.R., Braun, T., 2015. The dilution effect and the importance of selecting the right internal control genes for RT-qPCR: A paradigmatic approach in fetal sheep. *BMC Research Notes* 8, 58. <https://doi.org/10.1186/s13104-015-0973-7>.
- Zablocki-Thomas, L., Menzies, S.A., Lehner, P.J., Manel, N., Benaroch, P., 2020. A genome-wide CRISPR screen identifies regulation factors of the TLR3 signalling pathway. *Innate Immun.* 26 (6), 459–472. <https://doi.org/10.1177/1753425920915507>.
- Zavala, J., O'Brien, B., Lichtveld, K., Sexton, K.G., Rusyn, I., Jaspers, I., Vizuete, W., 2016. Assessment of biological responses of EpiAirway 3-D cell constructs versus A549 cells for determining toxicity of ambient air pollution. *Inhal. Toxicol.* 28 (6), 251–259. <https://doi.org/10.3109/08958378.2016.1157227>.
- Zelko, I.N., Mariani, T.J., Fols, R.J., 2002. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radical Biol. Med.* 33 (3), 337–349. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(02\)00905-x](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(02)00905-x).
- Zhou, Z., Liu, Y., Duan, F., Qin, M., Wu, F., Sheng, W., Yang, L., Liu, J., He, K., 2015. Transcriptomic analyses of the biological effects of airborne PM2.5 exposure on human bronchial epithelial cells. *PLoS One* 10 (9), e0138267. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138267>.
- Ling, D., & Salvaterra, P.M., 2011. Robust RT-qPCR data normalization: validation and selection of internal reference genes during post-experimental data analysis. *PLoS One* 15:e(3):e17762. doi:10.1371/journal.pone.0017762.

Pour enrichir les résultats présentés dans ce premier article, des analyses complémentaires ont été réalisées afin de comparer :

- l'expression génique basale des Epi-S et des Epi-A ;
- l'expression génique basale d'épithéliums du même statut mais issus de reconstructions différentes ;
- la modulation de l'expression génique après expositions aux PMInd par rapport à celle après expositions aux PMTraf ;
- la sensibilité des épithéliums en fonction de leur statut physiopathologique.

#### IV.1.3.3. Comparaison de l'expression génique à l'état basal des Epi-S et des Epi-A

Afin de comparer l'expression génique à l'état basal, c'est-à-dire en absence d'exposition, des épithéliums de statut physiopathologique différent, l'expression génique des Epi-A « CONT » a été comparée à celle des Epi-S « CONT », toutes reconstructions confondues. Les résultats obtenus sont présentés sur la Figure 33.

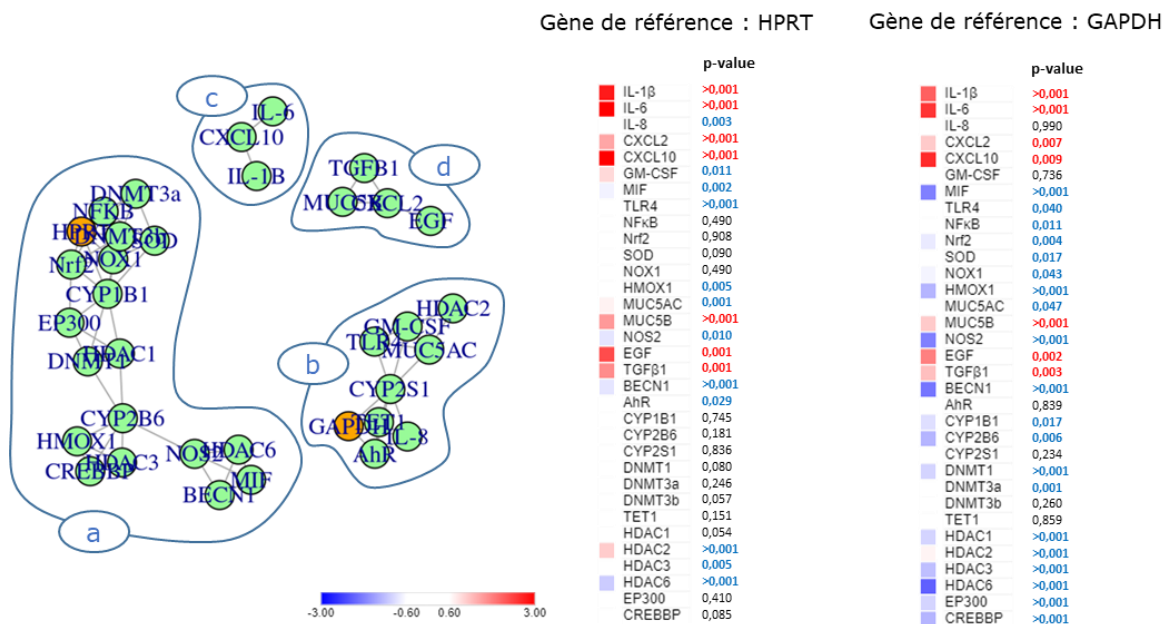


Figure 33 : Comparaison de l'expression génique basale des Epi-A CONT par rapport aux Epi-S CONT (n ≥ 23). p-value : différence significative avec les deux méthodes d'analyse ; p-value : différence significative avec la méthode classique et limite de séparation avec la méthode d'analyse par réseaux ; p-value : significativité uniquement avec la méthode classique.

La comparaison de l'expression génique à l'état basal des Epi-A par rapport à celle des Epi-S par la méthode d'analyse graphique par réseaux permet d'obtenir quatre sous-graphes distincts.

Les deux gènes de référence (*HPRT* et *GAPDH*) ne sont pas retrouvés dans les mêmes sous-graphes (sous-graphe a et sous-graphe b respectivement), ce qui rend l'interprétation des résultats complexe. En effet, il est impossible de déterminer quel est le sous-graphe principal, c'est-à-dire le sous-graphe contenant les gènes dont l'expression n'est pas significativement différentielle entre les Epi-A et les Epi-S. Afin de contourner cette difficulté, l'introduction de davantage de gènes de référence dans l'analyse aurait été nécessaire.

Les deux autres sous-graphes (c et d) ne contiennent aucun des deux gènes de référence. Le sous-graphe c regroupe trois gènes de l'inflammation (*IL-1 $\beta$* , *CXCL10* et *IL-6*) et le sous-graphe d est constitué de deux gènes intervenant dans le remodelage tissulaire (*TGF $\beta$ 1* et *EGF*), d'un gène de l'inflammation (*CXCL2*) et d'un gène impliqué dans la production de mucus (*MUC5B*). L'ensemble de ces gènes sont donc différentiellement exprimés chez les Epi-A par rapport aux Epi-S. La représentation sous forme de heatmap, indique que les gènes de ces deux sous-groupes sont significativement surexprimés chez les Epi-A par rapport aux Epi-S, quel que soit le gène de référence utilisé.

**Messages clés :**

- Les expressions géniques basales des Epi-S et des Epi-A sont significativement différentes.
- Les gènes de l'inflammation (*IL-1 $\beta$* , *IL-6*, *CXCL2* et *CXCL10*), du remodelage tissulaire (*TGF $\beta$ 1* et *EGF*) et de la production de mucus (*MUC5B*) sont significativement surexprimés chez les Epi-A par rapport aux Epi-S.

#### IV.1.3.4. Comparaison de l'expression génique à l'état basal d'épithéliums du même statut mais issus de reconstructions différentes

Comme précisé dans le paragraphe Matériel et Méthodes spécifiques, les épithéliums utilisés pour cette étude sont issus de deux reconstructions différentes, R1 et R2

Ainsi, afin de déterminer si la reconstruction pouvait influencer l'expression génique basale des épithéliums, les expressions géniques des épithéliums CONT issus de la reconstruction R1 et de la reconstruction R2 ont été comparés grâce à la méthode d'analyse graphique par réseaux. Les résultats sont présentés sur la Figure 34.A pour les Epi-S et la Figure 34.B pour les Epi-A.

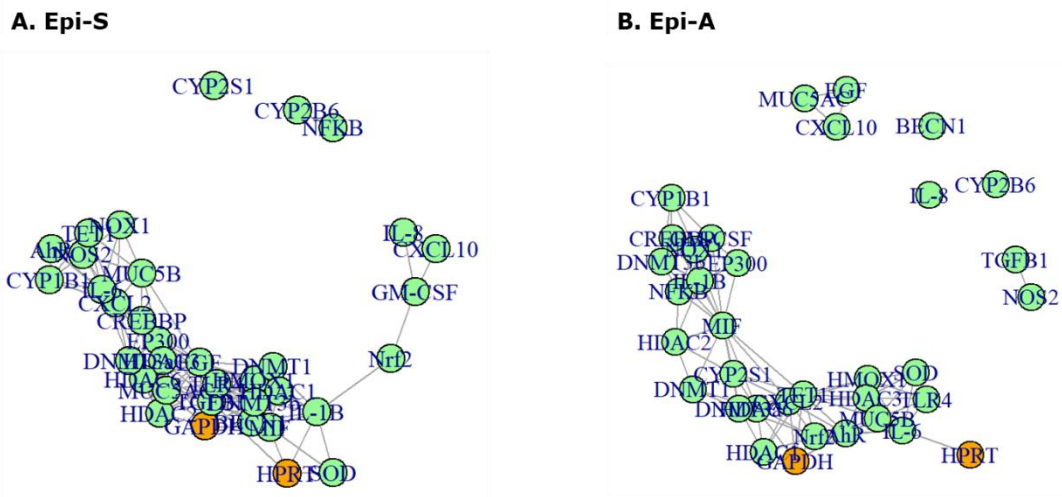


Figure 34 : Comparaison de l'expression génique basale d'épithéliums reconstruits à partir de cellules primaires provenant d'un même donneur mais issus de deux reconstructions différentes. **A.** Donneur sans pathologie respiratoire (Epi-S) et **B.** Donneur asthmatique (Epi-A) ( $n \geq 8$ ).

Quel que soit le statut physiopathologique des épithéliums, l'analyse par réseaux fait apparaître des graphes disjoints, indiquant une expression différentielle de certains gènes entre les reconstructions R1 et R2. Cet effet « reconstruction » est plus prononcé pour les Epi-A que pour les Epi-S.

Il est important de noter que les analyses présentées dans le premier article ont été réalisées à partir d'épithéliums issus d'une même reconstruction. Les Epi-S et Epi-A issus de R1 ont été exposés aux PMTra et aux PMInd à la concentration de  $45 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  et les Epi-S et Epi-A issus R2 à la concentration de  $90 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ . Par conséquent, l'effet « reconstruction » ne remet pas en question les résultats présentés.

Cependant, la comparaison de l'expression génique basale des Epi-S et des Epi-A a été réalisée en regroupant les données de toutes les manipulations. Les résultats doivent donc être interprétés avec prudence, car il semble y avoir à la fois un effet « statut physiopathologique » et un effet « reconstruction ».

#### Message clé :

- Un effet « reconstruction » est mis en évidence : l'expression génique basale d'épithéliums reconstruits à partir d'un même donneur mais issus de reconstructions différentes varie de manière significative.

#### IV.1.3.5. Comparaison de la modulation de l'expression génique suite aux expositions aux PM<sub>2.5-0.3</sub> en fonction de leur source d'émission

Dans le premier article, les conditions « exposés aux PMInd » et « exposés aux PMTraf » ont été comparées à la condition CONT pour les deux concentrations d'exposition (45 et 90 µg/cm<sup>3</sup>) et les deux statuts physiopathologiques.

Pour étudier plus finement la différence d'impact des PM<sub>2.5-0.3</sub> sur la modulation de l'expression génique en fonction de leur source d'émission, et donc de leur composition chimique, les conditions « exposés aux PMInd » et « exposés aux PMTraf » ont été comparées entre elles avec la méthode d'analyse graphique par réseaux et la méthode classique. Le groupe « exposés aux PMTraf » a arbitrairement été utilisé comme groupe de référence pour la construction des heatmaps.

Les résultats obtenus pour les Epi-S et pour les Epi-A sont présentés sur les Figures 35 et 36 respectivement.

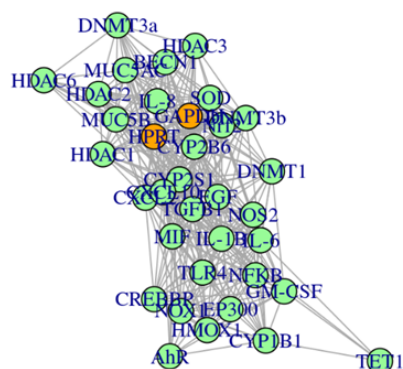
L'obtention de graphes connexes après l'analyse graphique par réseaux des données issues des Epi-S indique qu'il n'y a aucune différence significative dans la modulation de l'expression des gènes étudiés après des expositions aux PMInd par rapport aux expositions aux PMTraf, quelles que soient les concentrations d'exposition (Figure 35). Ces résultats sont confirmés avec la méthode classique lorsque *GAPDH* est utilisé comme gène de référence. Néanmoins, lorsque *HPRT* est utilisé comme gène de référence, les résultats indiquent que *TET1* (épigénétique) et *CYP1B1* (métabolisme) sont significativement plus fortement exprimés suite aux expositions aux PMInd par rapport aux expositions aux PMTraf pour les concentrations de 45 µg/cm<sup>3</sup> (Figure 35.A) et de 90 µg/cm<sup>3</sup> (Figure 35.B) respectivement.



Gène de référence : HPRT

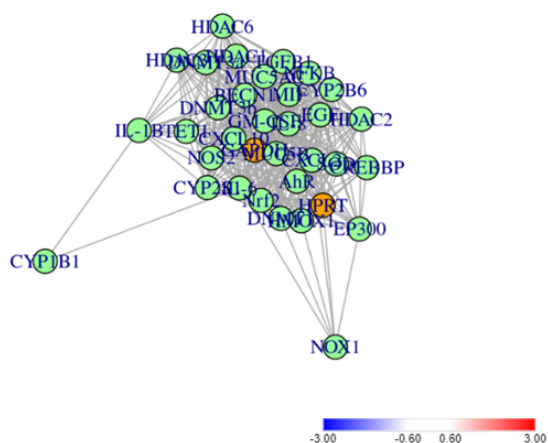
Gène de référence : GAPDH

**A. Epi-S 45µg/cm<sup>2</sup>**



	p-value		p-value
IL-1β	0,394	IL-1β	0,436
IL-6	0,347	IL-6	0,413
IL-8	0,739	IL-8	0,914
CXCL2	0,477	CXCL2	0,675
CXCL10	0,604	CXCL10	0,594
MIF	0,451	MIF	0,290
GM-CSF	0,208	GM-CSF	0,254
TLR4	0,202	TLR4	0,407
NFκB	0,115	NFκB	0,267
Nrf2	0,990	Nrf2	0,772
SOD	0,919	SOD	0,820
HMOX1	0,195	HMOX1	0,178
NOX1	0,242	NOX1	0,159
NOS2	0,512	NOS2	0,267
EGF	0,619	EGF	0,499
TGFβ1	0,684	TGFβ1	0,524
MUC5AC	0,607	MUC5AC	0,771
MUC5B	0,632	MUC5B	0,319
BECN1	0,622	BECN1	0,569
AhR	0,011	AhR	0,108
CYP1B1	0,215	CYP1B1	0,054
CYP2B6	0,942	CYP2B6	0,830
CYP2S1	0,866	CYP2S1	0,572
DNMT1	0,476	DNMT1	0,384
DNMT3a	0,400	DNMT3a	0,391
DNMT3b	0,963	DNMT3b	0,733
TET1	0,017	TET1	0,109
HDAC1	0,696	HDAC1	0,811
HDAC2	0,492	HDAC2	0,996
HDAC3	0,537	HDAC3	0,542
HDAC6	0,372	HDAC6	0,224
CREBBP	0,199	CREBBP	0,194
EP300	0,208	EP300	0,171

**B. Epi-S 90µg/cm<sup>2</sup>**



	p-value		p-value
IL-1β	0,094	IL-1β	0,381
IL-6	0,765	IL-6	0,998
IL-8	0,442	IL-8	0,989
CXCL2	0,565	CXCL2	0,523
CXCL10	0,400	CXCL10	0,879
MIF	0,465	MIF	0,924
GM-CSF	0,408	GM-CSF	0,858
TLR4	0,202	TLR4	0,407
NFκB	0,646	NFκB	0,843
Nrf2	0,478	Nrf2	0,797
SOD	0,996	SOD	0,545
HMOX1	0,936	HMOX1	0,411
NOX1	0,396	NOX1	0,252
NOS2	0,419	NOS2	0,772
EGF	0,774	EGF	0,742
TGFβ1	0,580	TGFβ1	0,984
MUC5AC	0,449	MUC5AC	0,967
MUC5B	0,630	MUC5B	0,885
BECN1	0,576	BECN1	0,984
AhR	0,585	AhR	0,805
CYP1B1	0,015	CYP1B1	0,059
CYP2B6	0,718	CYP2B6	0,757
CYP2S1	0,427	CYP2S1	0,738
DNMT1	0,864	DNMT1	0,363
DNMT3a	0,170	DNMT3a	0,443
DNMT3b	0,241	DNMT3b	0,857
TET1	0,223	TET1	0,738
HDAC1	0,206	HDAC1	0,428
HDAC2	0,948	HDAC2	0,504
HDAC3	0,115	HDAC3	0,226
HDAC6	0,102	HDAC6	0,390
CREBBP	0,936	CREBBP	0,426
EP300	0,971	EP300	0,333

Figure 35 : Comparaison de la modulation de l'expression des gènes après des expositions répétées aux PMInd par rapport aux expositions répétées aux PMTraF chez les Epi-S pour une concentration d'exposition de **A.** 45µg/cm<sup>2</sup> **B.** 90µg/cm<sup>2</sup> (n = 6). **p-value** : différence significative avec les deux méthodes d'analyse ; **p-value** : différence significative avec la méthode classique et limite de séparation avec la méthode d'analyse par réseaux ; **p-value** : significativité uniquement avec la méthode classique.

Contrairement à ce qui a été observé après exposition des Epi-S, les PMInd et les PMTraF semblent avoir un impact différent sur la réponse biologique des Epi-A.

En comparant l'expression des gènes après expositions aux PMInd et après expositions aux PMTraF à la concentration de 45µg/cm<sup>2</sup>, un sous-graphe disjoint composé de *CYP1B1* (métabolisme) et de *NOS2* (stress oxydant) est observé (Figure 36.A). La méthode classique indique que ces deux gènes sont significativement plus fortement exprimés après exposition aux PMInd par rapport aux PMTraF, quel que soit le gène de référence utilisé.



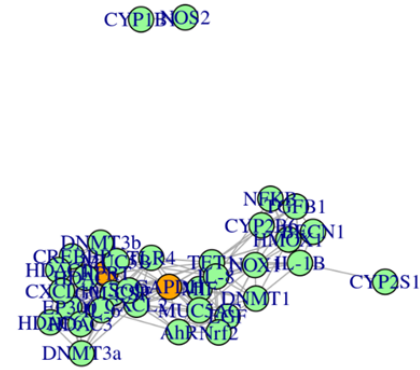
En faisant la même comparaison pour la concentration d'exposition de 90µg/cm<sup>2</sup>, il apparaît que quatre gènes, *CXCL10* (inflammation), *BECN1* (autophagie), *CYP2B6* (métabolisme) et *DNMT3b* (épigénétique), sont exprimés de manière différentielle après expositions aux PMInd par rapport aux expositions aux PMTraf. L'expression de *CXCL10* est significativement plus importante suite aux expositions aux PMInd par rapport aux expositions aux PMTraf. À l'inverse, les expressions de *BECN1*, *CYP2B6* et *DNMT3b* sont significativement moins élevées suite aux expositions aux PMInd par rapport aux expositions aux PMTraf (Figure 36.B).

Dans le premier article, les analyses réalisées ont permis de déterminer que *CYP1B1* était significativement surexprimé et *CXCL10* significativement sous-exprimé suite aux expositions aux PMInd et aux PMTraf par rapport à la condition CONT. Les résultats issus de cette analyse complémentaire permettent de conclure que *CYP1B1* est significativement plus fortement surexprimé suite à des expositions aux PMInd par rapport aux PMTraf. *CXCL10* est significativement plus fortement sous-exprimé suite à des expositions aux PMTraf par rapport aux PMInd.

Gène de référence : HPRT

Gène de référence : GAPDH

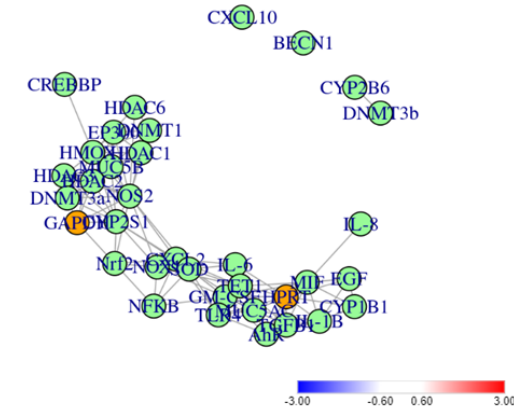
**A. Epi-A 45µg/cm<sup>2</sup>**



	p-value
IL-1β	0,143
IL-6	0,658
IL-8	0,053
CXCL2	0,819
CXCL10	0,484
MIF	0,272
GM-CSF	0,668
TLR4	0,582
NfκB	0,047
Nrf2	0,055
SOD	0,735
HMOX1	0,050
NOX1	0,087
NOS2	0,048
EGF	0,124
TGFβ1	0,053
MUC5AC	0,274
MUC5B	0,934
BECN1	0,027
AhR	0,171
CYP1B1	>0,001
CYP2B6	0,026
CYP2S1	0,011
DNMT1	0,063
DNMT3a	0,329
DNMT3b	0,961
TET1	0,360
HDAC1	0,791
HDAC2	0,915
HDAC3	0,573
HDAC6	0,382
CREBBP	0,550
EP300	0,523

	p-value
IL-1β	0,053
IL-6	0,551
IL-8	0,770
CXCL2	0,862
CXCL10	0,262
MIF	0,150
GM-CSF	0,577
TLR4	0,835
NfκB	0,011
Nrf2	0,504
SOD	0,790
HMOX1	0,013
NOX1	0,425
NOS2	0,033
EGF	0,506
TGFβ1	0,005
MUC5AC	0,516
MUC5B	0,425
BECN1	0,049
AhR	0,831
CYP1B1	>0,001
CYP2B6	0,176
CYP2S1	>0,001
DNMT1	0,487
DNMT3a	0,089
DNMT3b	0,415
TET1	0,517
HDAC1	0,087
HDAC2	0,614
HDAC3	0,012
HDAC6	0,107
CREBBP	0,153
EP300	0,147

**B. Epi-A 90µg/cm<sup>2</sup>**



	p-value
IL-1β	0,453
IL-6	0,512
IL-8	0,002
CXCL2	0,091
CXCL10	0,003
MIF	0,520
GM-CSF	0,607
TLR4	0,499
NfκB	0,161
Nrf2	0,004
SOD	0,032
HMOX1	0,082
NOX1	0,017
NOS2	0,119
EGF	0,462
TGFβ1	0,903
MUC5AC	0,790
MUC5B	0,021
BECN1	>0,001
AhR	0,939
CYP1B1	0,423
CYP2B6	>0,001
CYP2S1	0,119
DNMT1	>0,001
DNMT3a	0,001
DNMT3b	>0,001
TET1	0,658
HDAC1	0,001
HDAC2	>0,001
HDAC3	0,005
HDAC6	>0,001
CREBBP	>0,001
EP300	>0,001

	p-value
IL-1β	0,010
IL-6	0,008
IL-8	>0,001
CXCL2	0,254
CXCL10	>0,001
MIF	0,013
GM-CSF	0,059
TLR4	0,056
NfκB	0,292
Nrf2	0,352
SOD	0,191
HMOX1	0,570
NOX1	0,266
NOS2	0,748
EGF	>0,001
TGFβ1	0,007
MUC5AC	0,013
MUC5B	0,192
BECN1	>0,001
AhR	0,008
CYP1B1	0,010
CYP2B6	0,007
CYP2S1	0,748
DNMT1	0,092
DNMT3a	0,624
DNMT3b	>0,001
TET1	0,165
HDAC1	0,002
HDAC2	0,343
HDAC3	0,298
HDAC6	0,031
CREBBP	>0,001
EP300	0,033

Figure 36 : Comparaison de la modulation de l'expression des gènes après des expositions répétées aux PMInd par rapport aux expositions répétées aux PMTraf chez les Epi-A pour une concentration d'exposition de **A.** 45µg/cm<sup>2</sup> **B.** 90µg/cm<sup>2</sup> (n = 6). **p-value** : différence significative avec les deux méthodes d'analyse ; **p-value** : différence significative avec la méthode classique et limite de séparation avec la méthode d'analyse par réseaux ; **p-value** : significativité uniquement avec la méthode classique.

**Messages clés :**

- Les PMInd et les PMTraf n'ont pas d'impact significativement différent sur la modulation de l'expression génique des Epi-S
- Les PM2.5-0.3 de compositions chimiques différentes ont un impact distinct sur la modulation de l'expression génique des Epi-A.
- Les PMInd semblent avoir un impact plus marqué que les PMTraf sur les Epi-A.

#### IV.1.3.6. Comparaison de la modulation de l'expression génique suite aux expositions aux PM2.5-0.3 en fonction du statut physiopathologique des épithéliums

La méthode d'analyse graphique par réseaux a été utilisée pour évaluer la modulation de l'expression génique suite à des expositions répétées aux PM2.5-0.3 en fonction du statut physiopathologique. Pour tenter de s'affranchir de l'effet « reconstruction », une nouvelle équation mathématique a été construite avec plusieurs variables ( $X_{condition}$  d'exposition et  $X_{statut}$ ) et un terme d'interaction ( $\gamma_{X_{condition} \times X_{statut}}$ ). Le modèle proposé est le suivant :

$$Ct = \alpha_1 + \beta_1 X_{condition} + \beta_2 X_{statut} + \gamma_{X_{condition} \times X_{statut}} + \varepsilon_{1i}$$

Avec :

- $\alpha_1$  : ordonnée à l'origine
- $\beta_1$  : coefficient directeur de la droite
- $\varepsilon_i$  : erreur résiduelle suivant une loi normale centrée et hétéroscedastique

Dans ce modèle, l'analyse du terme d'interaction  $\gamma_{X_{condition} \times X_{statut}}$  permet de comparer l'expression génique des Epi-S et des Epi-A, après exposition aux PMTraf ou aux PMInd à 45 ou 90  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , tous temps confondus. Les résultats obtenus sont présentés sur la Figure 37.

Globalement, les résultats obtenus révèlent peu de différences significatives de la modulation de l'expression des gènes suite aux expositions aux PM2.5-0.3 entre les Epi-S et les Epi-A.

Concernant les PMInd, des graphes connexes sont obtenus quelle que soit la concentration d'exposition. Ces résultats indiquent qu'il n'y a pas de différence significative dans la modulation de l'expression des gènes après expositions aux PMInd entre les Epi-S et les Epi-A. Toutefois, un gène (*TET1*, épigénétique) se trouve en limite de dissociation après des expositions à 45  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  (Figure 37.A).

Concernant les PMTraf, *NOS2* (stress oxydant) et *CXCL10* (inflammation) sont différenciellement exprimés chez les Epi-S et les Epi-A suite à des expositions de 45  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  (Figure 37.B) et 90  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  (Figure 37.D) respectivement. De plus, pour la concentration de 90  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , trois gènes sont en limite d'expression différentielle : *BECN1* (autophagie) et *HDAC6* et *DNMT1* (épigénétique).

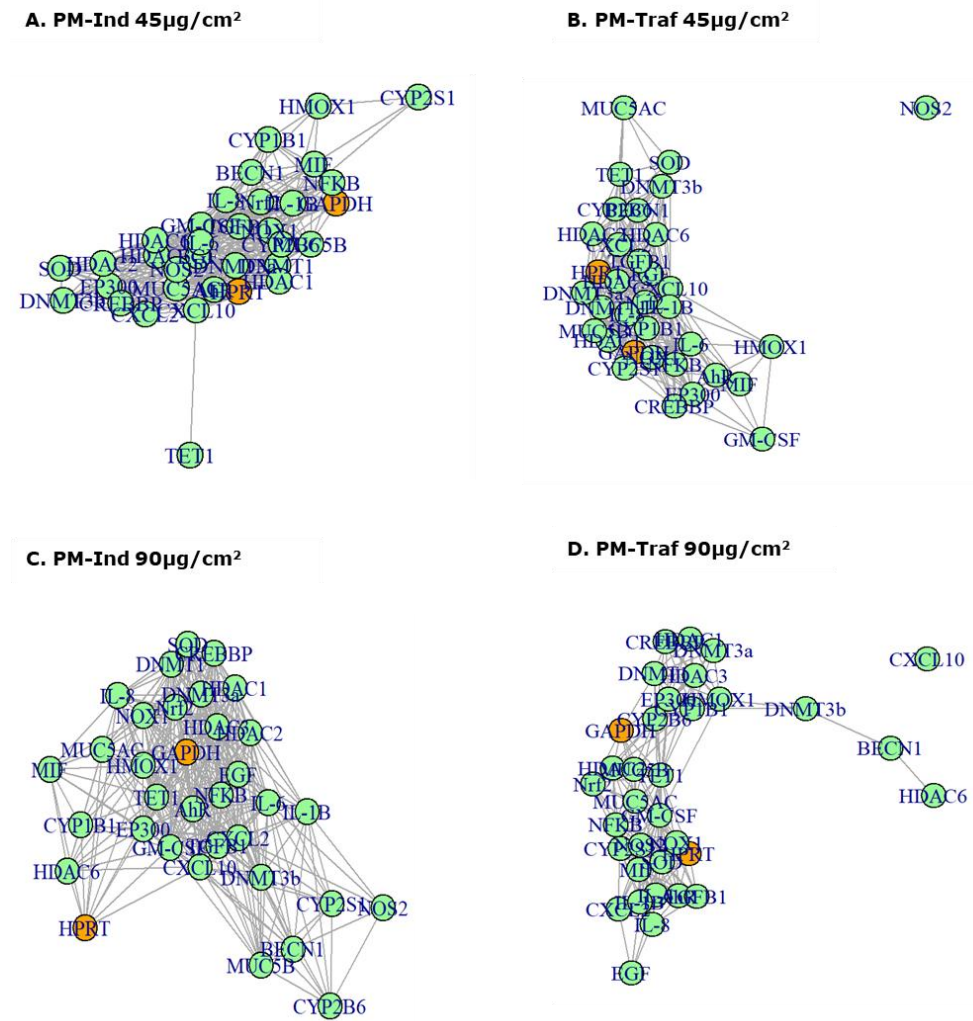


Figure 37 : Comparaison de la modulation de l'expression génique chez Epi-S et les Epi-A après expositions répétées aux **A.** PMInd à 45µg/cm<sup>2</sup> **B.** PMTraf à 45µg/cm<sup>2</sup> **C.** PMInd à 90µg/cm<sup>2</sup> **D.** PMTraf à 90µg/cm<sup>2</sup> (n ≥ 5)

Les résultats du premier article ont permis de démontrer que les expositions à 90 µg/cm<sup>2</sup> de PMTraf induisaient une diminution significative de *CXCL10* chez les Epi-S et les Epi-A. Les résultats de cette analyse complémentaire nous indiquent que le niveau de modulation de *CXCL10* n'était pas le même chez les Epi-S et chez les Epi-A. La sous-expression de *CXCL10* était significativement plus importante pour les Epi-A par rapport aux Epi-S.

**Message clés :**

- La sensibilité des épithéliums aux expositions aux PM2.5-0.3 semble dépendre de leur statut physiopathologique.
- Les Epi-A semblent présenter une plus grande sensibilité aux expositions aux PM2.5-0.3 que les Epi-S.

#### IV.1.4. Conclusion

Une des forces de cette première étude a été d'appliquer une méthode originale d'analyse graphique par réseaux pour évaluer la modulation de l'expression génique suite à des expositions répétées aux PM<sub>2.5-0.3</sub>. Contrairement à la méthode classique, la méthode d'analyse graphique par réseaux permet de donner une vue d'ensemble du comportement des gènes lors d'une comparaison entre deux conditions expérimentales. Elle permet de mettre en évidence des co-expressions éventuelles entre les gènes, c'est-à-dire d'identifier des sous-groupes de gènes qui sont modulés de manière similaire lorsque les deux conditions expérimentales sont comparées. Cette méthodologie est encore très peu utilisée à ce jour et mérite d'être développée.

Les gènes de référence sont illustrés en orange sur les graphes obtenus par l'analyse graphique par réseaux. Ils sont utilisés à titre indicatif afin de déterminer quel est le sous-groupe de gènes qui n'est pas différentiellement exprimé entre les deux conditions comparées. Pour l'une des analyses complémentaires, les deux gènes de référence (*HPRT* et *GAPDH*) n'ont pas été retrouvés dans le même sous-graphe, ce qui a compliqué l'interprétation des résultats. Pour prévenir ce type de situation, nous introduirons un troisième gène de référence (*RPL13*) dans toutes les analyses ultérieures présentées dans ce manuscrit.

Les résultats complémentaires obtenus avec la méthode d'analyse graphique par réseaux ont mis en évidence **un effet « statut physiopathologique » et un effet « reconstruction », en l'absence d'exposition**. Ces observations sur la variabilité entre les différents épithéliums amènent à considérer chaque épithélium comme un « individu » unique, avec des caractéristiques qui lui sont propres. Il semble donc important de multiplier les expérimentations avec différentes reconstructions, afin de réduire les biais potentiels, décrits ci-dessus. Par ailleurs, il serait pertinent d'envisager plusieurs lots pour chacun des statuts physiopathologiques afin d'évaluer l'effet de la variabilité interindividuelle au sein d'un même statut physiopathologique, ce qui n'a pas été envisagé dans cette étude.

Des raisons techniques et financières ne nous ont pas permis de répéter une nouvelle fois les expérimentations car le modèle MucilAir™ est un modèle relativement coûteux. Il a donc été envisagé de poursuivre ces travaux de thèse en utilisant un modèle moins onéreux. Ainsi, des cellules épithéliales humaines d'origine bronchique (hAECb) ont été utilisées pour la suite de ce travail de recherche.

Par ailleurs, les résultats présentés dans cette première étude indiquent que **les effets cellulaires et moléculaires des PM<sub>2.5-0.3</sub> dépendent de leur source d'émission et donc de leur composition chimique**. En effet, bien que les particules étudiées aient la même granulométrie,

les PMInd se sont révélées plus impactantes que les PMTra<sup>f</sup>, avec notamment une modulation significativement plus importante de la réponse métabolique et inflammatoire. Ainsi, dans la suite de ce travail une attention particulière sera portée à la part chimie des PMInd en comparant les effets des PM « totales » (wPM), à ceux de la fraction organique extractible (O-PM) et de la fraction non extractible de ces particules (Ne-PM).

Enfin, les résultats obtenus sur le modèle 3D démontrent **l'importance du statut physiopathologique de l'épithélium dans la sensibilité aux PM<sub>2.5-0.3</sub>**. En effet, un impact plus important pour les Epi-A a été mis en évidence. Dans la deuxième étude de ce travail de thèse, il sera envisagé de comparer les effets des wPM, et de leurs fractions chimiques associées, sur des cellules hAECb de statuts physiopathologiques différents.



## IV.2. Impact des fractions organiques et inorganiques des PM<sub>2.5-0.3</sub> d'influence industrie (PMInd) sur les réponses inflammatoire et métabolique de cellules épithéliales bronchiques humaines saines ou pathologiques (asthme ou BPCO).

Cette deuxième étude fait l'objet d'un article original soumis pour publication :

Desprésaux P, Lagadec C, Desaulle D, Verdin A, Momas I, Achard S. PM<sub>2.5-0.3</sub> induces inflammatory and metabolic responses depending on both chemical fractions and physiopathologic status of human airway epithelial cells.





### IV.2.1. Contexte et objectif

La première étude a permis de mettre en évidence que les PM<sub>2.5-0.3</sub> avaient un impact sur les réponses cellulaires et moléculaires de l'épithélium bronchique. Cet impact dépendait de la composition chimique des particules et du statut physiopathologique des épithéliums bronchiques.

Afin d'étudier plus finement l'impact de la part « chimie » des PM<sub>2.5-0.3</sub>, l'objectif de cette deuxième étude est d'évaluer l'impact des PM<sub>2.5-0.3</sub> d'influence industrie « totales » et de leurs fractions chimiques associées (fraction organique extractible et fraction non-extractible) sur les réponses métabolique et inflammatoire suite à des expositions uniques de 6h ou 24h.

Afin de confirmer le rôle du statut physiopathologique dans la sensibilité aux PM<sub>2.5-0.3</sub>, un modèle de cellules épithéliales humaines d'origine bronchique (hAECb, Epithelix©, Suisse) a été utilisé. Trois statuts physiopathologiques ont été envisagés : les cellules ont été isolées à partir de biopsies réalisées sur un sujet sain (hAECb-S), un sujet asthmatique (hAECb-A) ou un sujet atteint de BPCO (hAECb-B).

### IV.2.2. Matériel et Méthodes

#### IV.2.2.1. Choix du modèle *in vitro*

Pour cette étude, un modèle de pithé, *human Airway Epithelial Cells from Bronchial origin*, Epithelix©, Suisse) a été utilisé. Il s'agit de cellules pseudo-primaires obtenues après biopsie de donneurs avec ou sans pathologie respiratoire. Elles ont pour avantage d'avoir une croissance rapide, une morphologie uniforme, un équipement enzymatique proche de celui des cellules épithéliales *in situ* du donneur et de permettre une bonne reproductibilité.

Les cellules ont été reçues congelées dans un cryotube de 1 mL à la densité de 10<sup>6</sup> cellules/mL et à passage 1. À la réception, le cryotube a été placé dans un bain marie à 37°C pour une décongélation rapide des cellules. Après décongélation, le milieu de congélation contenant les cellules a été transféré dans un flacon (TTP, Dutscher, France) contenant 30 mL de milieu de culture hAEC™ (Epithelix©, Suisse). Après 5 minutes de centrifugation à 11 000 rpm (Centrifuge CL30R, Thermo Scientific, MA, États-Unis), le surnageant a été jeté. Le culot cellulaire a été mis en suspension dans du milieu de culture hAEC™ et les cellules ont étéensemencées dans des flacons de 25 cm<sup>2</sup> (TPP, Dutscher) avec 5 mL de milieu de culture hAEC™. Le milieu de culture a été changé après l'adhésion des cellules puis tous les 2-3 jours afin de maintenir un niveau nutritif satisfaisant pour une bonne croissance des cellules.

Lorsque les cellules ont formé un tapis cellulaire homogène (cellules à confluence), une étape de trypsination, décollement des cellules de leur support sous l'action d'une enzyme protéolytique la trypsine, (TripLE express™, Gibco), a été réalisée. Les cellules ont alors été re-ensemencées dans de nouveaux flacons de 25 cm<sup>2</sup>. Cette étape d'amplification a permis d'établir une banque de cellules hAECb. Après chaque étape de trypsination, les cellules sont passées d'un passage n à un passage n+1. Pour cette étude, les expérimentations ont été faites entre le passage 4 et le passage 7.

Trois statuts physiopathologiques différents ont été étudiés : les cellules ont été isolées à partir de biopsies réalisées sur un sujet sain (hAECb-S), un sujet asthmatique (hAECb-A) ou un sujet atteint de BPCO (hAECb-B). Les caractéristiques des cellules sont résumées dans le Tableau XII.

Tableau XII : Informations sur les cellules épithéliales humaines d'origine bronchique (hAECb) et caractéristiques des donneurs. Les certificats d'analyse ont été fournis par Epithelix©.

	<b>Cellules épithéliales humaines d'origine bronchique</b>		
	<b>Sain</b>	<b>Asthme</b>	<b>BPCO</b>
<b>Fournisseur</b>	Epithelix©		
<b>Nom du produit</b>	hAECb		
<b>Numéro de lot</b>	02AB0793.01	AB0062	02AB066702
<b>Information sur les donneurs</b>			
<b>Age</b>	62	36	65
<b>Sexe</b>	Homme	Homme	Homme
<b>Origines</b>	Hispanique	Inconnu	Caucasien
<b>Fumeur</b>	Non	Non	Oui
<b>Pathologies</b>	Absence de pathologie respiratoire	Asthme	BPCO
<b>Information sur les cellules</b>			
<b>Type cellulaire</b>	Cellules épithéliales humaines d'origine bronchique		
<b>Date de cryoconservation</b>	11/2018	09/2008	10/2015
<b>Contrôle qualité</b>			
<b>Stérilité</b>	Oui	Oui	Oui
<b>Mycoplasma</b>	Négatif	Négatif	Négatif
<b>Viabilité</b>	>80%	>80%	>80%
<b>Détection de virus (HIV-1 ; HIV-2 ; Hépatite B ; Hépatite C)</b>	Négatif	Négatif	Négatif

#### IV.2.2.2. Préparation des fractions chimiques associées aux PM<sub>2.5-0.3</sub>

Afin de pouvoir étudier le rôle des fractions chimiques associées aux PM<sub>2.5-0.3</sub>, l'Unité de Chimie Environnementale et Interactions sur le Vivant (UCEIV, EA4492, Université du Littoral Côte

d'Opale, Dunkerque) a mis à notre disposition, deux types d'échantillons préparés à partir des PMInd « totales » (wPM, pour *whole PM*) :

- **O-PM** : fraction organique extraite des wPM à l'aide d'un solvant organique, le dichlorométhane et remis en suspension dans du DMSO pour les essais cellulaires ;
- **Ne-PM** : fraction non extractible, récupérée suite à l'extraction de la fraction organique.

Afin de préparer la fraction O-PM, une masse connue de wPM (250 mg) a été placée dans 10 mL de dichlorométhane et soniquée pendant 20 minutes. Puis, la solution de dichlorométhane contenant les particules a été centrifugée pendant 10 minutes à 4°C et 2500 g. Le surnageant ainsi obtenu et contenant la fraction organique a été soigneusement retiré et transféré dans un flacon en verre. Le culot a été remis en suspension dans du dichlorométhane et les étapes d'extraction de la fraction organique ont été répétées deux fois. Les surnageants obtenus après centrifugation ont été collectés dans le même flacon en verre pour obtenir une solution O-PM unique. Puis, le dichlorométhane a été évaporé et remplacé par 500 µL de diméthyl sulfoxyde (DMSO) pour permettre une compatibilité avec les essais *in vitro*. La solution mère de O-PM ainsi préparée est donc à une concentration de 500 mg équivalent wPM/mL.

Suite à l'extraction de la fraction organique des wPM, la fraction particulaire restante, représentant la fraction non extractible (Ne-PM), a été collectée dans un autre flacon en verre.

Les deux fractions ainsi obtenues ont été aliquotées et stockées à -20°C jusqu'à leur utilisation pour les expositions cellulaires.

#### IV.2.2.3. Protocole d'exposition

Les cellules ont étéensemencées à la densité de  $4.10^4$  cellules/mL (statut sain) ou à  $2.10^4$  cellules/mL (statut asthme et BPCO) dans des plaques 6 puits (TPP, Dutscher). Dans chaque puits, 2 mL de milieu de culture contenant les cellules ont été déposés. La concentration d'ensemencement variait en fonction du statut physiopathologique en raison de la différence de vitesse de croissance cellulaire. Les milieux de culture ont été changés après adhésion des cellules.

Les cellules hAECb ont été exposées aux wPM, à O-PM, à Ne-PM ou au mélange [O-PM + NePM], appelé recPM pour PM « reconstituées », pendant 6 ou 24h (Figure 38). Deux concentrations d'exposition ont été envisagées : 3 et 6 µg/cm<sup>2</sup>.

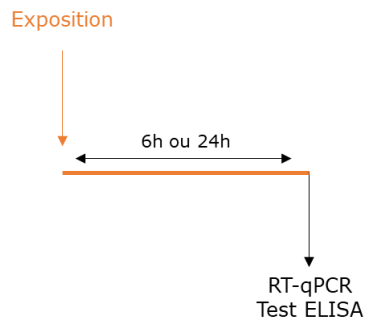


Figure 38 : Protocole d'exposition des cellules hAECb aux wPM et à leur fractions associées

Parallèlement aux expositions, deux conditions contrôles ont été envisagées :

- Contrôle (Cont) : absence d'exposition
- Témoin DMSO ( $T_{DMSO}$ ) : exposition des cellules au DMSO dilué dans le milieu de culture hAEC pour obtenir une concentration d'exposition de 0,01 % ou 0,02 %, correspondant aux concentrations finales de DMSO dans les solutions d'exposition O-PM et recPM.

#### IV.2.2.4. Évaluation des réponses inflammatoire et métabolique

Suite aux expositions, les milieux de culture ont été récupérés pour évaluer la réponse inflammatoire grâce à des tests ELISA et les cellules ont été collectées afin d'évaluer la modulation de l'expression génique par RT-qPCR.

Pour l'analyse des résultats par RT-qPCR, trois gènes de référence ont été introduits : *HPRT*, *GAPDH* et *RPL13*.

### IV.2.3. Résultats et discussion

#### IV.2.3.1. Évaluation de l'impact des wPM et de leurs fractions associées (O-PM, Ne-PM, recPM) sur les réponses inflammatoires et métaboliques

Les principaux résultats obtenus montrent que l'exposition des cellules hAECb aux wPM et aux recPM déclenche une réponse inflammatoire et une réponse métabolique quel que soit le statut physiopathologique des cellules. La réponse inflammatoire semble être plus spécifiquement liée aux composés présents dans la fraction non extractible des particules, notamment aux éléments métalliques, comme en témoigne l'augmentation significative des marqueurs de l'inflammation après exposition aux fractions wPM, Ne-PM et recPM. En revanche, la réponse métabolique

semble être plus influencée par la fraction organique (O-PM). De manière intéressante, un effet synergique entre les fractions O-PM et Ne-PM semble apparaître sur la réponse métabolique. En effet, une augmentation plus importante de l'expression de *CYP1A1* a été observée lorsque les deux fractions étaient présentes dans le même échantillon (wPM ou recPM) par rapport aux essais où les cellules étaient exposées aux fractions O-PM ou Ne-PM séparément. Les résultats indiquent également que la sensibilité des hAECb aux wPM et à leurs fractions chimiques associées semble dépendre du statut physiopathologique du donneur. Dans notre étude, les hAECb-A ont présenté les réponses inflammatoire et métabolique les plus élevées, suivies des hAECb-S, puis des hAECb-B.

L'article original soumis est présenté ci-après et les données complémentaires (supplementary data) en Annexe 3.

1 **PM<sub>2.5-0.3</sub> induces inflammatory and metabolic responses depending on both chemical**  
2 **fractions and physio-pathologic status of human airway epithelial cells**

3 Philomène Despréaux<sup>abc</sup>, Camille Lagadec<sup>ab</sup>, Dorota Desaulle<sup>bd</sup>, Anthony Verdin<sup>e</sup>, Isabelle  
4 Momas<sup>ab</sup>, Sophie Achard<sup>ab</sup>

5 <sup>a</sup> Université Paris Cité, CRESS INSERM UMR 1153, Health Environmental Risk Assessment  
6 team, Paris, France

7 <sup>b</sup> Faculté de Pharmacie de l'Université Paris Cité, Paris, France

8 <sup>c</sup> French Agency for the Environment and Energy Management (ADEME), Angers, France

9 <sup>d</sup> Université Paris Cité, UR 7537 - Biostatistique, Traitement et Modélisation des données  
10 biologiques, Paris, France

11 <sup>e</sup> Université du Littoral Côte d'Opale, Unité de Chimie Environnementale et Interactions sur le  
12 Vivant UR4492, SFR Condorcet CNRS 3417, Dunkerque, France

13 **Corresponding author:** Sophie Achard

14 Email address: sophie.achard@u-paris.fr

15 Postal address: Faculté de pharmacie, laboratoire de Santé Publique, 4 avenue de  
16 l'Observatoire, 75006, Paris, France

17 **ORCID number:**

18 S. Achard 0000-0003-4991-5888

19 D. Desaulle 0000-0002-3419-9447

20 I. Momas 0000-0003-4344-3787

21 A. Verdin 0000-0003-3438-9854

22 **Abstract**

23 Fine particles (PM<sub>2.5</sub>) are a heterogeneous and complex mixture of pollutants and a major public  
24 health concern, particularly in relation to respiratory diseases. While previous studies have  
25 established a connection between PM<sub>2.5</sub> exposure and conditions such as asthma and COPD,  
26 the specific mechanisms involved and the role of different chemical fractions of PM<sub>2.5</sub> remain  
27 unclear. This study aimed to assess the influence of PM<sub>2.5-0.3</sub> and its chemical fractions on  
28 inflammatory and metabolic responses in primary human airway epithelial cells of bronchial  
29 origin (hAECb) isolated from healthy (hAECb-Healthy), asthmatic (hAECb-Asthma), or  
30 COPD (hAECb-COPD) donors. Cells were exposed to whole PM<sub>2.5-0.3</sub> (wPM), organic  
31 fraction of PM<sub>2.5-0.3</sub> (O-PM), non-extractable fraction of PM<sub>2.5-0.3</sub> (Ne-PM), or recombined  
32 fraction [O-PM+Ne-PM] (recPM) for 6 or 24 hours at concentrations of 3 or 6 µg/cm<sup>2</sup>.  
33 Following exposure, inflammatory response was evaluated using ELISA, and gene expression  
34 related to inflammation and metabolism was assessed by RT-qPCR. The results showed that  
35 exposure to wPM or recPM induced both inflammatory and metabolic responses. The Ne-PM  
36 fraction seems to play an important role in establishing the inflammatory response, as evidenced  
37 by the increased expression of *CXCL10* and increased secretion of cytokines, following  
38 exposure to wPM, recPM and Ne-PM. On the other hand, the metabolic response appeared to  
39 be primarily associated with the organic fraction, probably due to the presence of polycyclic  
40 aromatic hydrocarbons (PAHs), leading to the upregulation of *CYP1A1* and *CYP1B1*,  
41 particularly following exposure to wPM, recPM and O-PM. This study also suggests variations  
42 in sensitivity to PM<sub>2.5-0.3</sub> based on physiologic status. These findings underscore the importance  
43 of considering specific chemical fractions of PM<sub>2.5-0.3</sub>, according to their emission sources, and  
44 human vulnerability when assessing their health impacts.

45 **Key-words**



- 46 Human airway epithelial cells; Healthy/Asthma/COPD status; Fine particles; PM-associated  
47 chemical fractions; Inflammatory and metabolic responses

Provisional Version

48 **Funding sources**

49 Collection and characterization of fine particles were supported by the French National Agency  
50 for Food, Environment, and Occupational Health Safety (Anses PNREST 01-60). Philomène  
51 Despréaux received a doctoral grant from the French Agency for the Environment and Energy  
52 Management (ADEME) and the Air Quality Research Network Paris Region (DIMQi<sup>2</sup>).

Provisional Version

53 **1. Introduction**

54 Numerous epidemiological studies have demonstrated strong associations between exposure to  
55 PM<sub>2.5</sub> and the development or exacerbation of adverse respiratory outcomes, including asthma  
56 (Jung et al., 2019; Tétreault et al., 2016), chronic obstructive pulmonary disease (COPD) (N.  
57 Li et al., 2022; Liu et al., 2017), and lung cancer (Hamra et al., 2014; D. Li et al., 2023; X. Wu  
58 et al., 2021). To understand the underlying mechanisms by which PM<sub>2.5</sub> exposure leads to  
59 respiratory diseases, both epidemiological studies, and *in vivo* and *in vitro* experimental studies  
60 have been conducted (R. Li et al., 2018). These studies have provided evidence of harmful  
61 mechanisms induced by PM<sub>2.5</sub>, including inflammation, oxidative stress, and genotoxicity  
62 (Feng et al., 2016).

63 Inflammation plays a crucial role in respiratory diseases and can be triggered by exposure to  
64 PM<sub>2.5</sub>, as supported by evidence from epidemiological and experimental studies.  
65 Epidemiological studies have shown that exposure to PM<sub>2.5</sub> induces lung inflammation, as  
66 indicated by associations with fractional exhaled nitric oxide (FeNO) levels (J. Gong et al., 2014;  
67 S. Wu et al., 2016) and by increased neutrophils, IL-6, or IL-8 in nasal lavage fluid (Chen et  
68 al., 2012; Janssen et al., 2015). *In vivo* and *in vitro* studies have provided mechanistic insights.  
69 For example, Gong et al. demonstrated that mice exposed to PM<sub>2.5</sub> exhibited increased white  
70 blood cell counts, along with elevated expression of *IL-1 $\beta$* , *IL-6*, and *IL-17* in bronchoalveolar  
71 lavage (X. Gong et al., 2022). *In vitro* studies have consistently shown that PM<sub>2.5</sub> activates  
72 human bronchial epithelial cells to produce inflammatory cytokines such as IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8,  
73 TNF- $\alpha$ , and GM-CSF (De Grove et al., 2018; Xu et al., 2020).

74 Moreover, exposure to PM<sub>2.5</sub> can initiate a metabolic response, aimed at facilitating the  
75 elimination of certain compounds. For example, CYP1A1 and CYP1B1 are involved in the  
76 biotransformation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), components adsorbed on  
77 PM<sub>2.5</sub>. However, this biotransformation leads to toxic metabolites associated with oxidative

78 stress, inflammation, and genotoxicity, thereby exacerbating the impact of PM<sub>2.5</sub>. These enzymes  
79 are activated through the aryl hydrocarbon receptor (AhR) pathway (Holme et al., 2023; Vogel  
80 et al., 2020).

81 While air quality standards primarily focus on regulating PM<sub>2.5</sub> mass concentrations in the  
82 atmosphere, there is growing recognition of the importance of considering the chemical  
83 composition of PM<sub>2.5</sub> in assessing air quality (Huang et al., 2018; Schwarze et al., 2007; Shen  
84 et al., 2019; Yang et al., 2014). The chemical composition of PM<sub>2.5</sub> varies depending on the  
85 predominant emission sources, including industrial activities, traffic, domestic fuel burning,  
86 and natural sources such as volcanoes, soil dust, and sea spray particles (Pan et al., 2022).  
87 Additionally, the composition is influenced by environmental factors, seasonal variations, and  
88 meteorologic conditions (Cui et al., 2016; Gawhane et al., 2017; Pan et al., 2022; Trusz et al.,  
89 2020). Thus, PM<sub>2.5</sub> is composed of organic compounds predominantly originating from  
90 incomplete combustion processes (PAHs), and inorganic compounds such as heavy metals.  
91 These components have the potential to interact with cellular and molecular target, giving  
92 particles a high toxicity potential for human health.

93 Despite advancement in our understanding, the mechanisms by which PM<sub>2.5</sub> causes respiratory  
94 effects are still under discussion (Lu et al., 2021; Q. Wang & Liu, 2023). Additionally, while  
95 studies have investigated the toxicity of PM<sub>2.5</sub> in its entirety, few have explored the specific  
96 impact of its chemical fractions on adverse effects. Badran et al. compared the impacts of whole  
97 PM<sub>2.5</sub> and its non-extractable matter and organic extractable matter, in human bronchial  
98 epithelial cells, BEAS-2B and concluded that there was an excessive production of reactive  
99 oxygen species (ROS), inflammation, and apoptosis (Badran, Ledoux, et al., 2020). In another  
100 study, Abbas et al. demonstrated that the high concentrations of PAHs found in the organic  
101 fraction extracted from PM<sub>2.5</sub> led to elevated transcription levels of *CYP1A1* and *CYP1B1* in  
102 BEAS-2B, potentially leading to genotoxic events (Abbas et al., 2019). Such studies offer

103 valuable insights into the critical role of distinct chemical fractions of PM<sub>2.5</sub> in activating  
104 signaling pathways.

105 However, the study of different fractions of PM<sub>2.5</sub> has been conducted *in vitro* using  
106 immortalized cell lines, which may not fully reflect physiologic relevance due to genetic  
107 modifications. The use of more relevant *in vitro* models, such as primary cells sourced from  
108 bronchial biopsies, is critical for better understanding the toxicological mechanisms related to  
109 ambient PM<sub>2.5</sub> exposure. These primary cells, which are not genetically modified and can  
110 maintain disease phenotypes observed *in vivo* when they are isolated from patients with asthma  
111 or COPD, offer a more physiologically relevant approach (Sotty et al., 2019).

112 In this context, this article presents an original preliminary study aimed at investigating the  
113 impact of PM<sub>2.5-0.3</sub> and its associated fractions, while considering vulnerability related to  
114 physio-pathologic status. An *in vitro* model of primary human airway epithelial cells of  
115 bronchial origin (hAECb) derived from distinct donors with differing physio-pathologic  
116 statuses (healthy, asthmatic, and COPD) was used. A focus was made on examining two well-  
117 documented mechanisms, inflammation, and metabolism.

118 **2. Material and Methods**

119 **2.1. Collection and physicochemical characterization of fine particles (PM<sub>2.5</sub>) and associated**  
120 **fractions, O-PM and Ne-PM**

121 PM<sub>2.5-0.3</sub> were collected at a site influenced by industrial activities in northern France  
122 (Dunkerque Grande-Synthe, 51°01' 29.0"N 2°18' 11.7"E), using a five-stage plus backup  
123 cascade impactor (Staplex® 235, TFIA, 68 m<sup>3</sup>/h) with a cutoff of the fifth plate at 0.33 µm, as  
124 described by Cazier et al. (Cazier et al., 2016). In this study, the collected particles were named  
125 wPM, for whole PM, in their entirety.

126 To prepare the organic fraction of PM (O-PM), a known mass of wPM (250 mg) was placed in  
127 10 mL of dichloromethane (DCM) and sonicated for 20 minutes. The resulting solution was  
128 then centrifuged for 10 minutes at 4°C and 2500 g. The supernatant containing the extracted  
129 organic fraction was carefully removed and transferred to a glass vial. Then the pellet was  
130 resuspended in DCM, followed by centrifugation, and these recovery steps were repeated twice.  
131 All supernatants obtained after centrifugation were collected in the same glass vial to obtain a  
132 unique O-PM solution. After the final washing, the remaining PM, representing the non-  
133 extractable fraction (Ne-PM), was collected in another glass vial. Finally, the DCM was  
134 evaporated and replaced with dimethyl sulfoxide (DMSO) for compatibility with the *in vitro*  
135 assays. All fractions were aliquoted and stored at - 20°C until use for cell exposures. The final  
136 concentrations of O-PM solutions were 500 mg wPM equivalent/mL, corresponding to the mass  
137 of wPM extracted and the final volume of DMSO.

138 The stock solution of O-PM was diluted in the human airway epithelial cells (hAEC) culture  
139 medium to obtain the desired concentrations for cell exposures. Similarly, wPM and Ne-PM  
140 were suspended in the hAEC culture medium and subsequently diluted to achieve the desired  
141 concentrations for cell exposures.

142 PM<sub>2.5-0.3</sub> was characterized as indicated by Despréaux et al. (Despréaux et al., 2023). Major and  
143 trace elements were quantified in wPM samples using inductively coupled plasma coupled to  
144 atomic emission spectrometry or mass spectrometry (ICP-AES and ICP-MS). Major water-  
145 soluble ions were quantified after water leaching using ion chromatography. Total carbon was  
146 quantified using C, H, N, S microanalyzer, and PAHs in the O-PM fraction, after Soxhlet  
147 extraction using dichloromethane (Moufarrej et al., 2023). The chemical composition of PM<sub>2.5-</sub>  
148 <sub>0.3</sub> is summarized in Table S1, supplementary data.

## 149 *2.2. Cell culture and exposure*

150 Human airway epithelial cells of bronchial origin (hAECb) were obtained from biopsies taken  
151 from donors with no declared respiratory pathology (hAECb-Healthy, # 02AB0793.01) or with  
152 a pathology such as asthma (hAECb-Asthma, # AB0062) or COPD (hAECb-COPD, #  
153 02AB066702) (Epithelix®, Geneva, Switzerland). All experimental procedures were  
154 explained, accepted, and signed off by the donor on an informed consent form. The collection  
155 and use of cells were carried out in full compliance with the Helsinki Declaration on Biomedical  
156 Research (Hong Kong Amendment, 1989) and received prior approval from local ethics  
157 committees. Only one donor per status was considered, and the donors' characteristics provided  
158 by Epithelix®, are summarized in Table S2, supplementary data.

159 Upon receipt, hAECb were seeded at the density of 10<sup>6</sup> cells/mL in 25 cc flasks (TPP, Dutscher,  
160 France) in the hAEC culture medium (Epithelix®, Geneva, Switzerland) and placed in an  
161 incubator at 37°C (5% CO<sub>2</sub> and constant relative humidity 95%, MCO-18AIC, Sanyo, Japan).  
162 Culture medium was refreshed every two or three days and cells were passed when reaching  
163 confluence.

164 For the exposure experiments, hAECb were seeded at 4.10<sup>4</sup> cells/mL in six-well plates (TPP,  
165 Dutscher, France). When confluence reached about 70%, culture medium was removed and



166 replaced with medium containing the various fractions: wPM, O-PM, Ne-PM and, the  
167 combined fraction [O-PM+Ne-PM] (recPM). Two exposure times, 6 and 24 hours and two  
168 exposure concentrations, 3 and 6  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , were envisaged for all the PM fractions.

169 Two controls were set up simultaneously: a negative control, cells without exposure (Cont) and  
170 a solvent control, cells exposed to 0.01% or 0.02% DMSO, corresponding to the final  
171 concentration in the O-PM and recPM exposure solutions. These DMSO levels have shown no  
172 toxic effect.

173 After the exposure period, the cell-free culture media for each experimental condition were  
174 collected, sampled and quickly frozen at  $-20^\circ\text{C}$  to await the inflammatory response assessment.  
175 Adherent cells were rapidly frozen at  $-80^\circ\text{C}$  before being harvested for RNA extraction in order  
176 to evaluate the expression of inflammatory and metabolic genes.

### 177 **2.3. Evaluation of the inflammatory response**

178 Secretions of two cytokines (IL-6, #DY206, IL-8, #DY208) and one chemokine (GM-CSF,  
179 #DY215) by the hAECb, were quantified after 6 and 24 hours of exposure to the different PM  
180 fractions using ELISA assay according to the manufacturer's instructions (DuoSet® kits, R&D  
181 Systems, France). Absorbance was measured at 490/540 nm using an ELISA reader (Multiskan-  
182 EX, Thermo Scientific, MA, USA). Calibration curves were calculated using R software  
183 version 4.2.2 (R Core team [2022-10-31]). Cytokine concentrations were expressed as  $\text{pg}/\text{mL}$   
184 and the limits of quantification were 9.37, 31.26, and 15.62  $\text{pg}/\text{mL}$  for IL-6, IL-8, and GM-  
185 CSF, respectively.

### 186 **2.4. Gene expression evaluation**

187 Gene expression evaluation was carried out for several genes involved in the metabolic  
188 pathway: *CYP1A1*, *CYP1B1*, and *AhR*, and in the inflammatory response: *IL-6*, *IL-8*, *GM-CSF*,  
189 and *CXCL10*. Three housekeeping genes were introduced: *HPRT*, *GAPDH*, and *RPL13*. These



190 three genes exhibited stable expression levels in the samples, regardless of the experimental  
191 conditions, and their expression levels were similar to those of the target genes (Figure S1,  
192 supplementary data).

193 Total RNA was extracted from cells after thawing using the NucleoSpin® TriPrep kit  
194 (Macherey-Nagel, Germany) and quantified with the Qubit® 2.0 Fluorometer (model QFX,  
195 Denovix, USA). Reverse transcription (RT) of total RNA was performed using iScript™ cDNA  
196 Synthesis kit (Bio-Rad, USA). Expressions of the housekeeping genes and of the target genes  
197 were assessed by quantitative polymerase chain reaction (qPCR) performed using iQ™  
198 SYBR® Green Supermix (Bio-Rad, USA) and specific primers (Table S3, supplementary data)  
199 following the manufacturer's recommendations.

200 Gene expression quantification used the cycle threshold (Ct) values, which correspond to the  
201 number of cycles needed for the fluorescence signal to reach a specific threshold level of  
202 detection. Ct values were inversely correlated with the amount of template nucleic acid present  
203 in the reaction (Walker, 2002).

204 The fold changes (FC) in the mRNA expression levels of the target genes between exposed and  
205 non-exposed hAECb, normalized to the geometric mean of the levels of the three housekeeping  
206 genes, were determined using the classical  $\Delta\Delta\text{Ct}$  method (Livak & Schmittgen, 2001;  
207 Vandesompele et al., 2002):

$$208 \quad \text{FC} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}},$$

209 where  $\Delta\Delta\text{Ct} = (\Delta\text{Ct}_{\text{exposed}} - \Delta\text{Ct}_{\text{unexposed}})$  with  $\Delta\text{Ct} = \text{Ct}_{\text{target gene}} - \text{Ct}_{\text{mean of housekeeping genes}}$ .

## 210 *2.5. Statistical analysis*

211 For each experimental condition, three replicas, duplicated during dosing, were considered.

212 A comparative statistical analysis was performed for the inflammatory response (ELISA) using  
213 R software version 4.2.2 while a descriptive statistical analysis was performed for gene  
214 expression (RT-qPCR).

215 For the comparative analysis, the following comparisons were considered:

- 216 - Comparison of the effects resulting from the exposure of each PM fraction (wPM, O-PM,  
217 Ne-PM, recPM) to the control condition, for each time and concentration of exposure
- 218 - Dose and time effect relationship considering one fraction (wPM, O-PM, Ne-PM, recPM),  
219 one biomarker (IL-6, IL-8, GM-CSF) and one status (Healthy, Asthma, COPD)
- 220 - Fraction effect considering one concentration (3  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , 6  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ), one time (6 hours, 24  
221 hours), one biomarker (IL-6, IL-8, GM-CSF) and one status (Healthy, Asthma, COPD)

222 A Tukey test (multiple comparisons test) was applied for comparing against the controls and to  
223 analyze the dose and fraction effect to determine the significant differences between the  
224 adjusted group means in an analysis of variance. For the time effect, the quantities of  
225 cytokine/chemokine secreted were adjusted on the secretion of control samples. This  
226 adjustment was made using a linear regression model, and means comparisons between groups  
227 were obtained through contrast analysis of the model parameters using the multcomp package  
228 (Wald test with multiplicity correction “Single-Step method”) (Hothorn et al., 2008).

229 Concerning gene expression (RT-qPCR), the statistical analyses were performed using R  
230 version 4.2.2. A Student’s t test under the Gaussian assumption was performed to assess  
231 whether gene expression differed between exposed and unexposed conditions. The false  
232 discovery rate was used to take into account the multiplicity of comparisons (Benjamini &  
233 Hochberg, 1995). P-adjusted  $< 0.05$  was considered significant.

234 **3. Results**

235 **3.1. Evaluation of the inflammatory response**

236 **3.1.1. Cytokine/chemokine secretion by control hAECb**

237 In the absence of exposure, basal secretion levels of cytokines/chemokine were consistently  
238 higher at 24 hours compared to 6 hours, irrespective of the cytokine/chemokine type or donor.  
239 Furthermore, hAECb-Asthma and hAECb-COPD exhibited notably higher secretion levels of  
240 IL-6, IL-8, and GM-CSF compared to hAECb-Healthy (Fig. 1).

241 **3.1.2. Cytokine/chemokine secretion by hAECb after exposure**

242 The secretion levels of IL-6, IL-8, and GM-CSF are illustrated in Figure 1. Detailed results of  
243 the statistical analysis, comparing the effects of each PM fraction (wPM, O-PM, Ne-PM,  
244 recPM) with the control condition for each exposure time and concentration, are presented in  
245 Table S4, supplementary data.

246 Regarding hAECb-Healthy, after 6 hours of exposure, a significant increase in IL-6 and IL-8  
247 secretions was observed across nearly all tested conditions compared to the control condition.  
248 However, no significant increase in IL-8 secretion was noted after 6 hours of exposure to 6  
249  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  of wPM and Ne-PM. Concerning the chemokine GM-CSF, exposures to wPM and  
250 recPM for 6 hours led to an increase in secretion, while O-PM exposure resulted in a decrease.  
251 Ne-PM exposure did not induce significant change.

252 Following 24 hours of exposure, a notable elevation in the secretion of IL-6, IL-8, and GM-  
253 CSF was observed in hAECb-Healthy across all exposure fractions and tested concentrations,  
254 with the exception of exposures to O-PM at 6  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , where IL-6 and IL-8 secretions did not  
255 significantly differ from the control.

256 Moving on to the hAECb-Asthma, after 6 hours of exposure, a decrease in IL-8 and GM-CSF  
257 secretions was evident. This reduction was particularly pronounced at the exposure  
258 concentration of  $6 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ , exhibiting significance across all particle fractions tested.

259 24 hours of exposure led to a significant decrease in IL-6 secretion after exposure to wPM and  
260 recPM at  $3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ . Conversely, a significant increase in GM-CSF secretion was observed after  
261 24 hours of exposure for nearly all tested conditions, except for exposure to O-PM at  $3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ .

262 Regarding, hAECb-COPD, following 6 hours of exposure, a significant reduction in IL-8  
263 secretion was observed for all tested conditions, except after exposure to recPM at  $6 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ,  
264 where the reduction was not statistically significant. In contrast, both IL-6 and GM-CSF  
265 secretions showed a significant increase following exposure, except for the O-PM condition at  
266  $3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ .

267 After 24 hours of exposure, a significant increase in IL-6 secretion was observed across all  
268 tested conditions in hAECb-COPD. Similarly, a notable increase in IL-8 production was  
269 observed, except following exposures to wPM. In terms of the chemokine GM-CSF, a  
270 significant increase in secretion was observed following exposure to O-PM at  $3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  and  
271 exposure to wPM and recPM at  $6 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ .

### 272 *3.1.3. Dose, Time and Fraction effects*

273 For the same PM fraction and for one donor, significant dose response relationships ( $6 \mu\text{g}/\text{cm}^2$   
274 vs  $3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) were observed for IL-8 (Fig.1a), IL-6 (Fig.1b) and GM-CSF (Fig.1c).

275 IL-8 appeared to be a reactive inflammatory biomarker for evaluating the dose effect in hAECb-  
276 Healthy and hAECb-Asthma, while GM-CSF exhibited greater sensitivity to the dose effect in  
277 hAECb-Asthma and hAECb-COPD. The dose effects observed for IL-6 were less conclusive.

278 Besides, a highly significant time effect was demonstrated for the majority of tested  
279 experimental conditions, with biomarker secretions being more pronounced at 24 hours than at  
280 6 hours, indicating a more significant inflammatory response after 24 hours of exposure  
281 compared to 6 hours, regardless of the donor (Table S5, supplementary data).

282 Moreover, the secretion of GM-CSF was higher after exposure to wPM compared to O-PM,  
283 except for hAECb-COPD exposed for 24 hours (Fig.1). The results of the evaluation of the PM  
284 fraction effect (Table S6, supplementary data) confirm this observation, showing significant  
285 differences between these two fractions for most exposure conditions. Therefore, the observed  
286 increase in GM-CSF secretion following exposure to wPM does not appear to be linked to the  
287 organic fraction of wPM. In contrast to GM-CSF, there was no clear trend for the fraction effect  
288 on IL-6 and IL-8 secretions.

### 289 **3.2. Modulation of gene expressions**

#### 290 **3.2.1. Modulation of the expression of genes involved in the inflammatory response**

291 Concerning the hAECb-Healthy, exposure to wPM, Ne-PM, or recPM for 24 hours increases  
292 *CXCL10* gene expression (Fig.2a1). This increase was significant for Ne-PM at both exposure  
293 concentrations (3 and 6  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ), and for wPM and recPM at 6  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ . Moreover, exposure to  
294 recPM at 6  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  for 24 hours also led to a slight but significant overexpression of *IL-6*, *IL-8*,  
295 and *GM-CSF*. In contrast, O-PM did not significantly modulate gene expression, regardless of  
296 the exposure time and concentration (Fig.2a2).

297 Moving on to hAECb-Asthma, exposure to wPM, Ne-PM, or recPM for 24 hours significantly  
298 upregulated *CXCL10* gene expression at the two exposure concentrations (Fig.2b2).  
299 Interestingly, wPM and Ne-PM exhibited similar profiles of gene expression modulation,  
300 showing significant overexpression of *IL-6* for 24 hours at both exposure concentrations, along  
301 with significant increased expression of *IL-8* and *GM-CSF* genes specifically for exposures at



302 6  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  (Fig.2b2). Conversely, exposure to O-PM resulted in a slight but significant under  
303 expression of *IL-8* and *GM-CSF* genes after 6 hours at 6  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  (Fig.2b1).

304 Regarding hAECb-COPD, whatever the experimental conditions, no significant modulation of  
305 gene expression was shown (Fig.2c1, 2c2). However, a tendency toward the increased *CXCL10*  
306 gene expression after exposure to wPM or recPM at 3  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , and to Ne-PM at 6  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , was  
307 observed mainly after 24 hours of exposure (Fig.2c2).

308 While up-regulation of *CXCL10* was observed for all experimental conditions after 24 hours of  
309 exposure to wPM, Ne-PM, or recPM, the O-PM fraction did not exhibit the same trend. In fact,  
310 there was either no modulation or very low modulation of the *CXCL10* gene after 24 hours of  
311 O-PM exposure (Fig.2a2, 2b2, 2c2).

### 312 **3.2.2. Modulation of the expression of genes involved in metabolic activity**

313 No significant modulation of *Ahr* expression was observed whatever the experimental  
314 conditions (Fig.3).

315 Significant increases of *CYP1A1* expression were observed after hAECb-Healthy following  
316 exposures to wPM, Ne-PM, or recPM at both concentrations and exposure times (Fig.3a1, 3a2)  
317 (except for 24 hours to 3  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  of Ne-PM, where the increase was not significant, Fig.3a2).  
318 However, no significant increase in *CYP1A1* expression was observed after exposure to O-PM,  
319 regardless of the concentrations and exposure times tested (Fig.3a1, 3a2).

320 Regarding hAECb-Asthma, regardless of the exposure fraction, dose, and duration,  
321 upregulation of *CYP1A1* and *CYP1B1* expressions were observed (Fig.3b1, 3b2). These  
322 increases were significant for most of the tested conditions, except for 6-hour exposure to 6  
323  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  of wPM and 6-hour exposure to 3  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  of Ne-PM (Fig.3b1).

324 Considering the hAECb-COPD, a significant increase in *CYP1A1* gene expression was  
325 observed for most tested conditions (Fig.3c1, 3c2), with the exception of wPM-exposure at 6  
326  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  and Ne-PM-exposure at 3 and 6  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  for 24 hours (Fig.3c2). In addition, a significant  
327 upregulation of *CYP1B1* expression was observed only after 6 hours of wPM exposure at 3  
328  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  (Fig.3c1).

329 It is worth noting that there was a tendency for increased expression of the *CYP1B1* gene in  
330 hAECb-Healthy (Fig.3a1, 3a2) and hAECb-COPD (Fig.3c1, 3c2) following exposure to O-PM  
331 or recPM. However, these increases were not statistically significant.

Provisional Version

#### 332 4. Discussion

333 This preliminary study brings new insights on the impact of PM<sub>2.5-0.3</sub> on airway epithelial cells  
334 showing that the inflammatory and metabolic responses depend on both PM<sub>2.5-0.3</sub> chemical  
335 fraction and physiologic status. Specifically, the inflammatory response appears to be closely  
336 associated to the non-extractable fraction of PM<sub>2.5-0.3</sub>, as evidenced by a significant increase in  
337 inflammation markers following exposure to wPM, recPM, and Ne-PM fractions. In contrast,  
338 the O-PM fraction, exerts a more pronounced influence on the metabolic response compared to  
339 the Ne-PM fraction. Interestingly, synergistic metabolic effects between the O-PM and Ne-PM  
340 fractions have been identified, leading to a significant increase in the expression of *CYP1A1*  
341 when these two fractions are present in the same sample (wPM or recPM). Besides, the  
342 sensitivity to different PM<sub>2.5-0.3</sub> fractions seems to vary among status, suggesting hAECb-  
343 Asthma are more vulnerable than hAECb-Healthy and hAECb-COPD.

344 One of the strengths of our study lies in the exploration of the impact of specific chemical  
345 fractions of PM<sub>2.5-0.3</sub>, an aspect that has received limited attention in the existing literature. O-  
346 PM primarily contains PAHs and water-soluble ions, while Ne-PM is primarily composed of  
347 inorganic carbon and metallic elements (Moufarrej et al., 2023). Additionally, we examined the  
348 effect of the combination of O-PM and Ne-PM (recPM) to show potential synergistic effects  
349 between these two fractions.

350 Moreover, this study employed an *in vitro* model of primary human bronchial cells, hAECb.  
351 Unlike immortalized cell lines, such as BEAS-2B (Abbas et al., 2019; Badran, Verdin, et al.,  
352 2020), 16HBE (Jia et al., 2021), or Calu-3 (Hammond et al., 2022), commonly used to study  
353 the impact of PM<sub>2.5</sub> on the airways, primary cells more accurately represent the biologic  
354 responses that occur in the bronchial epithelium after exposure to particulate pollutants. Indeed,  
355 it has been reported that certain cell lines may no longer correspond to the original cells, which



356 could lead to biologic responses that differ from those observed in primary cells after a chemical  
357 compounds exposure (Balharry et al., 2008).

358 Furthermore, our study enabled to consider for the first time the differential impact of PM<sub>2.5-0.3</sub>  
359 according to a physio-pathologic status. However, these first results deserve to be confirmed  
360 with experiments involving more donors.

361 The exposure concentrations (3 and 6 µg/cm<sup>2</sup>) used in this study are among the lowest reported  
362 concentrations in the *in vitro* literature, resulting in harmful effects without cell death (Badran,  
363 Ledoux, et al., 2020; Boubilil et al., 2013; Gualtieri et al., 2010; Leclercq et al., 2016; Longhin  
364 et al., 2013). As is common in most *in vitro* studies, it remains difficult to compare these  
365 concentrations with real human exposure levels.

366 Our results show that the modulation of the expression of genes involved in the inflammatory  
367 response was found to be dose and time dependent, with a greater number of genes significantly  
368 upregulated at the highest exposure dose of 6 µg/cm<sup>2</sup> and after 24 hours of exposure. This aligns  
369 with existing literature on the inflammatory response to PM<sub>2.5</sub> exposures, which consistently  
370 describes the time and dose effects of PM<sub>2.5</sub> on inflammatory responses in various *in vitro*  
371 models (Badran, Verdin, et al., 2020; Cachon et al., 2014; Corsini et al., 2013; L. Zhou et al.,  
372 2020).

373 A noteworthy observation related to the inflammatory response was the substantial upregulation  
374 of *CXCL10* in hAECb-Healthy and hAECb-Asthma following exposures to wPM, recPM, and  
375 Ne-PM, which are PM fractions that contain various metallic elements. However, in a previous  
376 study conducted with reconstituted human bronchial epithelia exposed to PM<sub>2.5-0.3</sub> from various  
377 influences (traffic or industrial), *CXCL10* was significantly downregulated. This modulation  
378 was attributed to PAHs adsorbed on PM<sub>2.5-0.3</sub>, because it was greater after exposure to  
379 industrial-influenced PM, richer in PAHs than traffic-influenced PM, where the downward

380 modulation of *CXCL10* was less important (Despréaux et al., 2023). PAHs have been described  
381 as ligands of the transcription factor AhR, which typically leads to a decrease in *CXCL10*  
382 expression upon activation (Rael et al., 2018; Zablocki-Thomas et al., 2020). In our study, no  
383 modulation of *CXCL10* expression was observed after exposures to O-PM. This suggests that  
384 the increase in *CXCL10* expression is not linked to PAHs but rather to a component of the non-  
385 extractable fraction.

386 While *CXCL10* overexpression has been described in the literature following exposure to  
387 biologic contaminants such as viruses, particularly rhinovirus (Wark et al., 2007), its utilization  
388 as a biomarker of inflammation in response to particulate pollutants remains limited. However,  
389 *CXCL10* appears to be a promising biomarker. Indeed, as shown by Takaku et al. in an *in vitro*  
390 study (Takaku et al., 2011), this chemokine activates eosinophils, white blood cells known to  
391 play an important role in the development of severe asthma and asthma exacerbation  
392 (Nakagome & Nagata, 2018).

393 In addition to *CXCL10* up-regulation, our findings demonstrated a significant increase in *IL-8*  
394 expression after 24 hours of exposure at 6  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  to wPM in hAECb-Healthy and, to wPM and  
395 recPM in hAECb-Asthma. Consistently, a higher secretion was observed in hAECb-Healthy.  
396 However, in hAECb-Asthma, no significant increase in *IL-8* secretion was observed following  
397 exposure. This phenomenon has been previously observed in an *in vitro* study using BEAS-2B  
398 cells. In that study, *PM<sub>2.5</sub>* appeared to hinder cytokine release in BEAS-2B cells, particularly  
399 *IL-8*, possibly due to its detrimental impact on cytoskeletal function, which is involved in  
400 protein secretion (Longhin et al., 2018). *IL-8*, a critical chemotactic factor for neutrophils, is  
401 known to be overexpressed in severe asthma and is found in bronchoalveolar lavage fluid and  
402 serum from asthmatic patients (S. Kikuchi et al., 2009; Shannon et al., 2008). An *in vitro* study  
403 carried out on neutrophils and eosinophils demonstrated that *IL-8*-activated neutrophils

404 facilitate eosinophil transmembrane migration (I. Kikuchi et al., 2006), leading to eosinophil  
405 accumulation in the airways.

406 Additionally, we investigated the role of IL-6, a cytokine less explored in this context. Our  
407 results showed a gene expression profile of *IL-6* similar to that of *IL-8* in hAECb-Healthy and  
408 hAECb-Asthma after exposures to wPM and recPM. However, in hAECb-Asthma, there was a  
409 significant overexpression of *IL-6* for wPM and recPM, even at 3  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ . A cytosolic release  
410 of IL-6 was observed in hAECb-Healthy and hAECb-COPD, whatever the experimental  
411 conditions tested, but surprisingly, this phenomenon was not observed in hAECb-Asthma.  
412 Some studies have shown that environmental particles induces the release and/or gene  
413 expression modulation of IL-6 and IL-8 in various cell types (Cachon et al., 2014; Kafoury &  
414 Kelley, 2005; Mazzarella et al., 2007; Sotty et al., 2019; Tau et al., 2013; Zou et al., 2020).

415 Furthermore, PM<sub>2.5</sub> exposures may stimulate airway epithelial cells to release other  
416 inflammatory biomarkers such as chemokines, particularly GM-CSF (Hong et al., 2016). GM-  
417 CSF plays a key role in the regulation of lung homeostasis and the immune function of alveolar  
418 macrophages/epithelial cells (Atri et al., 2018). This chemokine is responsible for bronchial  
419 hyperreactivity, leukotriene release, endothelial cell migration, as well as the activation of  
420 eosinophils, which, as previously mentioned, contribute to the development of inflammatory  
421 diseases such as asthma, by releasing a number of mediators, including IL-6 and IL-8 (Ataya et  
422 al., 2021; Nakagome & Nagata, 2018). Our results showed that after 24 hours of exposure to  
423 wPM or recPM at the highest concentration (6  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ), a significant up-regulation of *GM-CSF*  
424 was observed in hAECb-Healthy and hAECb-Asthma. Furthermore, subsequent to 24 hours of  
425 exposure to various PM fractions, a significant release of GM-CSF was observed in the culture  
426 media of both hAECb-Healthy and hAECb-Asthma. A study showed that the release of GM-  
427 CSF following bronchial epithelial cells exposure to diesel exhaust particles (DEP) could be  
428 due to *de novo* protein synthesis because of a new transcription of this chemokine gene (Boland

429 et al., 2000). However, Kongerud et al. (Kongerud et al., 2006) indicated in a human study, that  
430 no soluble inflammatory mediators (IL-8, IL-6, GM-CSF) researched in nasal lavage fluid were  
431 altered by DEP exposure (intranasal instillation of 300 µg) in patients with and without asthma.

432 Our findings regarding the inflammatory response allow to hypothesize about the chemical  
433 contribution of the particles to this inflammatory reaction. Interestingly, it seems that the non-  
434 extractable fraction has a more substantial impact on the inflammatory response compared to  
435 the organic fraction. It was expected to show that the metallic part of the wPM could lead to a  
436 greater oxidative stress reaction than the organic fraction (O-PM) and therefore to a greater  
437 inflammatory response (Moufarrej et al., 2023).

438 Furthermore, the observed inflammatory response following exposures varies depending on the  
439 donor. It appears that the inflammatory response is more pronounced in hAECb-Asthma  
440 compared to hAECb-Healthy, which in turn is more important than in hAECb-COPD. It can be  
441 hypothesized that this difference in the inflammatory response is partially related to the  
442 physiologic status. Indeed, in few *in vitro* and *in vivo* studies, different inflammatory responses  
443 have been observed between healthy and asthma models (Despréaux et al., 2023; I. Kikuchi et  
444 al., 2006) and between healthy and COPD models (Sotty et al., 2019; Wang et al., 2020).

445 Regarding the modulation of metabolic response, a strong increase in *CYP1A1* expression was  
446 observed following exposure to wPM. This aligns with previous studies reporting *CYP1A1*  
447 overexpression in response to PM<sub>2.5</sub> exposure in cell lines like BEAS-2B (Borgie et al., 2015;  
448 Dergham et al., 2012) and 16HBE (Z. Zhou et al., 2015). This increase is often attributed to the  
449 presence of PAHs on the surface of PM<sub>2.5</sub>. Therefore, an increase in *CYP1A1* expression was  
450 expected following exposure to O-PM due to the presence of PAHs in this fraction. In hAECb-  
451 Asthma and hAECb-COPD, a significant increase in *CYP1A1* expression was observed  
452 following exposures to O-PM, regardless of the exposure time and concentration. Surprisingly,  
453 no significant increase in hAECb-Healthy was observed following exposure, only a trend

454 towards increased expression. This result suggests that compounds other than PAHs may  
455 regulate *CYP1A1* expression. Notably, exposures to Ne-PM induced significant overexpression  
456 of *CYP1A1* across all physiologic statuses, contrary to the expectation that *CYP1A1* expression  
457 should not be affected because of the supposed absence of PAHs in this fraction. This suggests  
458 the involvement of other compounds, such as heavy metals, already described to induce  
459 *CYP1A1* gene expression (Korashy & El-Kadi, 2005, 2006). However, the findings from the  
460 study by Badran et al. (Badran, Ledoux, et al., 2020) did not align with our results. This disparity  
461 in findings may be attributed to the utilization of a different *in vitro* model. While the exposure  
462 concentrations (3 and 12  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) and durations (6 and 24 hours) employed in their study are  
463 similar to ours, they used the BEAS-2B immortalized cell line as the cellular model. This  
464 different cellular model might account for the observed discrepancies in the metabolic response.  
465 Additionally, wPM induced a more pronounced overexpression of *CYP1A1* compared to O-PM  
466 or Ne-PM in hAECb-Healthy and hAECb-Asthma, particularly after 24 hours of exposure. This  
467 suggests a potential synergistic effect of the two fractions on *CYP1A1* gene activation, as  
468 observed in a zebrafish model co-exposed to cadmium and benzo(a)pyrene (Kodzhahinchev et  
469 al., 2021). However, further investigation using different respiratory pathway models is  
470 warranted to confirm these observations.  
471 Finally, consistent with the inflammatory response, the effects of  $\text{PM}_{2.5-0.3}$  and its associated  
472 fractions varied depending on the donor, with greater gene overexpression in hAECb-Asthma  
473 compared to hAECb-Healthy, and further increased expression in hAECb-COPD.

## 474 **5. Conclusion**

475 This study contributes to a better understanding of the role of chemical compounds adsorbed  
476 on the surface of  $\text{PM}_{2.5}$  in the inflammatory and metabolic responses of human bronchial  
477 epithelial cells. It also suggests that the impact of  $\text{PM}_{2.5}$  depends on physio-pathologic status,

478 even if these results deserved to be confirmed in investigations involving more donors for each  
479 status.

480 These data could be used to challenge public authorities on regulatory levels of PM, both  
481 outdoors and indoors, and to reconsider them, taking into account their emission sources and  
482 therefore their chemistry.

Provisional Version

483 **References**

- 484 Abbas, I., Badran, G., Verdin, A., Ledoux, F., Roumie, M., Lo Guidice, J.-M., Courcot, D., & Garçon, G.  
485 (2019). In vitro evaluation of organic extractable matter from ambient PM2.5 using human  
486 bronchial epithelial BEAS-2B cells: Cytotoxicity, oxidative stress, pro-inflammatory response,  
487 genotoxicity, and cell cycle deregulation. *Environmental Research*, *171*, 510–522.  
488 <https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.01.052>
- 489 Ataya, A., Knight, V., Carey, B. C., Lee, E., Tarling, E. J., & Wang, T. (2021). The Role of GM-CSF  
490 Autoantibodies in Infection and Autoimmune Pulmonary Alveolar Proteinosis: A Concise  
491 Review. *Frontiers in Immunology*, *12*, 752856. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.752856>
- 492 Atri, C., Guerfali, F. Z., & Laouini, D. (2018). Role of Human Macrophage Polarization in Inflammation  
493 during Infectious Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(6), 1801.  
494 <https://doi.org/10.3390/ijms19061801>
- 495 Badran, G., Ledoux, F., Verdin, A., Abbas, I., Roumie, M., Genevray, P., Landkocz, Y., Lo Guidice, J.-M.,  
496 Garçon, G., & Courcot, D. (2020). Toxicity of fine and quasi-ultrafine particles: Focus on the  
497 effects of organic extractable and non-extractable matter fractions. *Chemosphere*, *243*,  
498 125440. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125440>
- 499 Badran, G., Verdin, A., Grare, C., Abbas, I., Achour, D., Ledoux, F., Roumie, M., Cazier, F., Courcot, D.,  
500 Lo Guidice, J.-M., & Garçon, G. (2020). Toxicological appraisal of the chemical fractions of  
501 ambient fine (PM2.5-0.3) and quasi-ultrafine (PM0.3) particles in human bronchial epithelial  
502 BEAS-2B cells. *Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)*, *263*(Pt A), 114620.  
503 <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114620>
- 504 Balharry, D., Sexton, K., & Bérubé, K. A. (2008). An in vitro approach to assess the toxicity of inhaled  
505 tobacco smoke components: Nicotine, cadmium, formaldehyde and urethane. *Toxicology*,  
506 *244*(1), 66–76. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2007.11.001>

507 Benjamini, Y., & Hochberg, Y. (1995). Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful  
508 Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B*  
509 *(Methodological)*, 57(1), 289–300.

510 Boland, S., Bonvallot, V., Fournier, T., Baeza-Squiban, A., Aubier, M., & Marano, F. (2000).  
511 Mechanisms of GM-CSF increase by diesel exhaust particles in human airway epithelial cells.  
512 *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, 278(1), L25-32.  
513 <https://doi.org/10.1152/ajplung.2000.278.1.L25>

514 Borgie, M., Ledoux, F., Verdin, A., Cazier, F., Greige, H., Shirali, P., Courcot, D., & Dagher, Z. (2015).  
515 Genotoxic and epigenotoxic effects of fine particulate matter from rural and urban sites in  
516 Lebanon on human bronchial epithelial cells. *Environmental Research*, 136, 352–362.  
517 <https://doi.org/10.1016/j.envres.2014.10.010>

518 Boubilil, L., Assémat, E., Borot, M.-C., Boland, S., Martinon, L., Sciare, J., & Baeza-Squiban, A. (2013).  
519 Development of a repeated exposure protocol of human bronchial epithelium in vitro to  
520 study the long-term effects of atmospheric particles. *Toxicology in Vitro: An International*  
521 *Journal Published in Association with BIBRA*, 27(2), 533–542.  
522 <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2012.11.008>

523 Cachon, B. F., Firmin, S., Verdin, A., Ayi-Fanou, L., Billet, S., Cazier, F., Martin, P. J., Aissi, F., Courcot,  
524 D., Sanni, A., & Shirali, P. (2014). Proinflammatory effects and oxidative stress within human  
525 bronchial epithelial cells exposed to atmospheric particulate matter (PM(2.5) and PM(>2.5))  
526 collected from Cotonou, Benin. *Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)*, 185, 340–  
527 351. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.10.026>

528 Cazier, F., Genevray, P., Dewaele, D., Nouali, H., Verdin, A., Ledoux, F., Hachimi, A., Courcot, L., Billet,  
529 S., Bouhsina, S., Shirali, P., Garçon, G., & Courcot, D. (2016). Characterisation and seasonal  
530 variations of particles in the atmosphere of rural, urban and industrial areas: Organic  
531 compounds. *Journal of Environmental Sciences*, 44, 45–56.  
532 <https://doi.org/10.1016/j.jes.2016.01.014>



533 Chen, B.-Y., Chan, C.-C., Lee, C.-T., Cheng, T.-J., Huang, W.-C., Jhou, J.-C., Han, Y.-Y., Chen, C.-C., &  
534 Guo, Y. L. (2012). The association of ambient air pollution with airway inflammation in  
535 schoolchildren. *American Journal of Epidemiology*, *175*(8), 764–774.  
536 <https://doi.org/10.1093/aje/kwr380>

537 Corsini, E., Budello, S., Marabini, L., Galbiati, V., Piazzalunga, A., Barbieri, P., Cozzutto, S., Marinovich,  
538 M., Pitea, D., & Galli, C. L. (2013). Comparison of wood smoke PM<sub>2.5</sub> obtained from the  
539 combustion of FIR and beech pellets on inflammation and DNA damage in A549 and THP-1  
540 human cell lines. *Archives of Toxicology*, *87*(12), 2187–2199. [https://doi.org/10.1007/s00204-](https://doi.org/10.1007/s00204-013-1071-z)  
541 [013-1071-z](https://doi.org/10.1007/s00204-013-1071-z)

542 Cui, M., Chen, Y., Tian, C., Zhang, F., Yan, C., & Zheng, M. (2016). Chemical composition of PM<sub>2.5</sub>  
543 from two tunnels with different vehicular fleet characteristics. *The Science of the Total*  
544 *Environment*, *550*, 123–132. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.01.077>

545 De Grove, K. C., Provoost, S., Brusselle, G. G., Joos, G. F., & Maes, T. (2018). Insights in particulate  
546 matter-induced allergic airway inflammation: Focus on the epithelium. *Clinical and*  
547 *Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, *48*(7),  
548 773–786. <https://doi.org/10.1111/cea.13178>

549 Dergham, M., Lepers, C., Verdin, A., Billet, S., Cazier, F., Courcot, D., Shirali, P., & Garçon, G. (2012).  
550 Prooxidant and proinflammatory potency of air pollution particulate matter (PM<sub>2.5-0.8</sub>)  
551 produced in rural, urban, or industrial surroundings in human bronchial epithelial cells (BEAS-  
552 2B). *Chemical Research in Toxicology*, *25*(4), 904–919. <https://doi.org/10.1021/tx200529v>

553 Despréaux, P., Jeanton, C., Desaulle, D., Al Zallouha, M., Verdin, A., Momas, I., & Achard, S. (2023).  
554 Innovative graph analysis method to assess gene expression modulation after fine particles  
555 exposures of 3D human airway epithelia. *Environmental Research*, *221*, 115296.  
556 <https://doi.org/10.1016/j.envres.2023.115296>

557 Feng, S., Gao, D., Liao, F., Zhou, F., & Wang, X. (2016). The health effects of ambient PM2.5 and  
558 potential mechanisms. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 128, 67–74.  
559 <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.01.030>

560 Gawhane, R. D., Rao, P. S. P., Budhavant, K. B., Waghmare, V., Meshram, D. C., & Safai, P. D. (2017).  
561 Seasonal variation of chemical composition and source apportionment of PM2.5 in Pune,  
562 India. *Environmental Science and Pollution Research International*, 24(26), 21065–21072.  
563 <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9761-3>

564 Gong, J., Zhu, T., Kipen, H., Wang, G., Hu, M., Guo, Q., Ohman-Strickland, P., Lu, S.-E., Wang, Y., Zhu,  
565 P., Rich, D. Q., Huang, W., & Zhang, J. (2014). Comparisons of Ultrafine and Fine Particles in  
566 Their Associations with Biomarkers Reflecting Physiological Pathways. *Environmental Science*  
567 *& Technology*, 48(9), 5264–5273. <https://doi.org/10.1021/es5006016>

568 Gong, X., Zhu, L., Liu, J., Li, C., Xu, Z., Liu, J., & Zhang, H. (2022). Exposure to traffic-related fine  
569 particulate matter 2.5 causes respiratory damage via peroxisome proliferator-activated  
570 receptor gamma-regulated inflammation. *Environmental Toxicology*, 37(9), 2178–2188.  
571 <https://doi.org/10.1002/tox.23584>

572 Gualtieri, M., Øvrevik, J., Holme, J. A., Perrone, M. G., Bolzacchini, E., Schwarze, P. E., & Camatini, M.  
573 (2010). Differences in cytotoxicity versus pro-inflammatory potency of different PM fractions  
574 in human epithelial lung cells. *Toxicology in Vitro: An International Journal Published in*  
575 *Association with BIBRA*, 24(1), 29–39. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2009.09.013>

576 Hammond, J., Maher, B. A., Gonet, T., Bautista, F., & Allsop, D. (2022). Oxidative Stress, Cytotoxic and  
577 Inflammatory Effects of Urban Ultrafine Road-Deposited Dust from the UK and Mexico in  
578 Human Epithelial Lung (Calu-3) Cells. *Antioxidants*, 11(9), Article 9.  
579 <https://doi.org/10.3390/antiox11091814>

580 Hamra, G. B., Guha, N., Cohen, A., Laden, F., Raaschou-Nielsen, O., Samet, J. M., Vineis, P., Forastiere,  
581 F., Saldiva, P., Yorifuji, T., & Loomis, D. (2014). Outdoor particulate matter exposure and lung

582 cancer: A systematic review and meta-analysis. *Environmental Health Perspectives*, 122(9),  
583 906–911. <https://doi.org/10.1289/ehp/1408092>

584 Holme, J. A., Vondráček, J., Machala, M., Lagadic-Gossmann, D., Vogel, C. F. A., Le Ferrec, E., Sparfel,  
585 L., & Øvreik, J. (2023). Lung cancer associated with combustion particles and fine particulate  
586 matter (PM2.5)—The roles of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and the aryl  
587 hydrocarbon receptor (AhR). *Biochemical Pharmacology*, 216, 115801.  
588 <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2023.115801>

589 Hong, Z., Guo, Z., Zhang, R., Xu, J., Dong, W., Zhuang, G., & Deng, C. (2016). Airborne Fine Particulate  
590 Matter Induces Oxidative Stress and Inflammation in Human Nasal Epithelial Cells. *The*  
591 *Tohoku Journal of Experimental Medicine*, 239(2), 117–125.  
592 <https://doi.org/10.1620/tjem.239.117>

593 Hothorn, T., Bretz, F., & Westfall, P. (2008). Simultaneous inference in general parametric models.  
594 *Biometrical Journal. Biometrische Zeitschrift*, 50(3), 346–363.  
595 <https://doi.org/10.1002/bimj.200810425>

596 Huang, B.-F., Chang, Y.-C., Han, A.-L., & Hsu, H.-T. (2018). Metal composition of ambient PM2.5  
597 influences the pulmonary function of schoolchildren: A case study of school located nearby  
598 of an electric arc furnace factory. *Toxicology and Industrial Health*, 34(4), 253–261.  
599 <https://doi.org/10.1177/0748233717754173>

600 Janssen, N. A. H., Strak, M., Yang, A., Hellack, B., Kelly, F. J., Kuhlbusch, T. A. J., Harrison, R. M.,  
601 Brunekreef, B., Cassee, F. R., Steenhof, M., & Hoek, G. (2015). Associations between three  
602 specific a-cellular measures of the oxidative potential of particulate matter and markers of  
603 acute airway and nasal inflammation in healthy volunteers. *Occupational and Environmental*  
604 *Medicine*, 72(1), 49–56. <https://doi.org/10.1136/oemed-2014-102303>

605 Jia, H., Liu, Y., Guo, D., He, W., Zhao, L., & Xia, S. (2021). PM2.5-induced pulmonary inflammation via  
606 activating of the NLRP3/caspase-1 signaling pathway. *Environmental Toxicology*, 36(3), 298–  
607 307. <https://doi.org/10.1002/tox.23035>

608 Jung, C.-R., Chen, W.-T., Tang, Y.-H., & Hwang, B.-F. (2019). Fine particulate matter exposure during  
609 pregnancy and infancy and incident asthma. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*,  
610 143(6), 2254-2262.e5. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2019.03.024>

611 Kafoury, R. M., & Kelley, J. (2005). Ozone enhances diesel exhaust particles (DEP)-induced  
612 interleukin-8 (IL-8) gene expression in human airway epithelial cells through activation of  
613 nuclear factors- kappaB (NF-kappaB) and IL-6 (NF-IL6). *International Journal of Environmental*  
614 *Research and Public Health*, 2(3-4), 403-410. <https://doi.org/10.3390/ijerph2005030004>

615 Kikuchi, I., Kikuchi, S., Kobayashi, T., Hagiwara, K., Sakamoto, Y., Kanazawa, M., & Nagata, M. (2006).  
616 Eosinophil trans-basement membrane migration induced by interleukin-8 and neutrophils.  
617 *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 34(6), 760-765.  
618 <https://doi.org/10.1165/rcmb.2005-0303OC>

619 Kikuchi, S., Kikuchi, I., Takaku, Y., Kobayashi, T., Hagiwara, K., Kanazawa, M., & Nagata, M. (2009).  
620 Neutrophilic inflammation and CXC chemokines in patients with refractory asthma.  
621 *International Archives of Allergy and Immunology*, 149 Suppl 1, 87-93.  
622 <https://doi.org/10.1159/000211379>

623 Kodzhahinchev, V., Shekh, K., Weber, L. P., & Niyogi, S. (2021). Interactive effects of cadmium and  
624 Benzo[a]pyrene in adult zebrafish (*Danio rerio*) during short-term aqueous co-exposure.  
625 *Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)*, 272, 116027.  
626 <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.116027>

627 Kongerud, J., Madden, M. C., Hazucha, M., & Peden, D. (2006). Nasal responses in asthmatic and  
628 nonasthmatic subjects following exposure to diesel exhaust particles. *Inhalation Toxicology*,  
629 18(9), 589-594. <https://doi.org/10.1080/08958370600743027>

630 Korashy, H. M., & El-Kadi, A. O. S. (2005). Regulatory mechanisms modulating the expression of  
631 cytochrome P450 1A1 gene by heavy metals. *Toxicological Sciences: An Official Journal of the*  
632 *Society of Toxicology*, 88(1), 39-51. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfi282>

- 633 Korashy, H. M., & El-Kadi, A. O. S. (2006). Transcriptional regulation of the NAD(P)H:quinone  
634 oxidoreductase 1 and glutathione S-transferase ya genes by mercury, lead, and copper. *Drug*  
635 *Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*, 34(1), 152–165.  
636 <https://doi.org/10.1124/dmd.105.005397>
- 637 Leclercq, B., Happillon, M., Antherieu, S., Hardy, E. M., Alleman, L. Y., Grova, N., Perdrix, E.,  
638 Appenzeller, B. M., Lo Guidice, J.-M., Coddeville, P., & Garçon, G. (2016). Differential  
639 responses of healthy and chronic obstructive pulmonary diseased human bronchial epithelial  
640 cells repeatedly exposed to air pollution-derived PM4. *Environmental Pollution (Barking,*  
641 *Essex: 1987)*, 218, 1074–1088. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.08.059>
- 642 Li, D., Li, Y., Li, G., Zhang, Y., Li, J., & Chen, H. (2019). Fluorescent reconstitution on deposition of  
643 PM2.5 in lung and extrapulmonary organs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*  
644 *of the United States of America*, 116(7), 2488–2493.  
645 <https://doi.org/10.1073/pnas.1818134116>
- 646 Li, D., Shi, J., Liang, D., Ren, M., & He, Y. (2023). Lung cancer risk and exposure to air pollution: A  
647 multicenter North China case-control study involving 14604 subjects. *BMC Pulmonary*  
648 *Medicine*, 23(1), 182. <https://doi.org/10.1186/s12890-023-02480-x>
- 649 Li, N., Ma, J., Ji, K., & Wang, L. (2022). Association of PM2.5 and PM10 with Acute Exacerbation of  
650 Chronic Obstructive Pulmonary Disease at lag0 to lag7: A Systematic Review and Meta-  
651 Analysis. *COPD*, 19(1), 243–254. <https://doi.org/10.1080/15412555.2022.2070062>
- 652 Li, R., Zhou, R., & Zhang, J. (2018). Function of PM2.5 in the pathogenesis of lung cancer and chronic  
653 airway inflammatory diseases. *Oncology Letters*, 15(5), 7506–7514.  
654 <https://doi.org/10.3892/ol.2018.8355>
- 655 Liu, S., Zhou, Y., Liu, S., Chen, X., Zou, W., Zhao, D., Li, X., Pu, J., Huang, L., Chen, J., Li, B., Liu, S., &  
656 Ran, P. (2017). Association between exposure to ambient particulate matter and chronic  
657 obstructive pulmonary disease: Results from a cross-sectional study in China. *Thorax*, 72(9),  
658 788–795. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2016-208910>

659 Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time  
660 quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif.)*, 25(4),  
661 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>

662 Longhin, E., Holme, J. A., Gualtieri, M., Camatini, M., & Øvreik, J. (2018). Milan winter fine  
663 particulate matter (wPM2.5) induces IL-6 and IL-8 synthesis in human bronchial BEAS-2B  
664 cells, but specifically impairs IL-8 release. *Toxicology in Vitro: An International Journal*  
665 *Published in Association with BIBRA*, 52, 365–373. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2018.07.016>

666 Longhin, E., Holme, J. A., Gutzkow, K. B., Arlt, V. M., Kucab, J. E., Camatini, M., & Gualtieri, M. (2013).  
667 Cell cycle alterations induced by urban PM2.5 in bronchial epithelial cells: Characterization of  
668 the process and possible mechanisms involved. *Particle and Fibre Toxicology*, 10(1), 63.  
669 <https://doi.org/10.1186/1743-8977-10-63>

670 Manigrasso, M., Costabile, F., Liberto, L. D., Gobbi, G. P., Gualtieri, M., Zanini, G., & Avino, P. (2020).  
671 Size resolved aerosol respiratory doses in a Mediterranean urban area: From PM10 to  
672 ultrafine particles. *Environment International*, 141, 105714.  
673 <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.105714>

674 Mazzarella, G., Ferraraccio, F., Prati, M. V., Annunziata, S., Bianco, A., Mezzogiorno, A., Liguori, G.,  
675 Angelillo, I. F., & Cazzola, M. (2007). Effects of diesel exhaust particles on human lung  
676 epithelial cells: An in vitro study. *Respiratory Medicine*, 101(6), 1155–1162.  
677 <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2006.11.011>

678 Moufarrej, L., Verdin, A., Cazier, F., Ledoux, F., & Courcot, D. (2023). Oxidative stress response in  
679 pulmonary cells exposed to different fractions of PM2.5-0.3 from urban, traffic and industrial  
680 sites. *Environmental Research*, 216(Pt 2), 114572.  
681 <https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.114572>

682 Nakagome, K., & Nagata, M. (2018). Involvement and Possible Role of Eosinophils in Asthma  
683 Exacerbation. *Frontiers in Immunology*, 9, 2220. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02220>

684 Pan, S., Qiu, Y., Li, M., Yang, Z., & Liang, D. (2022). Recent Developments in the Determination of  
685 PM2.5 Chemical Composition. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*,  
686 108(5), 819–823. <https://doi.org/10.1007/s00128-022-03510-w>

687 Rael, L. T., Bar-Or, R., Banton, K. L., Mains, C. W., Roshon, M., Tanner, A. H., Lieser, M. J., Acuna, D. L.,  
688 & Bar-Or, D. (2018). The anti-inflammatory effect of LMWF5A and N-acetyl kynurenine on  
689 macrophages: Involvement of aryl hydrocarbon receptor in mechanism of action.  
690 *Biochemistry and Biophysics Reports*, 15, 61–67.  
691 <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2018.06.006>

692 Schwarze, P. E., Øvrevik, J., Hetland, R. B., Becher, R., Cassee, F. R., Låg, M., Løvik, M., Dybing, E., &  
693 Refsnes, M. (2007). Importance of size and composition of particles for effects on cells in  
694 vitro. *Inhalation Toxicology*, 19 Suppl 1, 17–22. <https://doi.org/10.1080/08958370701490445>

695 Shannon, J., Ernst, P., Yamauchi, Y., Olivenstein, R., Lemiere, C., Foley, S., Cicora, L., Ludwig, M.,  
696 Hamid, Q., & Martin, J. G. (2008). Differences in airway cytokine profile in severe asthma  
697 compared to moderate asthma. *Chest*, 133(2), 420–426. [https://doi.org/10.1378/chest.07-](https://doi.org/10.1378/chest.07-1881)  
698 1881

699 Shen, R., Liu, Z., Chen, X., Wang, Y., Wang, L., Liu, Y., & Li, X. (2019). Atmospheric levels, variations,  
700 sources and health risk of PM2.5-bound polycyclic aromatic hydrocarbons during winter over  
701 the North China Plain. *Science of The Total Environment*, 655, 581–590.  
702 <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.11.220>

703 Sotty, J., Garçon, G., Denayer, F.-O., Alleman, L.-Y., Saleh, Y., Perdrix, E., Riffault, V., Dubot, P., Lo-  
704 Guidice, J.-M., & Canivet. (2019). *Toxicological effects of ambient fine (PM2.5-0.18) and*  
705 *ultrafine (PM0.18) particles in healthy and diseased 3D organo-typic mucociliary-phenotype*  
706 *models | Elsevier Enhanced Reader*. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.108538>

707 Takaku, Y., Nakagome, K., Kobayashi, T., Hagiwara, K., Kanazawa, M., & Nagata, M. (2011). IFN- $\gamma$ -  
708 inducible protein of 10 kDa upregulates the effector functions of eosinophils through  $\beta 2$

709 integrin and CXCR3. *Respiratory Research*, 12(1), 138. <https://doi.org/10.1186/1465-9921->  
710 12-138

711 Tau, J., Novaes, P., Matsuda, M., Tasat, D. R., Saldiva, P. H., & Berra, A. (2013). Diesel exhaust  
712 particles selectively induce both proinflammatory cytokines and mucin production in cornea  
713 and conjunctiva human cell lines. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 54(7), 4759–  
714 4765. <https://doi.org/10.1167/iovs.12-10541>

715 Tétreault, L.-F., Doucet, M., Gamache, P., Fournier, M., Brand, A., Kosatsky, T., & Smargiassi, A.  
716 (2016). Severe and Moderate Asthma Exacerbations in Asthmatic Children and Exposure to  
717 Ambient Air Pollutants. *International Journal of Environmental Research and Public Health*,  
718 13(8), 771. <https://doi.org/10.3390/ijerph13080771>

719 Trusz, A., Ghazal, H., & Piekarska, K. (2020). Seasonal variability of chemical composition and  
720 mutagenic effect of organic PM2.5 pollutants collected in the urban area of Wrocław  
721 (Poland). *The Science of the Total Environment*, 733, 138911.  
722 <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138911>

723 Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., & Speleman, F.  
724 (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging  
725 of multiple internal control genes. *Genome Biology*, 3(7), RESEARCH0034.  
726 <https://doi.org/10.1186/gb-2002-3-7-research0034>

727 Vogel, C. F. A., Van Winkle, L. S., Esser, C., & Haarmann-Stemmann, T. (2020). The aryl hydrocarbon  
728 receptor as a target of environmental stressors – Implications for pollution mediated stress  
729 and inflammatory responses. *Redox Biology*, 34, 101530.  
730 <https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101530>

731 Wang, J., Li, Y., Zhao, P., Tian, Y., Liu, X., He, H., Jia, R., Oliver, B. G., & Li, J. (2020). Exposure to Air  
732 Pollution Exacerbates Inflammation in Rats with Preexisting COPD. *Mediators of*  
733 *Inflammation*, 2020, e4260204. <https://doi.org/10.1155/2020/4260204>



734 Wark, P. A. B., Bucchieri, F., Johnston, S. L., Gibson, P. G., Hamilton, L., Mimica, J., Zummo, G.,  
735 Holgate, S. T., Attia, J., Thakkinstian, A., & Davies, D. E. (2007). IFN-gamma-induced protein  
736 10 is a novel biomarker of rhinovirus-induced asthma exacerbations. *The Journal of Allergy  
737 and Clinical Immunology*, 120(3), 586–593. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2007.04.046>  
738 World Health Organization. (2023). *Air pollution*. <https://www.who.int/health-topics/air-pollution>  
739 Wu, S., Ni, Y., Li, H., Pan, L., Yang, D., Baccarelli, A. A., Deng, F., Chen, Y., Shima, M., & Guo, X. (2016).  
740 Short-term exposure to high ambient air pollution increases airway inflammation and  
741 respiratory symptoms in chronic obstructive pulmonary disease patients in Beijing, China.  
742 *Environment International*, 94, 76–82. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.05.004>  
743 Wu, X., Zhu, B., Zhou, J., Bi, Y., Xu, S., & Zhou, B. (2021). The epidemiological trends in the burden of  
744 lung cancer attributable to PM<sub>2.5</sub> exposure in China. *BMC Public Health*, 21(1), 737.  
745 <https://doi.org/10.1186/s12889-021-10765-1>  
746 Xu, Z., Wu, H., Zhang, H., Bai, J., & Zhang, Z. (2020). Interleukins 6/8 and cyclooxygenase-2 release  
747 and expressions are regulated by oxidative stress-JAK2/STAT3 signaling pathway in human  
748 bronchial epithelial cells exposed to particulate matter  $\leq 2.5 \mu\text{m}$ . *Journal of Applied  
749 Toxicology: JAT*, 40(9), 1210–1218. <https://doi.org/10.1002/jat.3977>  
750 Yang, L., Liu, G., Lin, Z., Wang, Y., He, H., Liu, T., & Kamp, D. W. (2014). Pro-inflammatory response  
751 and oxidative stress induced by specific components in ambient particulate matter in human  
752 bronchial epithelial cells. *Environmental Toxicology*, 31(8), 923–936.  
753 <https://doi.org/10.1002/tox.22102>  
754 Zablocki-Thomas, L., Menzies, S. A., Lehner, P. J., Manel, N., & Benaroch, P. (2020). A genome-wide  
755 CRISPR screen identifies regulation factors of the TLR3 signalling pathway. *Innate Immunity*,  
756 26(6), 459–472. <https://doi.org/10.1177/1753425920915507>  
757 Zhou, L., Li, P., Zhang, M., Han, B., Chu, C., Su, X., Li, B., Kang, H., Ning, J., Zhang, B., Ma, S., Su, D.,  
758 Pang, Y., Niu, Y., & Zhang, R. (2020). Carbon black nanoparticles induce pulmonary fibrosis

759 through NLRP3 inflammasome pathway modulated by miR-96 targeted FOXO3a.  
760 *Chemosphere*, 241, 125075. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125075>  
761 Zhou, Z., Liu, Y., Duan, F., Qin, M., Wu, F., Sheng, W., Yang, L., Liu, J., & He, K. (2015). Transcriptomic  
762 Analyses of the Biological Effects of Airborne PM2.5 Exposure on Human Bronchial Epithelial  
763 Cells. *PLoS ONE*, 10(9), e0138267. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138267>  
764 Zou, C., Yang, H., Cui, L., Cao, X., Huang, H., & Chen, T. (2020). Potential hazardous effects of printing  
765 room PM2.5 exposure include promotion of lung inflammation and subsequent injury.  
766 *Molecular Medicine Reports*, 22(4), 3213–3224. <https://doi.org/10.3892/mmr.2020.11399>  
767

Provisional Version

768 **Abbreviations**

769	AhR	Aryl hydrocarbon receptor
770	ALI	Air-liquid interface
771	cDNA	Complementary deoxyribonucleic acid
772	COPD	Chronic obstructive pulmonary disease
773	Ct	Cycle threshold
774	CXCL10	C-X-C motif chemokine ligand 10
775	CYP	Cytochrome (CYP1A1, CYP1B1)
776	DCM	Dichloromethane
777	DEP	Diesel exhaust particles
778	DMSO	Dimethyl sulphoxide
779	DNA	Deoxyribonucleic acid
780	ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
781	FC	Fold change
782	GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
783	GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
784	hAECb	human Airway Epithelial cells from bronchial origin
785	HPRT	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase
786	IL	Interleukine
787	Ne-PM	Non extractable fraction from PM
788	O-PM	Organic fraction from PM
789	PAH	Polycyclic aromatic hydrocarbon
790	PM	Particulate matter
791	PM <sub>2.5</sub>	Fine particles
792	recPM	recombined PM; O-PM + Ne-PM
793	wPM	whole PM
794	RNA	Ribonucleic acid
795	ROS	Reactive oxygen species
796	RPL13	Ribosomal protein L13A
797	RT-qPCR	Reverse transcription quantitative polymerase chain reaction
798	SD	Standard deviation
799	TNF- $\alpha$	Tumor necrosis factor alpha
800	vs	<i>versus</i>

801 **CRedit:**

802 **Philomène Despréaux:** Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Writing original  
803 draft; **Camille Lagadec:** Methodology, Formal analysis; **Dorota Desaulle:** Methodology,  
804 Formal analysis, Proof reading; **Anthony Verdin:** Proof-reading; **Isabelle Momas:**  
805 Supervision, Proof-reading; **Sophie Achard:** Conceptualization, Methodology, Formal  
806 analysis, Investigation, Writing original draft, Visualization, Resources, Data curation, Funding  
807 acquisition, and Supervision.

808 **Funding**

809 Collection and characterization of fine particles were supported by the French National Agency  
810 for Food, Environment, and Occupational Health Safety (Anses PNREST 01-60). Philomène  
811 Despréaux received a doctoral grant from the French Agency for the Environment and Energy  
812 Management (ADEME) and the Air Quality Research Network Paris Region (DimQi<sup>2</sup>).

813 **Declaration of competing interest**

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

816 **Acknowledgments**

817 The authors would like to thank Dr Emmanuel Curis for it helpful discussions and advice. They  
818 would also like to thank The Proofreading Company Limited Tate & Clayburn, for their  
819 proofreading services.

820 **Figures**

821 **Figure 1:** Inflammatory biomarker secretion at 6 or 24 hours in the absence of exposure (Cont)  
822 or after exposure to various PM fractions (wPM, O-PM, Ne-PM, or recPM) at 3 or 6  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$   
823 of hAECb from (1) Healthy, (2) Asthma, or (3) COPD donors. (a) IL-8 secretion. (b) IL-6  
824 secretion. (c) GM-CSF secretion. Data are represented as mean secretion level (in  $\text{pg}/\text{mL}$ )  $\pm$   
825 SD. Significance: \*wPM;  $\Delta$ O-PM;  $\S$ Ne-PM;  $\#$ recPM. \*P < 0.5; \*\*P < 0.01; \*\*\*P < 0.001.  
826 COPD, chronic obstructive pulmonary disease; GM-CSF, granulocyte-macrophage colony-  
827 stimulating factor; h, hours; hAECb, human airway epithelial cells of bronchial origin; IL,  
828 interleukin; Ne-PM, non-extractable fraction of PM; O-PM, organic fraction of PM; PM,  
829 particulate matter; recPM, recombined fraction; wPM, whole PM.

830 **Figure 2:** Modulation of the expression of some genes involved in the inflammatory response  
831 in (a1, a2) hAECb-Healthy, (b1, b2) hAECb-Asthma, and (c1, c2) hAECb-COPD after (a1, b1,  
832 c1) 6 hours or (a2, b2, c2) 24 hours of exposure to wPM, O-PM, Ne-PM, or recPM at 3 or 6  
833  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ . Results are normalized to the control and data are represented as mean  $\pm$  SD. Student  
834 tests were performed to compare exposed and control conditions. P-values were adjusted using  
835 false discovery rate. \*P-adjusted < 0.05; \*\*P-adjusted < 0.01; \*\*\*P-adjusted < 0.001. R  
836 software version 4.2.2. COPD, chronic obstructive pulmonary disease; FC, fold change;  
837 hAECb, human airway epithelial cells of bronchial origin; Ne-PM, non-extractable fraction of  
838 PM; O-PM, organic fraction of PM; PM, particulate matter; recPM, recombined fraction; wPM,  
839 whole PM.

840 **Figure 3:** Modulation of the expression of some genes involved in the metabolic response in  
841 (a1, a2) hAECb-Healthy, (b1, b2) hAECb-Asthma, and (c1, c2) hAECb-COPD after (a1, b1,  
842 c1) 6 hours or (a2, b2, c2) 24 hours of exposure to wPM, O-PM, Ne-PM, or recPM at 3 or 6  
843  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ . Results are normalized to the control and data are represented as mean  $\pm$  SD. Student  
844 tests were performed to compare exposed and control conditions. P-values were adjusted using  
845 false discovery rate. \*P-adjusted < 0.05; \*\*\*P-adjusted < 0.001. R software version 4.2.2.  
846 COPD, chronic obstructive pulmonary disease; FC, fold change; h, hours; hAECb, human  
847 airway epithelial cells of bronchial origin; Ne-PM, non-extractable fraction of PM; O-PM,  
848 organic fraction of PM; PM, particulate matter; recPM, recombined fraction; wPM, whole PM.

849 **Supplementary data**

850 **Figure S1:** Evaluation of the RNA transcription levels of three housekeeping genes: *GAPDH*,  
851 *HPRT*, and *RPL13*. (a) Distribution of Ct values of the three housekeeping genes on hAECb  
852 from donors without respiratory disease (hAECb-Healthy) or with respiratory disease (hAECb-  
853 Asthma or hAECb-COPD). The box represents the IQR, with the median marked by a  
854 horizontal line inside the box. The whiskers extend to the minimum and maximum values  
855 within 1.5 times the IQR. Outliers are depicted as individual points beyond the whiskers. (b)  
856 Comparison of the housekeeping genes' median RNA transcription in absolute Ct values for  
857 control and exposed hAECb from donors without respiratory disease (hAECb-Healthy) or with  
858 respiratory disease (hAECb-Asthma or hAECb-COPD). COPD, chronic obstructive pulmonary  
859 disease; Ct, cycle threshold; hAECb, human airway epithelial cells of bronchial origin; IQR,  
860 interquartile range.

861 **Table S1:** Chemical composition ( $\mu\text{g/g}$ ) of  $\text{PM}_{2.5-0.3}$  collected under industrial influence (wPM).

862 **Table S2:** Information on hAECb and donor characteristics. Certificates of analysis were  
863 provided by Epithelix©. hAECb, human airway epithelial cells of bronchial origin.

864 **Table S3:** Primers for quantitative polymerase chain reaction analysis.

865 **Table S4:** P-values for cytokines/chemokine (IL-8, IL-6, GM-CSF) level comparisons  
866 following exposure to different PM fractions (wPM, O-PM, Ne-PM, recPM) *versus* control  
867 condition for one concentration (3 or 6  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ), one time (6 hours or 24 hours), and one status  
868 (Healthy, Asthma, COPD). \*\*\*P > 0.001; \*\*P > 0.01; \*P > 0.05. COPD, chronic obstructive  
869 pulmonary disease; GM-CSF, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; h, hours; IL,  
870 interleukin; Ne-PM, non-extractable fraction of PM; NS, not significant; O-PM, organic  
871 fraction of PM; PM, particulate matter; recPM, recombined fraction; wPM, whole PM.

872 **Table S5:** P-values after time-effect comparison (24 hours *vs* 6 hours) for one PM fraction  
873 (wPM, O-PM, Ne-PM, or recPM) at one concentration (3 or 6  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ), one biomarker (IL-6,  
874 IL-8, GM-CSF), and one status (Healthy, Asthma, COPD). Adjustment of the quantities of  
875 cytokines/chemokines secreted in relation to the secretion by unexposed cells was made and a  
876 linear regression model by contrast was applied (Wald test with multiplicity correction "Single-  
877 Step method") (Hothorn et al. 2008). \*\*\*P > 0.001; \*\*P > 0.01; \*P > 0.05. COPD, chronic  
878 obstructive pulmonary disease; GM-CSF, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor;  
879 IL, interleukin; Ne-PM, non-extractable fraction of PM; NS, not significant; O-PM, organic  
880 fraction of PM; PM, particulate matter; recPM, recombined fraction; wPM, whole PM.

881 **Table S6:** P-values after PM fraction comparison (wPM vs O-PM, wPM vs Ne-PM, wPM vs  
882 recPM, Ne-PM vs O-PM) for one concentration (3 or 6  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ), one time (6 hours or 24 hours),  
883 one biomarker (IL-6, IL-8, GM-CSF), and one status (Healthy, Asthma, COPD). \*\*\*P > 0.001;  
884 \*\*P > 0.01; \*P > 0.05. COPD, chronic obstructive pulmonary disease; GM-CSF, granulocyte-  
885 macrophage colony-stimulating factor; h, hours; IL, interleukin; Ne-PM, non-extractable  
886 fraction of PM; NS, not significant; O-PM, organic fraction of PM; PM, particulate matter;  
887 recPM, recombined fraction; wPM, whole PM.

Provisional Version

**CRedit:**

**Philomène Després:** Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Writing original draft; **Camille Lagadec:** Methodology, Formal analysis; **Dorota Desaulle:** Methodology, Formal analysis, Proof reading; **Anthony Verdin:** Proof-reading; **Isabelle Momas:** Supervision, Proof-reading; **Sophie Achard:** Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Investigation, Writing original draft, Visualization, Resources, Data curation, Funding acquisition, and Supervision.

Provisional Version



Declaration of Interest Statement

**Declaration of interests:**

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

The authors declare the following financial interests/personal relationships which may be considered as potential competing interests:

Provisional Version

Figure 1

**Figure 1:** I Inflammatory biomarker secretion at 6 or 24 hours in the absence of exposure (Cont) or after exposure to various PM fractions (wPM, O-PM, Ne-PM, or recPM) at 3 or 6  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  of hAECb from (1) Healthy, (2) Asthma, or (3) COPD donors. (a) IL-8 secretion. (b) IL-6 secretion. (c) GM-CSF secretion. Data are represented as mean secretion level (in  $\text{pg}/\text{mL}$ )  $\pm$  SD. Significance: \*wPM; <sup>1</sup>O-PM; <sup>2</sup>Ne-PM; <sup>3</sup>recPM. \* $P < 0.5$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ . COPD, chronic obstructive pulmonary disease; GM-CSF, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; h, hours; hAECb, human airway epithelial cells of bronchial origin; IL, interleukin; Ne-PM, non-extractable fraction of PM; O-PM, organic fraction of PM; PM, particulate matter; recPM, recombined fraction; wPM, whole PM.

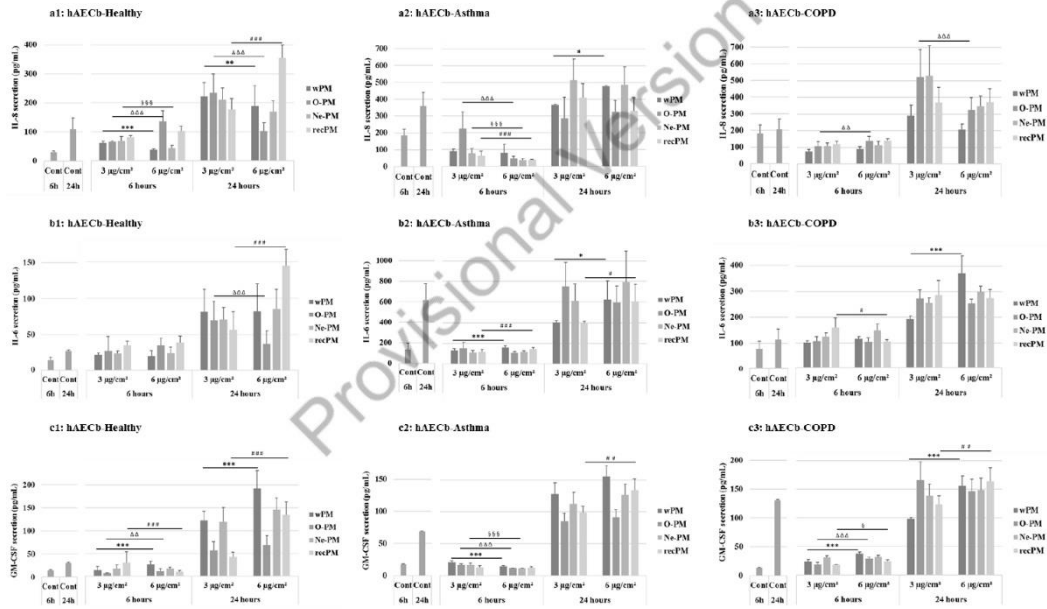
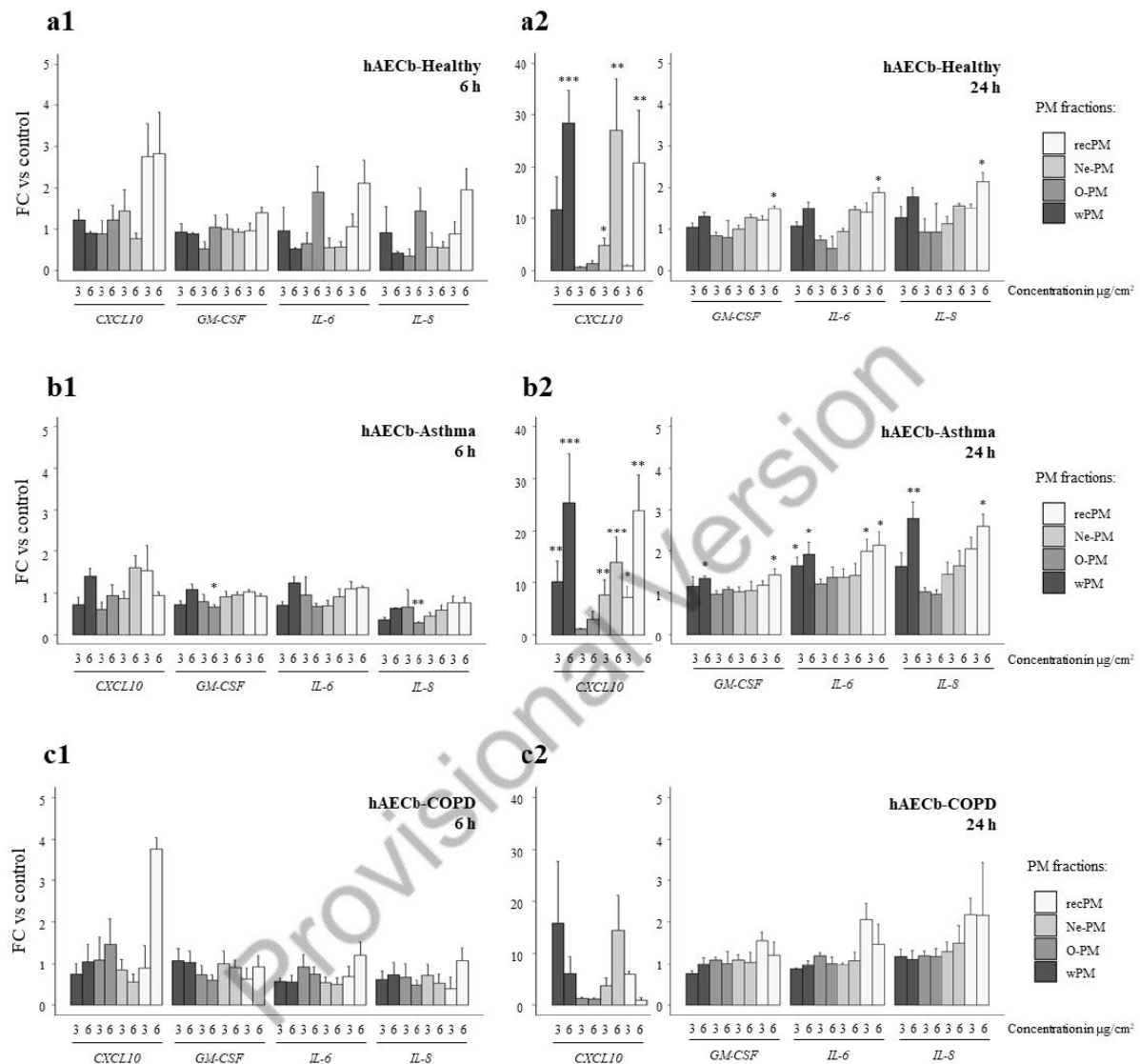
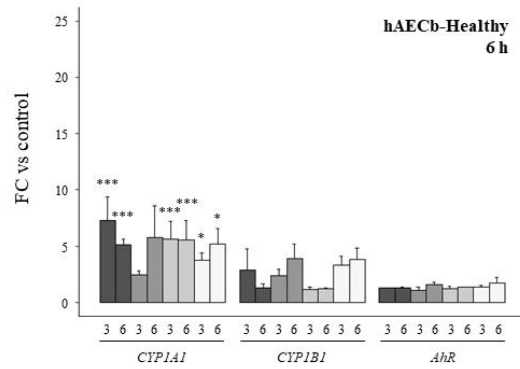


Figure 2

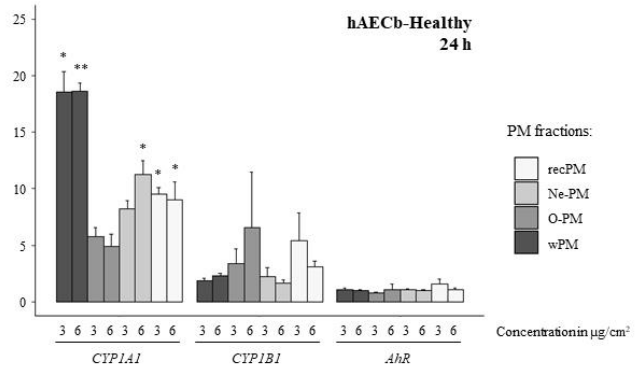


**Figure 2:** Modulation of the expression of some genes involved in the inflammatory response in (a1, a2) hAECb-Healthy, (b1, b2) hAECb-Asthma, and (c1, c2) hAECb-COPD after (a1, b1, c1) 6 hours or (a2, b2, c2) 24 hours of exposure to wPM, O-PM, Ne-PM, or recPM at 3 or 6 µg/cm<sup>2</sup>. Results are normalized to the control and data are represented as mean ± SD. Student tests were performed to compare exposed and control conditions. P-values were adjusted using false discovery rate. \*P-adjusted < 0.05; \*\*P-adjusted < 0.01; \*\*\*P-adjusted < 0.001. R software version 4.2.2. COPD, chronic obstructive pulmonary disease; FC, fold change; hAECb, human airway epithelial cells of bronchial origin; Ne-PM, non-extractable fraction of PM; O-PM, organic fraction of PM; PM, particulate matter; recPM, recombined fraction; wPM, whole PM.

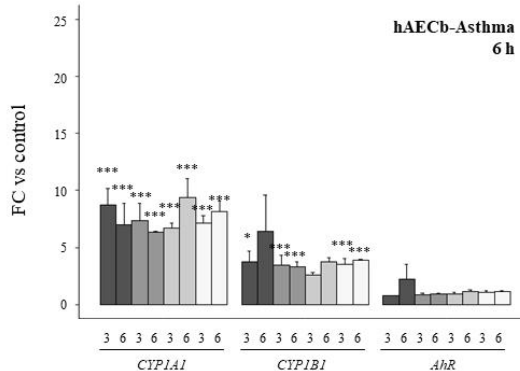
Figure 3  
a1



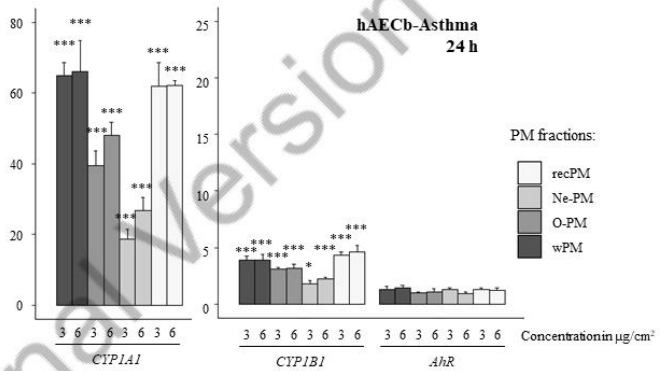
a2



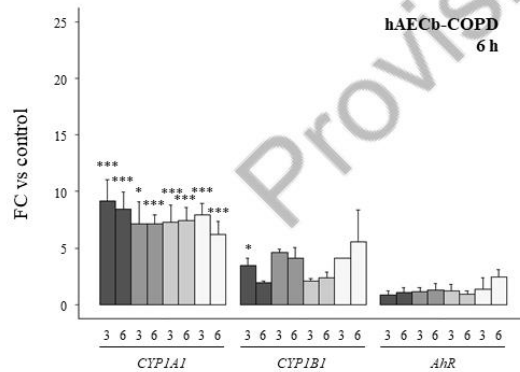
b1



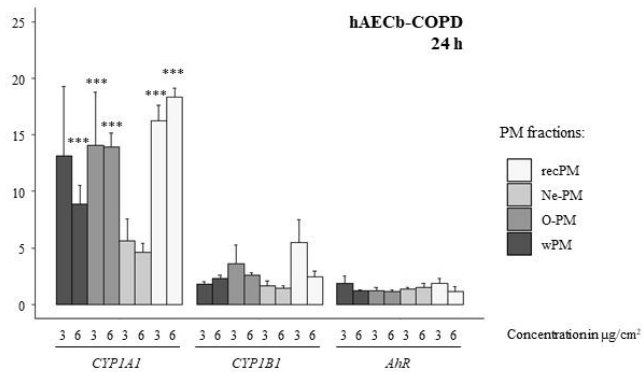
b2



c1



c2



**Figure 3:** Modulation of the expression of some genes involved in the metabolic response in (a1, a2) hAECb-Healthy, (b1, b2) hAECb-Asthma, and (c1, c2) hAECb-COPD after (a1, b1, c1) 6 hours or (a2, b2, c2) 24 hours of exposure to wPM, O-PM, Ne-PM, or recPM at 3 or 6  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ . Results are normalized to the control and data are represented as mean  $\pm$  SD. Student tests were performed to compare exposed and control conditions. P-values were adjusted using false discovery rate. \*P-adjusted < 0.05; \*\*\*P-adjusted < 0.001. R software version 4.2.2. COPD, chronic obstructive pulmonary disease; FC, fold change; h, hours; hAECb, human airway epithelial cells of bronchial origin; Ne-PM, non-extractable fraction of PM; O-PM, organic fraction of PM; PM, particulate matter; recPM, recombined fraction; wPM, whole PM.

**Pour compléter les résultats présentés dans le deuxième article**, des analyses complémentaires ont été réalisées. Les résultats de RT-qPCR présentés dans l'article ont été analysés avec la méthode classique des  $\Delta\Delta C_t$ . La méthode d'analyse graphique par réseaux a été appliquée en complément de la méthode classique pour étudier :

- la différence d'expression génique à l'état basal, c'est-à-dire en l'absence d'exposition, entre les trois statuts physiopathologiques (sain, asthme et BPCO) ;
- l'éventuel impact du DMSO ( $T_{DMSO}$ ) sur la modulation de l'expression des gènes étudiés ;
- l'impact des expositions aux différentes fractions de wPM sur la modulation de l'expression de gènes de l'inflammation et du métabolisme.

#### IV.2.3.2. Comparaison de l'expression génique basale des cellules hAECb en fonction de leur statut physiopathologique

Les expressions géniques à l'état basal, c'est-à-dire en l'absence d'exposition, ont été comparées entre les trois statuts physiopathologiques.

Les expressions géniques à l'état basal des cellules hAECb-A et hAECb-B ont été comparées à celle des cellules hAECb-S, en prenant les cellules hAECb-S comme groupe de référence (Figure 39.A et Figure 39.B, respectivement). L'expression génique à l'état basal des cellules hAECb-A a été comparée à celle des cellules hAECb-B, en prenant arbitrairement les cellules hAECb-A comme groupe de référence (Figure 39.C).

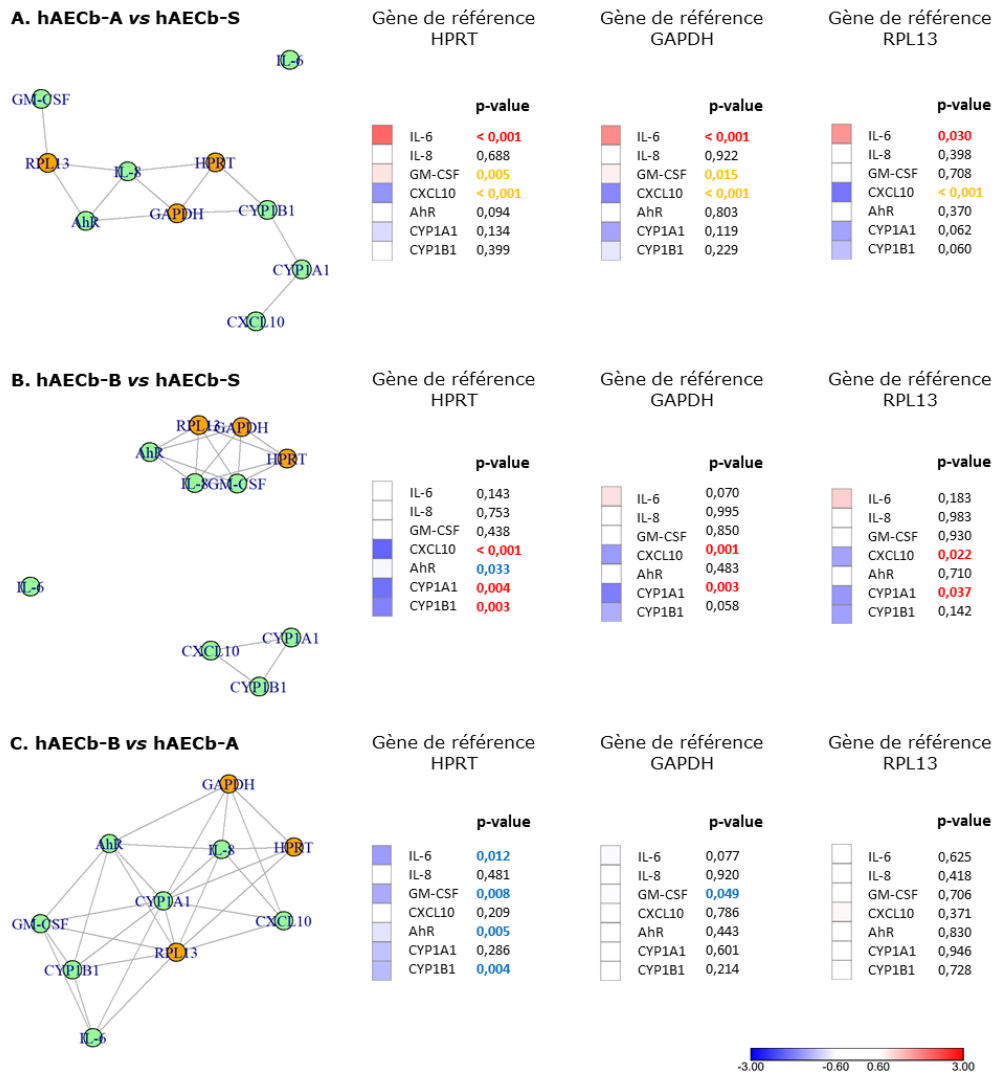


Figure 39 : Comparaison des expressions géniques à l'état basal **A.** des cellules hAECb-A Cont par rapport aux cellules hAECb-S Cont **B.** des cellules hAECb-B Cont par rapport aux cellules hAECb-S Cont **C.** des cellules hAECb-B Cont par rapport aux cellules hAECb-A Cont.  $n \geq 10$  pour chacun des groupes étudiés. **p-value** : différence significative avec les deux méthodes d'analyse ; **p-value** : différence significative avec la méthode classique et limite de séparation avec la méthode d'analyse par réseaux ; **p-value** : significativité uniquement avec la méthode classique.

Pour toutes les comparaisons réalisées, il convient de noter que les trois gènes de référence (*HPRT*, *GAPDH* et *RPL13*) se trouvent dans le graphe principal. Cette observation permet de valider ces trois gènes de référence pour la comparaison des trois statuts étudiés, car leur expression demeure stable, quel que soit le statut physiopathologique.

La comparaison de l'expression génique basale entre les cellules hAECb-A et hAECb-S par la méthode d'analyse graphique par réseaux révèle que le gène *IL-6* est totalement dissocié du graphe principal, indiquant une expression différentielle de ce gène pour les cellules hAECb-A par rapport aux cellules hAECb-S. La méthode d'analyse classique indique que l'expression de ce gène est significativement plus importante chez les cellules hAECb-A par rapport aux cellules hAECb-S,

quel que soit le gène de référence utilisé. Deux autres gènes de l'inflammation (*GM-CSF* et *CXCL10*) apparaissent en limite de séparation. La méthode d'analyse classique indique que l'expression *GM-CSF* augmente légèrement mais de manière significative lorsque les gènes *HPRT* et *GAPDH* sont utilisés comme gènes de référence. L'expression de *CXCL10*, quant à elle, est significativement diminuée pour les cellules hAECb-A par rapport aux cellules hAECb-S, quel que soit le gène de référence utilisé.

Pour ce qui est de la comparaison de l'expression génique entre les cellules hAECb-B et les cellules hAECb-S, l'analyse graphique par réseaux révèle que quatre gènes sont complètement dissociés du graphe principal : *IL-6*, qui n'est connecté à aucun autre gène, ainsi que *CXCL10*, *CYP1A1* et *CYP1B1*, qui sont interconnectés et forment un sous-graphe. La méthode d'analyse classique montre que l'*IL-6* est légèrement surexprimé bien qu'aucune significativité ne soit mise en évidence, quel que soit le gène de référence utilisé. Les gènes *CXCL10* et *CYP1A1* sont significativement sous-exprimés pour les cellules hAECb-B par rapport aux cellules hAECb-S, quel que soit le gène de gène de référence utilisé, et *CYP1B1* est significativement sous-exprimé lorsque *HPRT* est utilisé comme gène de référence.

Enfin, la comparaison des expressions géniques à l'état basal des cellules hAECb-B et hAECb-A par la méthode d'analyse graphique par réseaux indique l'absence de différence significative dans l'expression génique à l'état basal entre ces deux statuts. Ce résultat est confirmé par la méthode d'analyse classique lorsque *GAPDH* et *RPL13* sont utilisés comme gènes de référence. Toutefois, lorsque *HPRT* est utilisé comme gène de référence, les gènes *IL-6*, *GM-CSF*, *CYP1A1* et *CYP1B1* apparaissent comme significativement moins fortement exprimés pour les cellules hAECb-B par rapport aux cellules hAECb-A.

**Messages clés :**

- L'expression génique basale des cellules hAECb dépend de leur statut physiopathologique.
- *IL-6* est significativement surexprimé pour les cellules hAECb-A par rapport aux cellules hAECb-S.
- *IL-6* est significativement surexprimé et *CXCL10*, *CYP1A1* et *CYP1B1* sont significativement sous-exprimés pour les cellules hAECb-B par rapport aux cellules hAECb-S.
- Les expressions géniques basales des cellules hAECb-A et hAECb-B ne sont pas significativement différentes.

### IV.2.3.3. Étude de l'impact de l'exposition au DMSO sur la modulation de l'expression des gènes

Afin d'évaluer l'éventuel impact du DMSO, utilisé comme solvant lors de la préparation de la fraction O-PM, les conditions  $T_{DMSO}$  ont été comparées aux conditions Cont pour les trois statuts physiologiques. Les comparaisons ont été faites à l'aide de la méthode d'analyse graphique par réseaux pour les durées d'exposition de 6h (Figure 40.A-B-C) et de 24h (Figure 40.D-E-F).

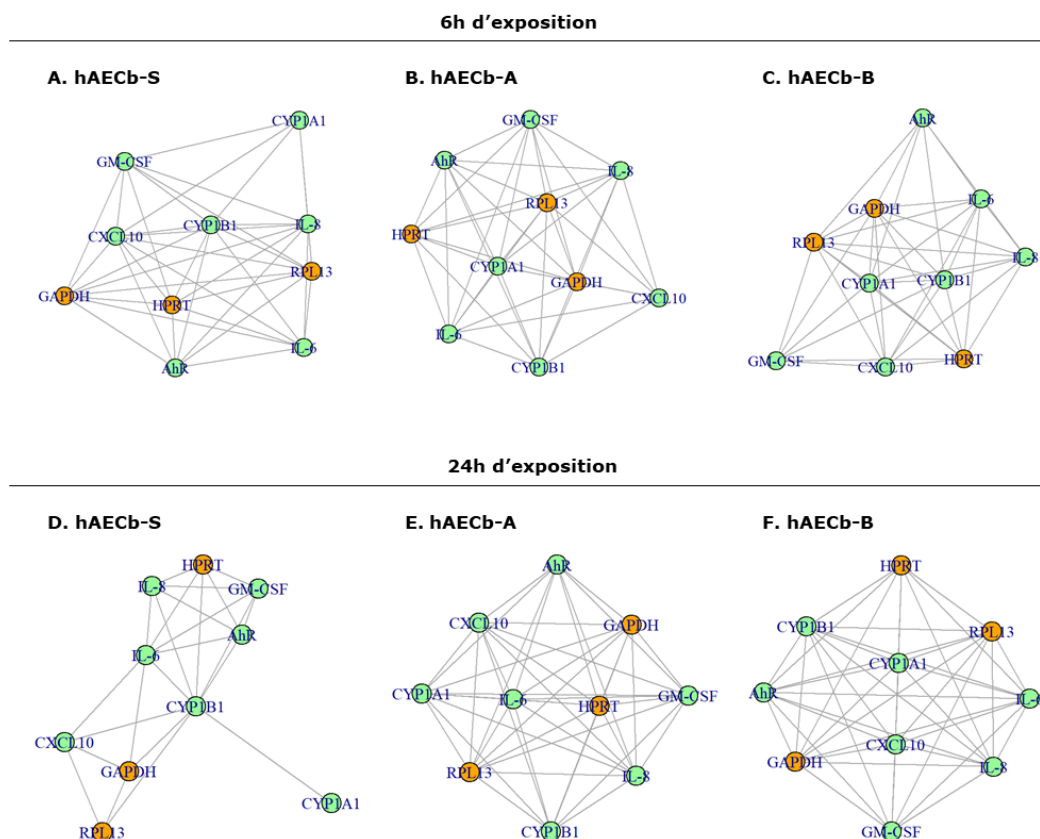


Figure 40 : Comparaison de l'expression génique entre les conditions  $T_{DMSO}$  et Cont chez les hAECb-S (A et D), hAECb-A (B et E) et hAECb-B (C et F) après 6h (A, B et C) ou 24h (D, E et F) d'exposition.  $n \geq 5$  pour chacun des groupes étudiés.

Pour toutes les comparaisons réalisées, un graphe connexe est obtenu, indiquant l'absence de différence significative dans l'expression des gènes suite à l'exposition au DMSO par rapport au contrôle (Cont). Toutefois, il peut être noté que le gène du métabolisme *CYP1A1* apparaît en limite de séparation chez les cellules hAECb-S après 24h d'exposition (Figure 40.D).

#### Message clé :

- Pour les trois statuts physiopathologiques considérés, le DMSO n'impacte pas l'expression des gènes de l'inflammation et du métabolisme étudiés.



#### IV.2.3.4. Évaluation de la modulation de l'expression des gènes de l'inflammation et du métabolisme suite à des expositions aux wPM et à leurs fractions associées en utilisant la méthode d'analyse graphique par réseaux

Les résultats obtenus avec la méthode d'analyse classique des  $\Delta\Delta Ct$  ayant été présentés dans le deuxième article, seuls les résultats obtenus avec la méthode d'analyse graphique par réseaux seront décrits dans cette partie (Figure 41, Figure 42, Figure 43).

Il est important de noter que, contrairement aux comparaisons précédentes, les trois gènes de référence ne sont pas toujours retrouvés dans le même sous-graphe. En effet, pour certaines conditions testées, les gènes *GAPDH* et *RPL13* sont parfois dissociés du graphe principal, ce qui rend l'interprétation des résultats plus complexe. *HPRT*, quant à lui, est toujours retrouvé dans le graphe principal, ce qui semble indiquer que ce gène est plus stable. Par conséquent, les interprétations des résultats exposés ci-après seront faites en considérant que *HPRT* est le gène dont l'expression n'est pas modulée quand les trois gènes de référence ne sont pas retrouvés dans le même sous-graphe.

##### IV.2.3.4.1. Modulation de l'exposition génique après expositions des cellules hAECb-S

Les résultats des analyses graphiques par réseaux pour les cellules hAECb-S sont présentés sur la Figure 41.

**L'exposition aux wPM** induit une modulation significative de l'expression des gènes du métabolisme *CYP1A1* et *CYP1B1*, après 6 heures d'exposition à la concentration de 3  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  et après 24 heures d'exposition aux deux concentrations testées. Ces deux gènes sont toujours connectés entre eux par une arête, ce qui suggère une co-régulation de leur expression suite aux expositions aux wPM.

Après 24 heures d'exposition, une modulation significative de l'expression du gène de l'inflammation *CXCL10* s'ajoute à celle des gènes du métabolisme. Ce gène est connecté à *CYP1A1* et à *CYP1B1* pour la concentration de 3  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ . Lorsque la concentration d'exposition augmente (6  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ), *CXCL10* se détache du sous-graphe contenant *CYP1A1* et *CYP1B1*, témoignant d'une modulation significativement différente de celle de ces deux gènes.

**Les résultats obtenus après des expositions à la fraction O-PM** semblent indiquer que la fraction organique des wPM participe à l'activation de la réponse métabolique. En effet, après 6 heures d'exposition, *CYP1B1* est en limite de séparation, quelle que soit la concentration testée

et *CYP1A1* est en limite de séparation pour la concentration de 6 µg/cm<sup>2</sup>. Après 24 heures d'exposition à une concentration de 3 µg/cm<sup>2</sup>, ces deux gènes du métabolisme sont totalement disjoints du graphe principal.

De plus, l'exposition à la fraction O-PM induit une réponse inflammatoire avec une modulation significative de l'expression des gènes *IL-6*, *IL-8* et *GM-CSF* après 24 heures d'exposition à la concentration de 6 µg/cm<sup>2</sup>.

**La fraction Ne-PM** semble également contribuer à l'impact des wPM sur la réponse métabolique. Bien que les modulations de l'expression des gènes du métabolisme ne soient pas significatives, les gènes *CYP1A1* et/ou *CYP1B1* apparaissent en limite de séparation suite aux expositions à Ne-PM.

De plus, la fraction Ne-PM joue un rôle dans la réponse inflammatoire observée après les expositions aux wPM. En effet, *CXCL10* est en limite de séparation après une exposition de 24 heures à une concentration de 3 µg/cm<sup>2</sup> de Ne-PM, et complètement déconnecté du graphe principal après une exposition de 24 heures à une concentration de 6 µg/cm<sup>2</sup>.

**La fraction recPM** induit une modulation significative de l'expression des gènes du métabolisme *CYP1A1* et *CYP1B1* après 24 heures d'exposition, quelles que soient les concentrations d'exposition. Ces deux gènes sont toujours connectés entre eux par une arête, ce qui suggère leur co-régulation.

Après 24 heures d'exposition à la concentration de 6 µg/cm<sup>2</sup>, les expressions des gènes de l'inflammation *CXCL10*, *IL-6* et *IL-8* sont également significativement modulées.

**Messages clés :**

- L'exposition aux wPM semble induire des réponses métabolique et inflammatoire chez les cellules hAECb-S, caractérisées par une modulation significative de l'expression des gènes *CYP1A1*, *CYP1B1* et *CXCL10*.
- La réponse cellulaire suite aux expositions aux wPM est plus prononcée après 24 heures qu'après 6 heures d'exposition.

Les fractions O-PM et Ne-PM semblent avoir un effet synergique sur la réponse métabolique lorsqu'elles sont combinées (wPM et recPM).

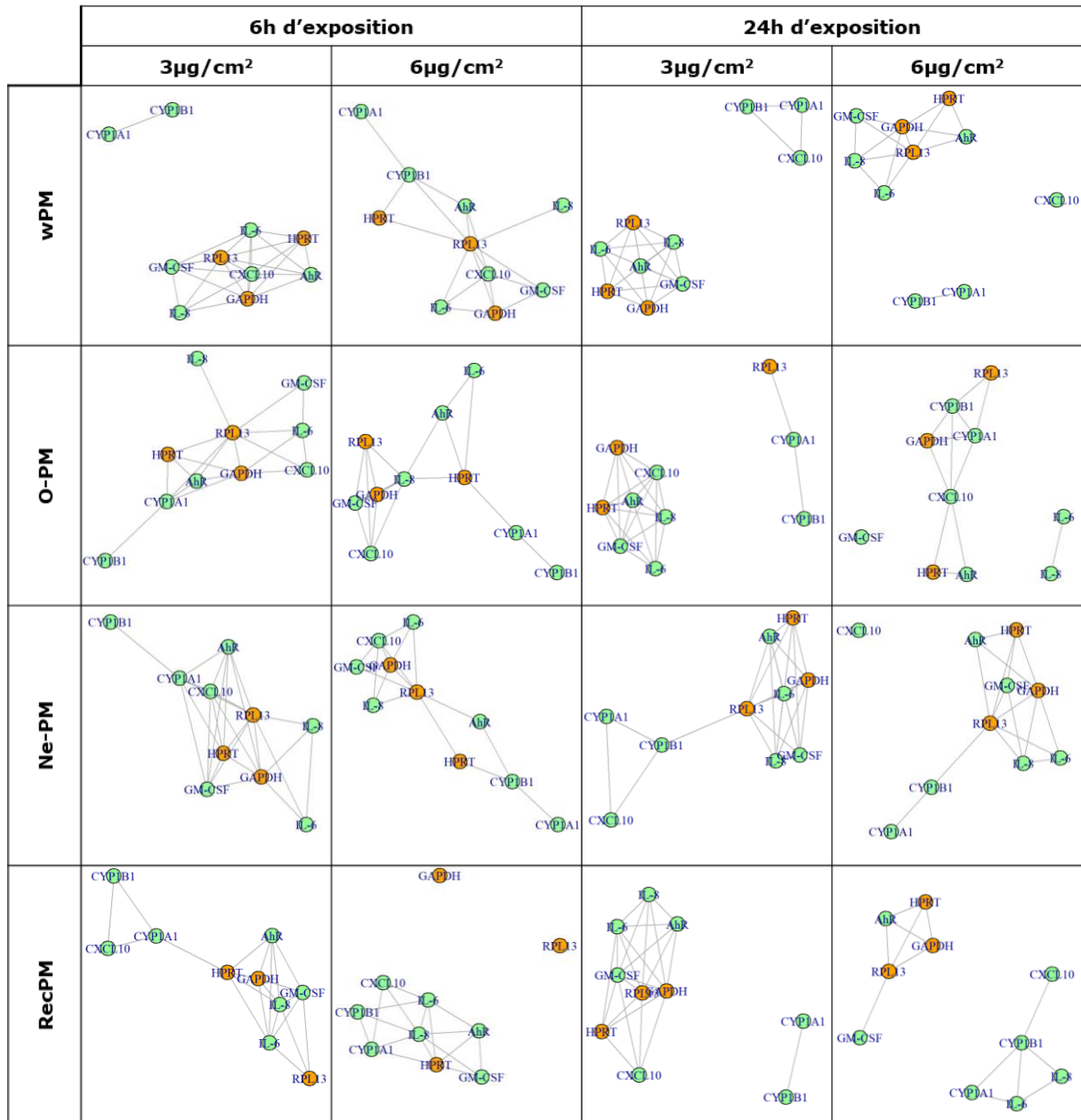


Figure 41 : Évaluation de la modulation de l'expression des gènes chez les hAECb-S suite à des expositions aux wPM, à O-PM, à NE-PM ou aux recPM à des concentrations de 3 ou 6 µg/cm<sup>2</sup> pendant 6 ou 24h. n ≥ 3 pour chacun des groupes étudiés.

#### IV.2.3.4.2. Modulation de l'expression génique après exposition des cellules hAECb-A

Les résultats des analyses graphiques par réseaux pour les cellules hAECb-A sont présentés sur la Figure 42.

**L'exposition aux wPM** induit une modulation significative des gènes du métabolisme *CYP1A1* et *CYP1B1*, après 6 heures d'exposition à la concentration de 3 µg/cm<sup>2</sup> et après 24 heures

d'exposition aux les deux concentrations testées. Après 24 heures d'exposition, une réponse inflammatoire s'ajoute à la réponse métabolique. Pour des expositions de 3  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , *CXCL10* est totalement disjoint du graphe principal et *IL-6* et *IL-8* sont en limite de séparation. Pour des expositions de 6  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , *CXCL10*, *IL-6* et *IL-8* sont totalement disjoint du graphe principal.

**L'exposition à O-PM** induit principalement une réponse métabolique. Les gènes *CYP1A1* et *CYP1B1* sont totalement disjoints du graphe principal, quelles que soient la durée et la concentration d'exposition, sauf suite à 24 heures exposition à une concentration de 6  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  où *CYP1B1* est en limite de séparation. L'exposition à O-PM module légèrement la réponse inflammatoire : *IL-8* est totalement dissocié du graphe principal après 6 heures d'exposition à 6  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ .

**La fraction Ne-PM** semble contribuer à l'impact des wPM sur les réponses métaboliques et inflammatoires. Les expressions des gènes *CYP1A1* et *CYP1B1* sont significativement modulés quelle que soit la durée et la concentration d'exposition, hormis lorsque les cellules ont été exposées à 3  $\mu\text{g eq.PM}/\text{cm}^2$  de Ne-PM pendant 24 heures, condition pour laquelle l'expression *CYP1B1* n'est pas significativement modulée. De plus, après 24 heures d'exposition l'expression de *CXCL10* est également significativement modulée pour les deux concentrations testées et les expressions de *IL-6* et *IL-8* sont significativement modulées pour la concentration d'exposition de 6  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ .

**L'exposition aux recPM** induit également des modulations significatives de l'expression de gènes de l'inflammation et du métabolisme avec des profils proches de ceux observés suite aux expositions aux wPM. Les gènes du métabolisme *CYP1A1* et *CYP1B1* sont totalement disjoints du graphe principal pour toutes les conditions d'exposition. Après 24 heures d'exposition, les gènes de l'inflammation *CXCL10*, *IL-6* et *IL-8* sont également disjoints du graphe principal. Il est possible de noter qu'une arête relie les gènes *IL-6* et *IL-8* pour les deux concentrations d'exposition testées. Il semble donc que ces deux gènes soient co-régulés.

**Messages clés :**

- L'exposition aux wPM a un impact sur les réponses inflammatoire et métabolique chez les cellules hAECb-A.
- La fraction O-PM semble jouer principalement sur la réponse métabolique.
- La fraction Ne-PM semble jouer sur les réponses métabolique et inflammatoire.
- Les fractions O-PM et Ne-PM semblent avoir un effet synergique sur les réponses métaboliques et inflammatoires lorsqu'elles sont combinées (wPM et recPM).

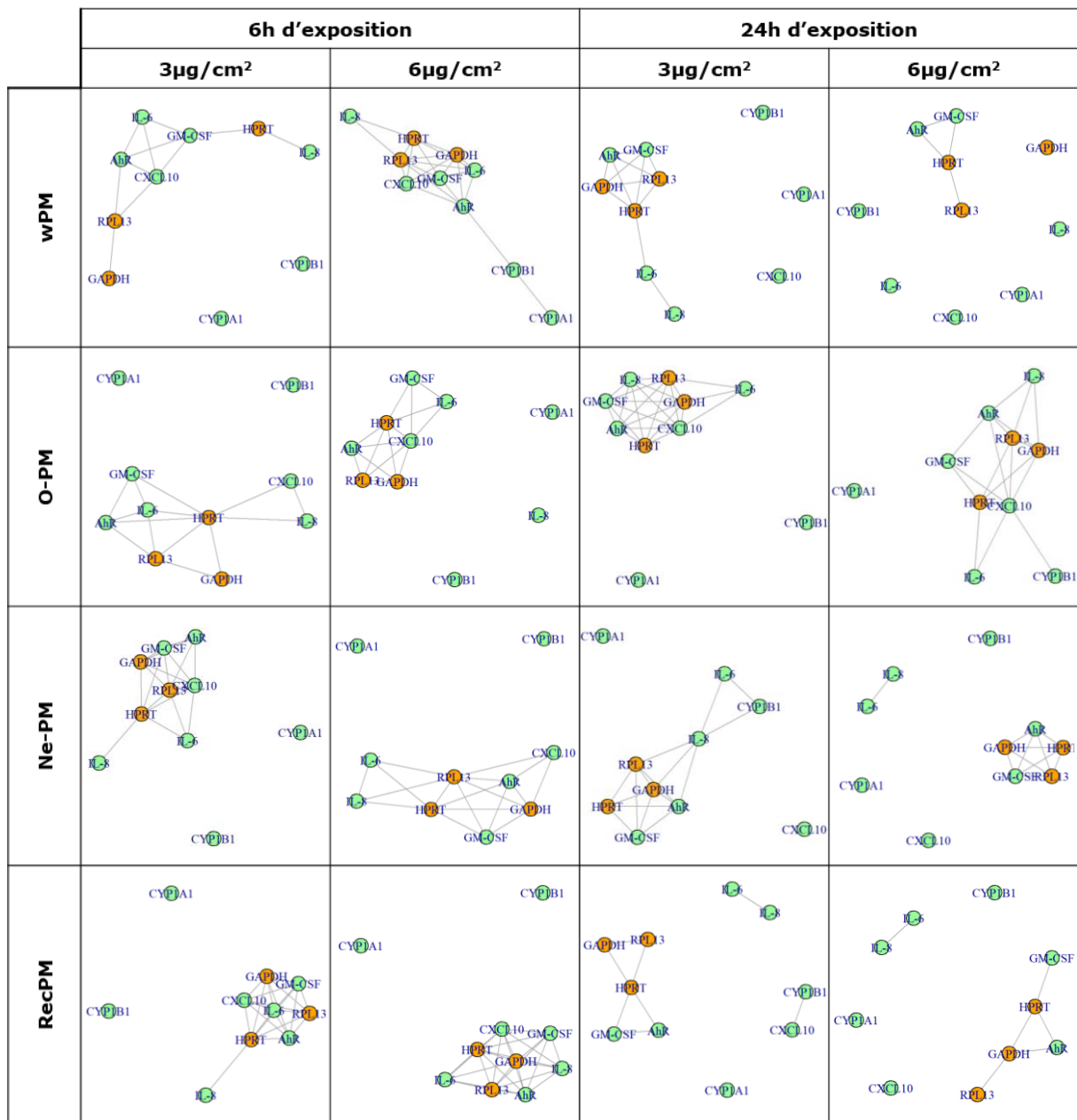


Figure 42 : Évaluation de la modulation de l'expression des gènes chez les hAECb-A suite à des expositions aux wPM, à O-PM, à NE-PM ou aux recPM à des concentrations de 3 ou 6 µg/cm<sup>2</sup> pendant 6 ou 24h. n ≥ 3 pour chacun des groupes étudiés.

#### IV.2.3.4.3. Modulation de l'expression génique après exposition des cellules hAECb-A

Les résultats des analyses graphiques par réseaux pour les cellules hAECb-B sont présentés sur la Figure 43.

L'exposition aux wPM induit une modulation significative de l'expression de gènes du métabolisme. En effet, l'expression de *CYP1A1* est significativement modulée, quelles que soient

la durée et la concentration d'exposition. L'expression du gène *CYP1B1* est significativement modulée après 6 heures d'exposition à la concentration de 3 µg/cm<sup>2</sup>.

L'exposition aux wPM pendant 24 heures à une concentration de 3 µg/cm<sup>2</sup> induit également une modulation significative de l'expression du gène de l'inflammation *CXCL10*. En effet, ce gène est dissocié du graphe principal et forme un sous graphe avec *CYP1A1*.

**Suite aux expositions à la fraction O-PM**, l'expression du gène du métabolisme *CYP1A1* est significativement modulée, hormis lorsque les cellules ont été exposées à 3 µg/cm<sup>2</sup> pendant 6 heures, condition pour laquelle *CYP1A1* est en limite de séparation.

**En ce qui concerne la fraction Ne-PM**, l'expression du gène *CYP1A1* est significativement modulée quelles que soient la durée et la concentration d'exposition. Après 24 heures d'exposition, l'expression du gène *CXCL10* est également significativement modulée pour la concentration d'exposition de 6 µg/cm<sup>2</sup> et forme un sous graphe avec *CYP1A1*.

**L'exposition aux recPM** induit peu de modulation de l'expression des gènes étudiés. Après 6 heures d'exposition, aucune modulation significative de l'expression génique n'est observée. Après 24 heures d'exposition, l'expression du gène *CYP1A1* est significativement modulée, quelle que soit la concentration d'exposition et l'expression du gène *CXCL10* est significativement modulée pour la concentration d'exposition de 3 µg/cm<sup>2</sup> et forme un sous graphe avec *CYP1A1*.

**Messages clés :**

- L'exposition aux wPM semble principalement avoir un impact sur la réponse métabolique chez les cellules hAECb-B et très peu sur la réponse inflammatoire.
- Les deux fractions O-PM et Ne-PM semblent contribuer à la réponse métabolique observée suite aux expositions aux wPM.

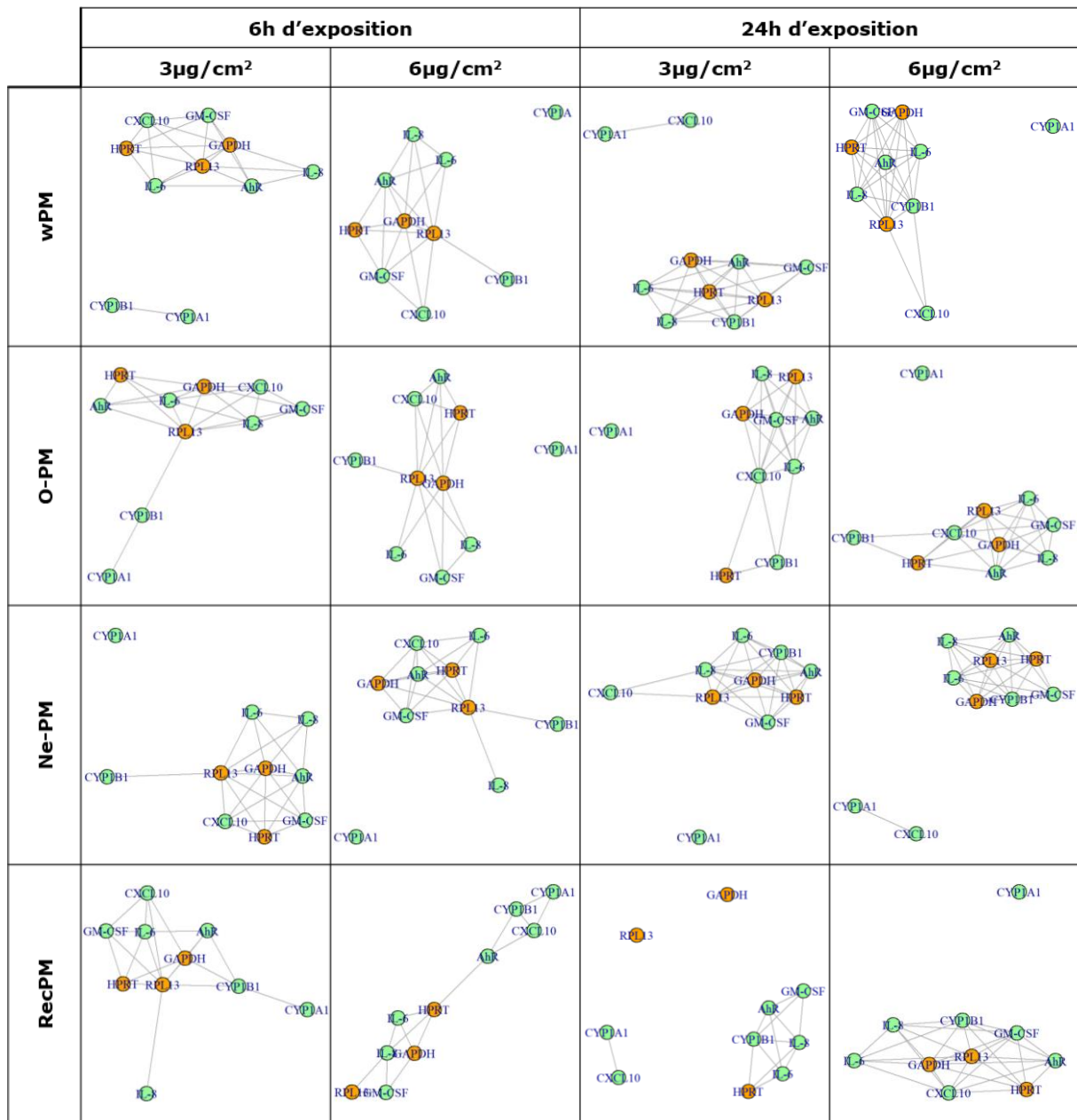


Figure 43 : Évaluation de la modulation de l'expression des gènes chez les hAECb-B suite à des expositions aux wPM, à O-PM, à NE-PM ou aux recPM à des concentrations de 3 ou 6 µg/cm<sup>2</sup> pendant 6 ou 24h. n ≥ 3 pour chacun des groupes étudiés.

#### IV.2.4. Conclusion

Une des forces de ce travail est d'avoir étudié l'impact des PM2.5-0.3 « totales » (wPM) et de leurs fractions chimiques associées (O-PM, Ne-PM et recPM) sur des cellules épithéliales bronchiques présentant différents statuts physiopathologiques (sain, asthme et BPCO).

Les résultats d'expression génique obtenus avec la méthode d'analyse classique et ceux obtenus avec la méthode d'analyse graphique par réseaux sont cohérents. La méthode d'analyse graphique

par réseaux présente comme avantage, par rapport à la méthode classique, d'avoir permis l'identification de co-régulations, entre les gènes du métabolisme *CYP1A1* et *CYP1B1* d'une part, et entre les gènes de l'inflammation *IL-6* et *IL-8* d'autre part, pour plusieurs des conditions testées.

Les résultats obtenus avec les deux méthodes d'analyse permettent de conclure que **les expositions aux wPM induisent une modulation de l'expression de gènes de l'inflammation et du métabolisme**, de manière temps- et dose-dépendante. Le croisement des résultats obtenus avec ces deux méthodes met en évidence que l'exposition aux wPM induit notamment une surexpression significative du gène de l'inflammation *CXCL10* et des gènes du métabolisme *CYP1A1* et *CYP1B1*.

Les résultats confirment **l'importance de prendre en compte la composition chimique des PM<sub>2.5-0.3</sub> dans l'évaluation de leur impact** au niveau des voies respiratoires humaines. La réponse inflammatoire apparaît être plus spécifiquement liée à la fraction Ne-PM, tandis que la réponse métabolique semble être induite par un effet synergique entre les fractions O-PM et Ne-PM.

Dans la suite de ces travaux, afin d'étudier la réversibilité potentielle des réponses inflammatoire et métabolique se mettant en place suite aux expositions aux wPM ou à leurs fractions associées (O-PM et Ne-PM), un protocole d'expositions répétées avec des périodes de « repos » entre deux expositions sera envisagé. De plus, afin de pouvoir explorer l'implication d'éventuels mécanismes épigénétiques dans la régulation de ces réponses cellulaires et moléculaires, la modulation de l'expression de gènes impliqués dans la méthylation de l'ADN sera évaluée, en plus de celle des gènes de l'inflammation et du métabolisme.

Par ailleurs, les résultats de cette deuxième étude **confirment l'importance du statut physiopathologique des cellules épithéliales bronchiques dans leur sensibilité aux PM<sub>2.5-0.3</sub>**. Les cellules hAECb-A se révèlent plus sensibles que les cellules hAECb-S, qui elles-mêmes sont plus sensibles que les cellules hAECb-B. Toutefois, un seul lot (un seul donneur) a été utilisé pour chacun des statuts physiopathologiques étudiés.

Dans la suite de ces travaux, les expérimentations seront réalisées en utilisant les cellules hAECb avec les statuts physiopathologiques qui se sont révélés être les plus sensibles à l'impact des PM<sub>2.5-0.3</sub>, à savoir les cellules hAECb-S et les cellules hAECb-A. Afin d'appréhender la variabilité interindividuelle au sein de ces statuts physiopathologiques, deux lots différents pour chacun des statuts étudiés seront envisagés.





### IV.3. Impact d'expositions répétées et alternées aux PM<sub>2.5-0.3</sub> d'influence industrie (wPM) et à leurs fractions chimiques associées (O-PM et Ne-PM) sur les mécanismes cellulaires et moléculaires de cellules épithéliales bronchiques humaines saines ou pathologiques (asthme)

Cette troisième étude a fait l'objet d'une **communication affichée** lors d'un congrès international :

Despréaux P, Verdin A, Desaulle D, Momas I, Achard S. *Impact of the physical and chemical part of fine particles on human bronchial epithelial cells obtained from healthy and asthmatic donors*. Poster présenté au congrès EUROTOX 2023, Ljubljana (Slovénie), Septembre 2023.

De plus, cette étude fera l'objet d'une **publication** sous forme d'un article original, actuellement en cours de rédaction.



### IV.3.1. Contexte et objectif

Lors de la deuxième étude, il a été observé que des expositions uniques de 6 ou 24 heures aux PM<sub>2.5-0.3</sub> induisaient des réponses inflammatoire et métabolique, dépendant à la fois des fractions chimiques constitutives des PM<sub>2.5-0.3</sub> et du statut physiopathologique des cellules épithéliales bronchiques.

Cette troisième partie de mon travail de thèse a pour objectif de rechercher un éventuel effet « mémoire » des cellules épithéliales bronchiques hAECb-S et hAECb-A, en alternant des phases d'exposition et des phases de repos, à 24 heures d'intervalle.

### IV.3.2. Matériel et Méthodes

#### IV.3.2.1. Choix du modèle *in vitro*

Afin de considérer la variabilité interindividuelle pour un même statut physiopathologique, deux lots ont été envisagés pour chacun des statuts « sain » hAECb-S et « asthme » hAECb-A. Les caractéristiques des différents lots de cellules utilisées sont résumées dans le Tableau XIII.

Tableau XIII : Informations sur les cellules épithéliales humaines d'origine bronchique (hAECb) et caractéristiques des donneurs. Les certificats d'analyse ont été fournis par Epithelix®.

	Cellules épithéliales humaines d'origine bronchique			
	Sain		Asthme	
<b>Fournisseur</b>	Epithelix®			
<b>Nom du produit</b>	hAEC			
<b>Numéro de lot</b>	02AB0793.01	02AB072001B	AB0062	02AB066501
<b>Information sur les donneurs</b>				
<b>Age</b>	62	41	36	55
<b>Sexe</b>	Homme	Homme	Homme	Femme
<b>Origines</b>	Hispanique	Caucasien	Inconnu	Caucasien
<b>Fumeur</b>	Non	Non	Non	Non
<b>Pathologies</b>	Absence de pathologie respiratoire	Absence de pathologie respiratoire	Asthme	Asthme
<b>Information sur les cellules</b>				
<b>Type cellulaire</b>	Cellules épithéliales humaines d'origine bronchique			
<b>Date de cryoconservation</b>	11/2018	03/2017	09/2008	09/2015
<b>Contrôle qualité</b>				
<b>Stérilité</b>	Oui	Oui	Oui	Oui
<b>Mycoplasma</b>	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
<b>Viabilité</b>	>80%	>80%	>80%	>80%
<b>Détection de virus (HIV; Hépatites)</b>	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif

### IV.3.2.2. Protocole d'exposition

72h après ensemencement, les cellules hAECb ont été exposées aux wPM ainsi qu'aux fractions O-PM et Ne-PM à la concentration de 3 µg/cm<sup>2</sup> selon le protocole présenté sur la Figure 44.

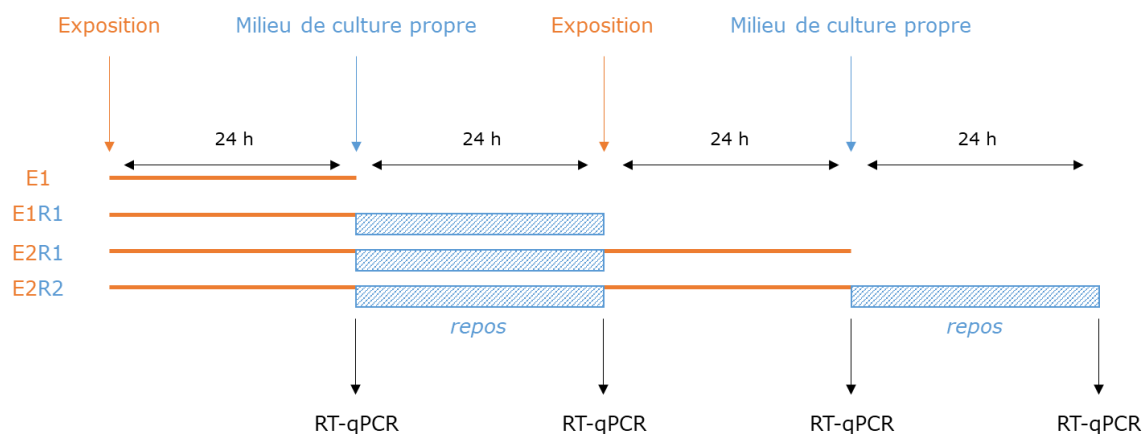


Figure 44 : Protocole d'exposition des cellules hAECb aux wPM ou à leurs fractions associées

Pour les expositions, les wPM ou les fractions O-PM ou Ne-PM ont été déposées sur la partie apicale des cellules après retrait du milieu comme cela a été présenté dans le paragraphe III.2.2.3 (page 99).

24 heures après la première exposition (E1), le milieu contenant les différentes fractions a été remplacé par du milieu de culture sans particules, permettant une phase de repos des cellules (E1R1). Puis, après cette phase de repos, les cellules ont été à nouveau exposées pendant 24 heures (E2R1), et mise de nouveau en phase de repos (E2R2). Un groupe contrôle, composé de cellules non exposées (Cont), a été envisagé simultanément.

### IV.3.2.3. Évaluation de l'activité biologique

À la fin de chaque période de 24h et après retrait du milieu en partie apicale, des cellules exposées et non exposées (Cont) ont été rapidement congelées à -80°C pour une extraction ultérieure de l'ARN afin d'évaluer l'expression de gènes cibles par RT-qPCR. Pour chaque condition expérimentale et chaque lot de hAECb, les expériences ont été menées avec un minimum de trois répétitions et les scénarios d'exposition (E1, E1R1, E2R1 et E2R2) ont été répétés dans deux ou trois expérimentations indépendantes.

Pour l'évaluation de la modulation des gènes, trois gènes de référence (*HPRT*, *GAPDH* et *RPL13*) ont été utilisés, et les deux méthodes d'analyse statistique présentées précédemment ont été envisagées.

À l'aide des deux méthodes, des comparaisons ont été réalisées pour étudier :

- la différence d'expression génique à l'état basal, c'est-à-dire en l'absence d'exposition, entre les deux statuts physiopathologiques (sain et asthme) ;
- l'impact des expositions aux wPM ou à leurs fractions associées, sur la modulation de l'expression génique pour un même lot de donneur.

La méthode d'analyse par réseaux permettra de déterminer les gènes différentiellement exprimés et la méthode classique présentée sous forme de heatmaps, permettra de déterminer le sens de la modulation de l'expression des gènes (sur ou sous-expression).

### IV.3.3. Résultats

#### IV.3.3.1. Comparaison de l'expression génique à l'état basal des cellules hAECb-S et des cellules hAECb-A

Afin de comparer l'expression génique à l'état basal, c'est-à-dire en absence d'exposition, des cellules hAECb de statut physiopathologique différent, l'expression génique des cellules hAECb-A « Cont » a été comparée à celle des cellules hAECb-S « Cont ».

Pour cette analyse, les données des expressions géniques des deux lots appartenant à un même statut physiopathologique ont été regroupés. Les résultats obtenus sont présentés sur la Figure 45.

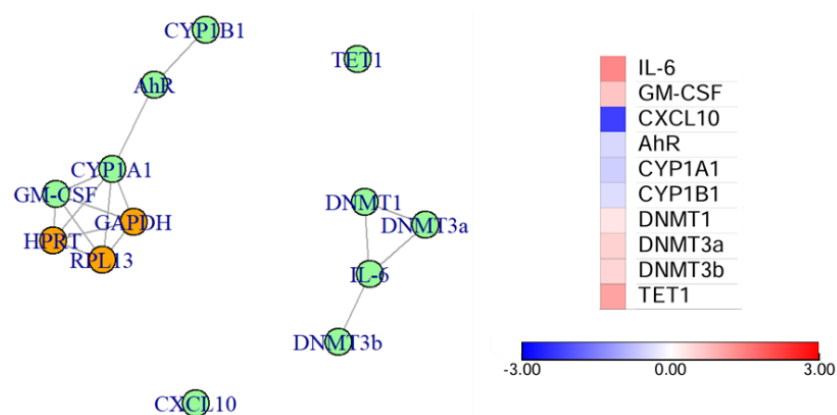


Figure 45 : Comparaison des expressions géniques à l'état basal des cellules hAECb-A Cont par rapport aux cellules hAECb-S Cont.  $n \geq 8$  pour chacun des groupes étudiés.

Il convient de noter que les trois gènes de référence (*HPRT*, *GAPDH* et *RPL13*) se trouvent dans le graphe principal. Cette observation permet de les valider pour la comparaison des deux statuts étudiés, leur expression demeurant stable quel que soit le statut physiopathologique.

La comparaison de l'expression génique basale des cellules hAECb-A par rapport à celles des cellules hAECb-S révèle que six des gènes étudiés sont différentiellement exprimés en fonction du statut physiopathologique. Le gène de l'inflammation *CXCL10* et le gène impliqué dans l'hydroxyméthylation de l'ADN, *TET1*, ne sont connectés à aucun autre gène. Le gène de l'inflammation *IL-6* et trois gènes impliqués dans la méthylation de l'ADN, *DNMT1*, *DNMT3a* et *DNMT3b* forment un sous-graphe connexe se détachant du graphe principal contenant les trois gènes de référence, suggérant une co-régulation de ces quatre gènes. Enfin, deux gènes du métabolisme *AbR* et *CYP1B1* sont en limite de séparation.

La méthode d'analyse classique, dont les résultats ont été normalisés sur la moyenne géométrique des trois gènes de référence, confirme une forte modulation de l'expression des gènes *CXCL10* (sous-expression) et *TET1* (surexpression), ainsi qu'une surexpression des gènes *IL-6*, *DNMT1*, *DNMT3a* et *DNMT3b* pour les cellules hAECb-A par rapport aux cellules hAECb-S. Nous pouvons également remarquer que les autres gènes, se trouvant dans le graphe principal avec la méthode par réseaux, apparaissent soit surexprimés (*AbR*, *CYP1B1*, *CYP1A1*) soit, sous-exprimés (*GM-CSF*) avec la méthode classique.

#### IV.3.3.2. Évaluation de l'impact des wPM et de leurs fractions associées (O-PM, Ne-PM) sur les réponses inflammatoire, métabolique et épigénétique

##### IV.3.3.2.1. Modulation de l'expression génique après expositions des cellules hAECb-S

Les résultats pour les cellules hAECb-S des lots 1 (hAECb-S1) et 2 (hAECb-S2) sont représentés sur les Figures 46 et 47, respectivement.

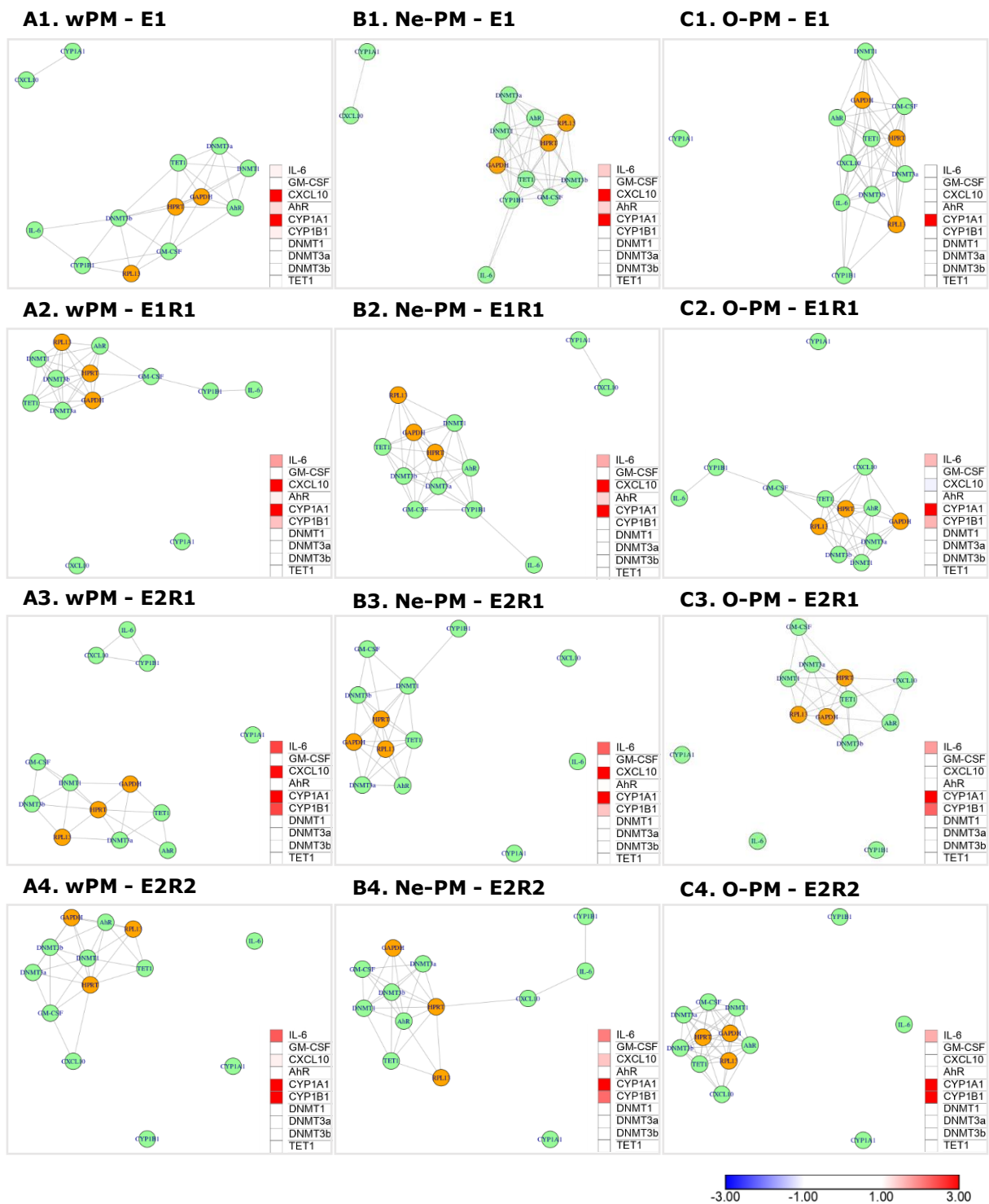


Figure 46 : Évaluation de la modulation de l'expression des gènes suite à des expositions de cellules hAECb-S1 **A.** aux wPM, **B.** à Ne-PM ou **C.** à O-PM **1.** après une première exposition de 24h heures **2.** après une exposition de 24 heures suivie d'une période de 24 heures de repos (E1R1) **3.** après une seconde exposition de 24h heures **4.** après une seconde exposition de 24 heures suivie d'une période de 24 heures de repos (E2R2).  $n \geq 3$  pour chacun des groupes étudiés.



**Pour les cellules hAECb-S1**, la méthode d'analyse graphique par réseaux indique qu'après 24 heures d'exposition (E1) aux wPM (Figure 46 A1) ou à la fraction Ne-PM (Figure 46 B1), une modulation significative de l'expression des gènes *CYP1A1* et *CXCL10* est observée, alors que seule l'expression du gène *CYP1A1* est significativement modulée après exposition à la fraction O-PM (Figure 46 C1). Ces modulations persistent après 24 heures de repos (E1R1) (Figure 46 A2, B2, C2).

Après une seconde exposition (E2R1) aux wPM (Figure 46 A3), les gènes *CYP1A1*, *CYP1B1*, *IL-6* et *CXCL10* sont totalement disjoints du graphe principal. Les trois gènes *CYP1B1*, *IL-6* et *CXCL10* forment un sous-graphe connexe, indiquant leur co-régulation. Les expressions des gènes *CYP1A1*, *IL-6* et *CXCL10* sont significativement modulées après exposition à la fraction Ne-PM (Figure 46 B3) et les expressions des gènes *CYP1A1*, *CYP1B1* et *IL-6* sont significativement modulées après exposition à la fraction O-PM (Figure 46 C3).

Suite à la dernière période de repos (E2R2), l'expression de certains gènes reste significativement modulée : *CYP1A1*, *CYP1B1* et *IL-6* pour les cellules exposées aux wPM (Figure 46 A4) ou à la fraction O-PM (Figure 46 C4) et *CYP1A1* pour les cellules exposées à la fraction Ne-PM (Figure 46 B4).

La méthode d'analyse classique permet de conclure que l'ensemble des gènes significativement modulés par les expositions aux wPM ou à leurs fractions chimiques associées sont significativement surexprimés par rapport à la condition Cont.

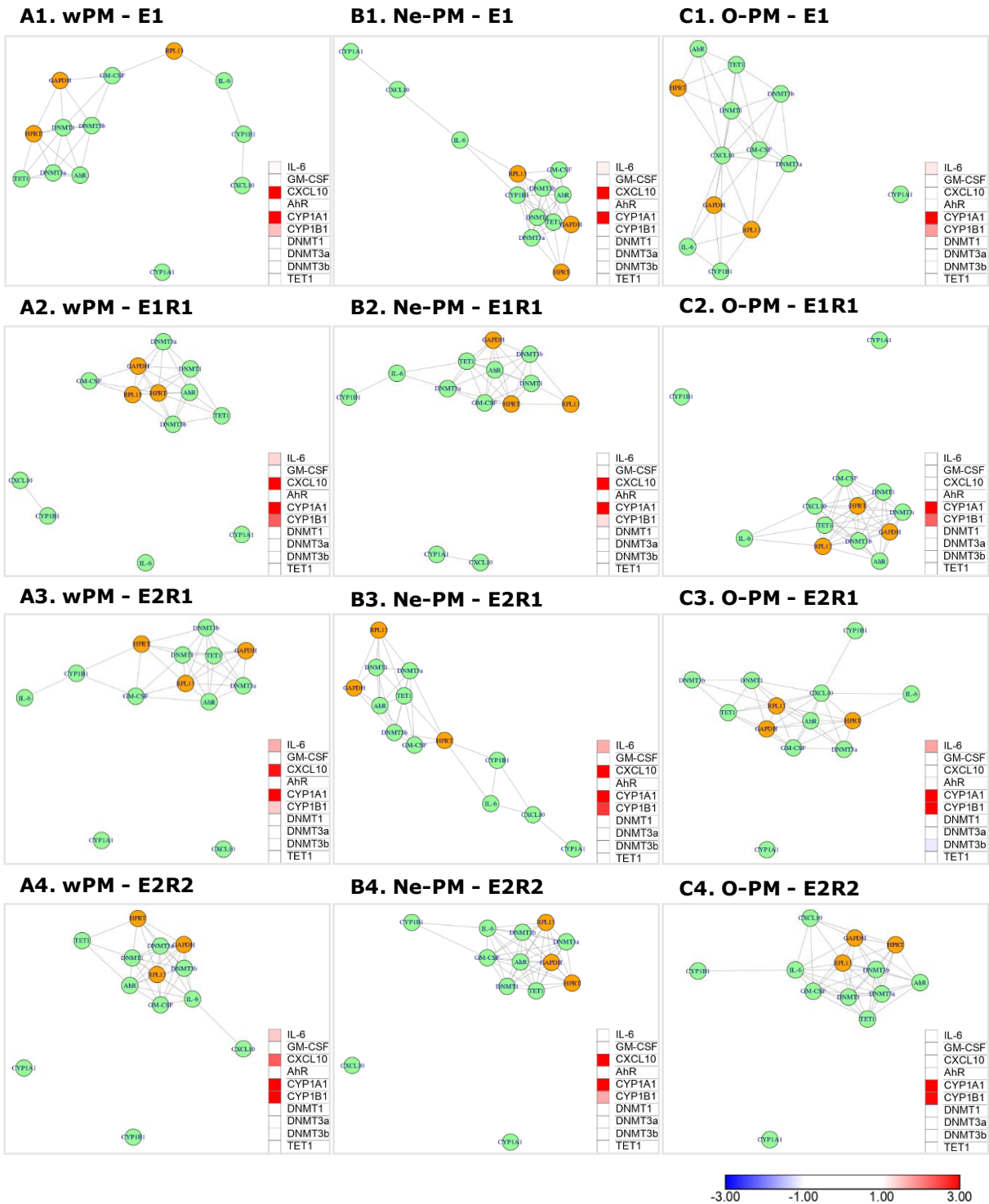


Figure 47 : Évaluation de la modulation de l'expression des gènes suite à des expositions de cellules hAECb-S2 **A.** aux wPM, **B.** à Ne-PM ou **C.** à O-PM **1.** après une première exposition de 24h heures (**E1**) **2.** après une exposition de 24 heures suivie d'une période de 24 heures de repos (**E1R1**) **3.** après une seconde exposition de 24h heures (**E2R1**) **4.** après une seconde exposition de 24 heures suivie d'une période de 24 heures de repos (**E2R2**).  $n \geq 3$  pour chacun des groupes étudiés.

**Pour les cellules hAECb-S2**, la première exposition (E1) aux wPM (Figure 47 A1) ou à la fraction O-PM (Figure 47 C1) entraîne une modulation significative de l'expression du gène *CYP1A1*. De plus, les gènes *IL-6*, *CYP1B1* et *CXCL10* apparaissent en limite de séparation après exposition aux wPM. Aucune modulation significative n'est observée après exposition à Ne-PM (Figure 47 B1), bien que les gènes *CYP1A1* et *CXCL10* soient en limite de séparation.

Après la période de repos (E1R1), davantage de gènes ont une expression significativement modulée : *CYP1A1*, *CYP1B1*, *CXCL10* et *IL-6* pour la série wPM (Figure 47 A2), *CYP1A1* et *CXCL10* pour la série Ne-PM (Figure 47 B2), et *CYP1A1* et *CYP1B1* pour la série O-PM (Figure 47 C2).

Après la seconde exposition (E2R1) aux wPM (Figure 47 A3) ou à la fraction O-PM (Figure 47 C3), l'expression du gène *CYP1A1* reste significativement modulée, tout comme celle du gène *CXCL10* suite à l'exposition aux wPM. Cependant, aucune modulation significative n'est observée après exposition à la fraction Ne-PM, bien que *CYP1A1* soit en limite de séparation (Figure 47 B3).

Après la seconde période de repos (E2R2), les expressions des gènes *CYP1A1* et *CYP1B1* sont significativement modulées alors que *CXCL10* apparaît en limite de séparation pour la série wPM (Figure 47 A4), alors que pour la fraction Ne-PM (Figure 47 B4), les expressions des gènes *CYP1A1* et *CXCL10* sont de nouveau significativement modulées comme après la première exposition (E1). Quant aux cellules exposées à la fraction O-PM (Figure 47 C4) l'expression de *CYP1A1* est significativement modulée et *CYP1B1* apparaît en limite de séparation.

Comme pour les cellules hAECb-S1, la méthode d'analyse classique permet de conclure que l'ensemble des gènes significativement modulés par les expositions aux wPM ou à leurs fractions chimiques associées sont significativement surexprimés par rapport à la condition Cont.

#### IV.3.3.2.2. Modulation de l'exposition génique après expositions des cellules hAECb-A

Les résultats pour les cellules hAECb-A des lot 1 (hAECb-A1) et 2 (hAECb-A2) sont représentés sur les Figures 48 et 49, respectivement.

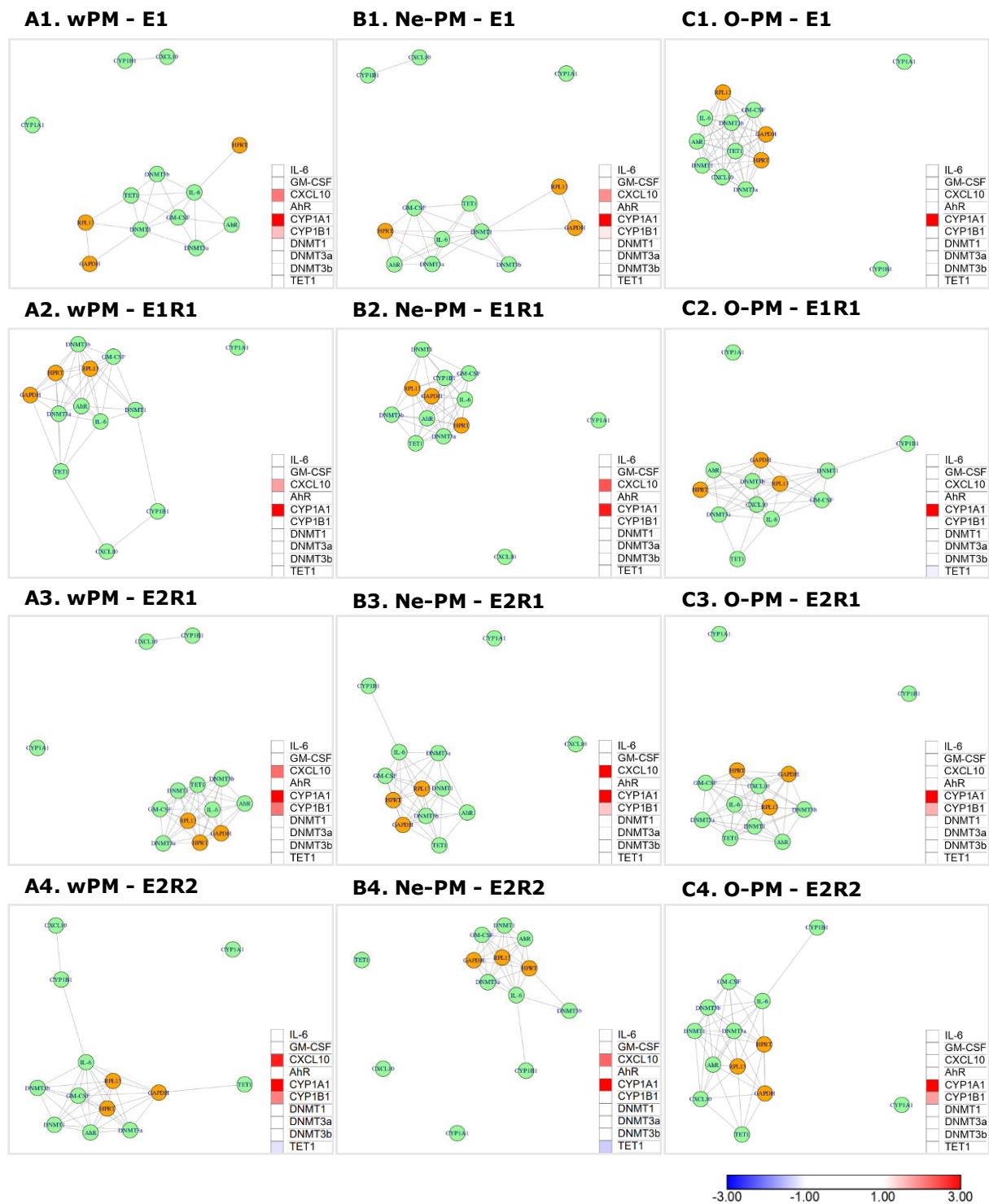


Figure 48 : Évaluation de la modulation de l'expression des gènes suite à des expositions de cellules hAECb-A1 **A.** aux wPM, **B.** à Ne-PM ou **C.** à O-PM **1.** après une première exposition de 24h heures (**E1**) **2.** après une exposition de 24 heures suivie d'une période de 24 heures de repos (**E1R1**) **3.** après une seconde exposition de 24h heures (**E2R1**) **4.** après une seconde exposition de 24 heures suivie d'une période de 24 heures de repos (**E2R2**).  $n \geq 3$  pour chacun des groupes étudiés.

**Pour les cellules hAECb-A1**, la méthode d'analyse graphique par réseaux indique que la première exposition (E1) aux wPM ou à la fraction Ne-PM induit une modulation significative de l'expression des gènes *CYP1A1*, *CYP1B1* et *CXCL10*. Les gènes *CYP1B1* et *CXCL10* sont co-régulés (Figure 48 A1, B1). Les expressions des gènes *CYP1A1* et *CYP1B1* sont également significativement modulées après la première exposition à la fraction O-PM (Figure 48 C1).

Après la première période de repos (E1R1), seule l'expression du gène *CYP1A1* reste significativement modulée pour les séries wPM et O-PM, avec respectivement *CYP1B1* et *CXCL10*, et *CYP1B1* en limite de séparation (Figure 48 A2, C2). Pour la série Ne-PM, l'expression des gènes *CYP1A1* et *CXCL10* restent significativement modulée (Figure 48 B2).

Après la seconde exposition (E2R1) les résultats sont semblables à ceux obtenus après la première exposition pour les trois conditions testées. Pour la condition wPM, les expressions des gènes *CYP1A1*, *CYP1B1* et *CXCL10* sont significativement modulées avec une co-régulation entre *CYP1B1* et *CXCL10* (Figure 48 A3). Les expressions des gènes *CYP1A1* et *CXCL10* sont significativement modulées et *CYP1B1* apparaît en limite de séparation après exposition à la fraction Ne-PM (Figure 48 B3) et les expressions des gènes *CYP1A1* et *CYP1B1* sont significativement modulées après exposition à la fraction O-PM (Figure 48 C3).

Après la seconde période de repos (E2R2), les expressions des gènes *CYP1A1*, *CYP1B1* et *CXCL10* restent significativement modulées, ou en limite de séparation, à l'exception de *CXCL10* pour la condition O-PM (Figure 48 C4). Le gène *TET1*, marqueur épigénétique, apparaît en limite de séparation pour la condition wPM (Figure 48 A4) et significativement modulé pour la condition Ne-PM (Figure 48 B4).

La méthode classique révèle que les gènes *CYP1A1*, *CYP1B1* et *CXCL10* sont surexprimés, tandis que le gène *TET1* est sous-exprimé suite aux expositions.

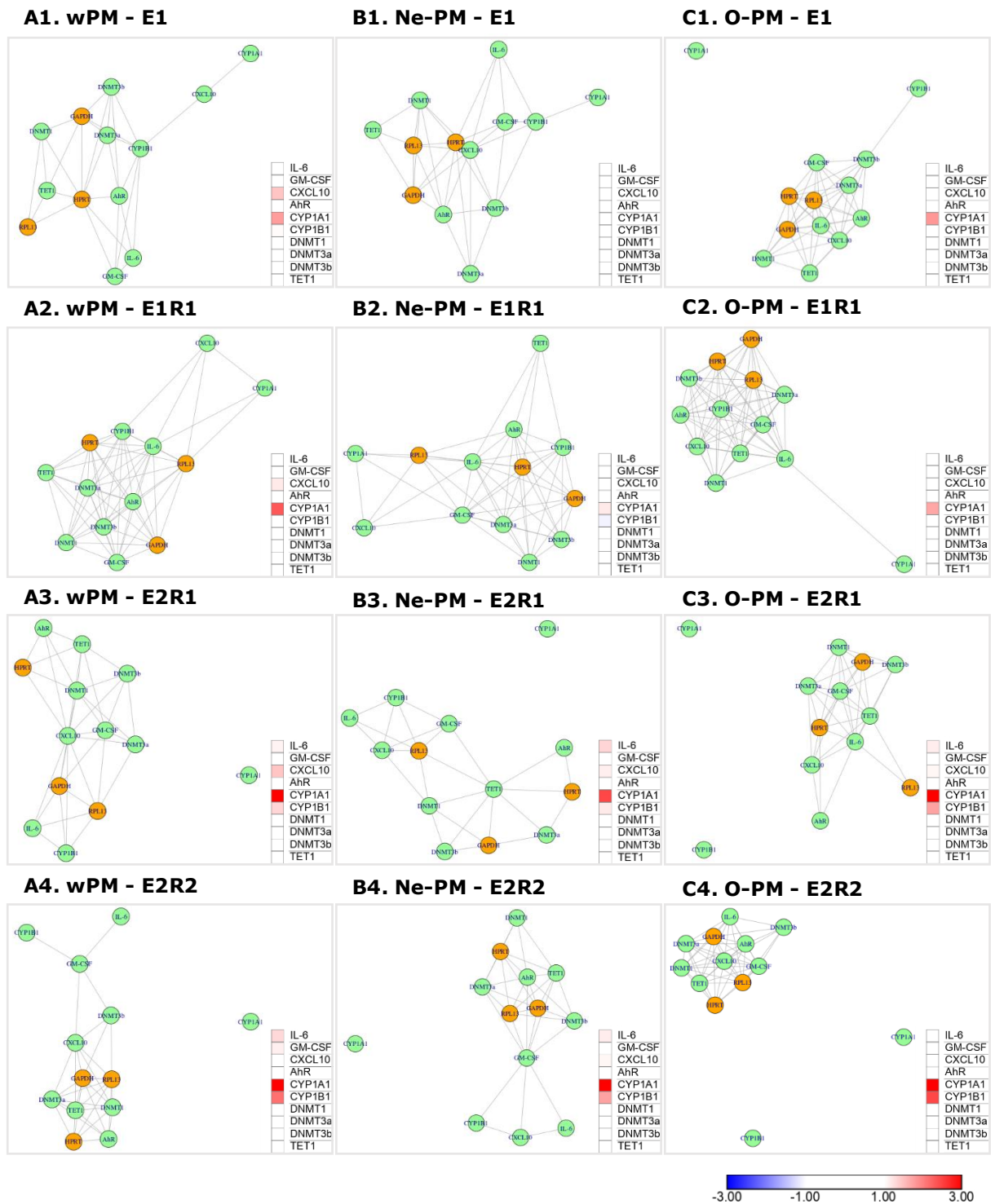


Figure 49 : Évaluation de la modulation de l'expression des gènes suite à des expositions de cellules hAECb-A2 **A.** aux wPM, **B.** à Ne-PM ou **C.** à O-PM **1.** après une première exposition de 24h heures (**E1**) **2.** après une exposition de 24 heures suivie d'une période de 24 heures de repos (**E1R1**) **3.** après une seconde exposition de 24h heures (**E2R1**) **4.** après une seconde exposition de 24 heures suivie d'une période de 24 heures de repos (**E2R2**).  $n \geq 3$  pour chacun des groupes étudiés.

**Pour les cellules hAECb-A2**, globalement les modulations d'expression génique sont moins importantes en comparaison avec les cellules hAECb-A1.

Pour la condition wPM, alors que les gènes *CYP1A1* et *CXCL10* sont en limite de séparation après la première exposition (E1) et la première phase de repos (E1R1) (Figure 49 A1, B1), seul le gène *CYP1A1* finit par se détacher du graphe principal après la seconde exposition (E2R1) et phase de repos (E2R2) (Figures 49 C1, D1).

Concernant la condition d'exposition à la fraction Ne-PM, le gène *CYP1A1* se trouve en limite de séparation après la première exposition (E1) (Figure 49 B1) pour reprendre sa place dans le graphe principal après la première phase de repos (E1R1) (Figure 49 B2). Après la seconde exposition (E2R1) et phase de repos (E2R2), *CYP1A1* est significativement modulé (Figures 49 B3, B4).

Enfin, après l'alternance d'expositions à la fraction O-PM et de phases de repos, les expressions des deux gènes du métabolisme *CYP1A1* et *CYP1B1* apparaissent significativement modulées après la seconde exposition (E2R1) (Figure 49 C3) et phase de repos (E2R2) (Figure 49 C4). Après la première exposition (E1), *CYP1A1* apparaît détaché du graphe principal donc significativement modulé alors que *CYP1B1* est en limite de séparation (Figure 49 C1). La phase de repos qui suit (E1R1) ne révèle plus que *CYP1A1* en limite de séparation (Figure 49 C2).

La méthode d'analyse classique permet de conclure que les gènes *CYP1A1* et *CYP1B1* sont surexprimés suite aux expositions aux wPM ou à leurs fractions chimiques associées par rapport à la condition Cont.

**Messages clés :**

- L'exposition aux wPM induit une réponse inflammatoire et métabolique après exposition des cellules hAECb-S et hAECb-A
- Les fractions Ne-PM et O-PM contribuent à la réponse inflammatoire et métabolique :
  - La fraction O-PM exerce une influence plus marquée sur la réponse métabolique.
  - La fraction Ne-PM joue un rôle plus important dans la réponse inflammatoire.
- Globalement, les effets observés après les expositions persistent après les périodes de repos.
- Une variabilité interindividuelle est observée entre les deux lots d'un même statut physiopathologique, notamment pour les cellules hAECb-A, les cellules hAECb-A1 semblant plus sensibles aux expositions aux wPM et à leurs fractions associées que les cellules hAECb-A2.

#### IV.3.4. Discussion et conclusion

L'une des forces de cette étude réside dans l'exploration d'un éventuel **effet « mémoire »** au sein des cellules hAECb-S et hAECb-A en réponse à des alternances entre des expositions aux wPM ou à leurs fractions chimiques associées (O-PM et Ne-PM) et des périodes de repos. Cette étude a également pris en compte la **variabilité interindividuelle au sein d'un même statut physiopathologique**.

Après différentes périodes d'exposition et de repos, la modulation de l'expression génique a été analysée en utilisant deux méthodes d'analyse. Les résultats de l'analyse graphique par réseaux indiquent que les trois gènes de référence (*HPRT*, *GAPDH* et *RPL13*) se trouvent toujours dans le sous-graphe principal. Par conséquent, l'expression de ces trois gènes reste stable dans les conditions expérimentales testées dans cette étude, ce qui justifie l'utilisation de la moyenne géométrique de ces trois gènes de référence pour appliquer la méthode d'analyse classique. De plus, ce résultat suggère que, pour appliquer la méthode d'analyse graphique par réseaux, il est nécessaire d'inclure un nombre suffisant de gènes cibles pour former correctement les graphes, car dans la deuxième étude, où seuls 7 gènes cibles avaient été étudiés, les trois gènes de référence n'étaient pas toujours regroupés dans le même sous-graphe principal.

Les résultats de cette étude **confirment les résultats de la deuxième étude concernant le rôle des différentes fractions chimiques constitutives des PM<sub>2.5-0.3</sub>**. Les expositions aux wPM induisent des réponses inflammatoire et métabolique, avec la fraction Ne-PM influençant davantage la réponse inflammatoire, tandis que la fraction O-PM a un impact plus marqué sur la réponse métabolique.

La **réversibilité des effets** induits suite aux expositions aux wPM et à leurs fractions chimiques associées et l'**effet « mémoire »** des cellules est très peu documenté dans la littérature. Les résultats de notre étude indiquent que les réponses inflammatoire et métabolique persistent après les périodes de repos. Ces résultats sont en accord avec ceux d'une étude *in vivo* récente (Barbier et al., 2023) dans laquelle les auteurs ont démontré que la réponse inflammatoire induite par des expositions aux PM<sub>2.5</sub> persiste même après une période de 12 semaines de repos chez la souris. De plus, nos résultats montrent qu'après une seconde exposition, les cellules présentent une réponse biologique plus marquée que lors de la première exposition, ce qui suggère un effet « mémoire ». Ce résultat corrobore les résultats d'une autre étude *in vivo* faite sur le rat (Ren et al., 2020) dans laquelle une deuxième exposition aux PM<sub>2.5</sub>, mise en place après une période de repos de 30 jours, a entraîné une réponse inflammatoire exacerbée par rapport à celle observée suite à la première exposition.



Afin d'étudier l'implication éventuelle de **modifications épigénétiques** dans la régulation des réponses cellulaires et moléculaires, la modulation de l'expression de gènes impliqués dans la méthylation de l'ADN, *DNMT1*, *DNMT3a*, *DNMT3b* et *TET1* a été étudiée. Cependant, suite aux expositions, l'expression de ces gènes était très peu modulée, à l'exception de *TET1*, dont l'expression était significativement sous-exprimée lorsque les cellules hAECb-A1 ont été exposées à la fraction Ne-PM (condition E2R2), et se trouve être en limite de séparation lorsqu'elles ont été exposées à la fraction wPM (condition E2R2).

Des études récentes démontrent que les expositions aux PM<sub>2.5</sub> sont associées à une hypométhylation globale de l'ADN avec une hyperméthylation ciblée de certains sites spécifiques (S. K. Huang et al., 2021; Leclercq et al., 2017). Huang et collaborateurs ont observé, comme dans notre étude, une absence de modulation de l'expression des gènes *DNMTs* suite aux expositions des cellules BEAS-2B aux PM<sub>2.5</sub>. Ils ont également montré qu'une exposition unique de 24 heures aux PM<sub>2.5</sub> à des concentrations de 1 ou 30 µg/cm<sup>2</sup> induisait une sous-expression significative des gènes *TETs* (*TET1*, *TET2* et *TET3*), tandis qu'une exposition répétée à la concentration de 1 µg/cm<sup>2</sup> pendant 7 jours entraînait une augmentation significative de l'expression de ces gènes. Cette augmentation de l'expression des gènes *TETs* est cohérente avec l'observation que les PM<sub>2.5</sub> induisent une hypométhylation globale de l'ADN, car les enzymes *TETs* sont connues pour participer à la déméthylation de l'ADN. Les mécanismes régulant les modifications du niveau de méthylation de l'ADN semblent donc dynamiques et complexes et nécessitent des études plus approfondies pour les comprendre.

Enfin, notre étude met en évidence **une variabilité interindividuelle entre les donneurs d'un même statut**. La différence entre les lots semble être plus marquée pour les cellules hAECb-A que les cellules hAECb-S. Cela pourrait s'expliquer par l'hétérogénéité de l'asthme, caractérisée par des endotypes et des phénotypes variables d'un patient à l'autre (Kuruvilla et al., 2019; Moore & Bleeker, 2014). Des études épidémiologiques récentes suggèrent, en effet, que l'impact de la pollution atmosphérique, y compris des PM<sub>2.5</sub>, peut varier en fonction du type d'asthme et de sa sévérité (Fang et al., 2021; Pekince & Baccioglu, 2022; Rosenquist et al., 2020). Malheureusement, nous ne disposons pas d'informations sur le type d'asthme des patients, sa sévérité, les traitements éventuels, etc. Ces informations sur l'histoire des patients seraient nécessaires pour mieux comprendre la vulnérabilité des personnes asthmatiques. Néanmoins, ces résultats soulignent l'importance de prendre en compte cette variabilité interindividuelle pour mieux comprendre l'impact des PM<sub>2.5-0.3</sub>, en particulier pour une maladie aussi hétérogène que l'asthme.

## V. Discussion générale

---



**L'originalité de ce travail** a reposé sur :

- l'utilisation de modèles *in vitro* permettant d'**étudier la vulnérabilité individuelle** au travers des cellules épithéliales bronchiques de statut physiopathologique différent ;
- **l'étude de la chimie des PM<sub>2.5-0.3</sub>** en considérant, tout d'abord, deux sources d'émission, industrie et trafic, puis, pour une même source, deux fractions chimiques composant les particules,
- la mise en application d'une **méthode d'analyse statistique originale** afin d'évaluer la modulation de l'expression génique des cellules après exposition, en tenant compte de leur statut physiopathologique et de la composition chimique des particules.

La mise en œuvre de ces trois démarches conjointement est innovante car peu, voire pas, documentée dans la littérature.

## V.1. Forces et faiblesses

### V.1.1. Modèles *in vitro*

Dans ce travail de thèse, deux modèles *in vitro* complémentaires ont été utilisés : un modèle d'épithélium humain reconstruit d'origine bronchique (première étude) et un modèle de cellules épithéliales pseudo-primaires bronchiques d'origine humaine (deuxième et troisième études). Ces deux modèles permettent de répondre, en accord avec le principe des 3R (Russell & Burch, 1959), aux exigences éthiques actuelles qui visent à diminuer les expérimentations animales au profit du développement de méthodes alternatives.

Les deux modèles, issus de cellules primaires humaines, présentent l'avantage d'avoir une activité biologique proche de celle de l'épithélium bronchique *in situ*, notamment métabolique et inflammatoire. De plus, ces modèles permettent d'étudier et de comparer les réponses cellulaires et moléculaires mises en place suite à une exposition, en fonction du statut physiopathologique du donneur (Hiemstra et al., 2018).

L'épithélium humain reconstruit est très certainement le modèle cellulaire *in vitro* le plus abouti aujourd'hui, en dehors des organoïdes. Il reproduit la structure de l'épithélium bronchique *in situ* par la présence de cellules basales, ciliées et caliciformes (sécrétrices de mucus), reproduisant la clairance mucociliaire et garantissant la formation de jonctions serrées ainsi que le transport ionique (Baxter et al., 2015). Le modèle MucilAir™ utilisé dans ces travaux est mis en co-culture avec des fibroblastes humains (MucilAir-HF™) afin d'assurer un bon maintien de l'épithélium sur son support (membrane de l'insert). La force de ce modèle est de pouvoir être maintenu en culture à

l'interface air-liquide pendant plusieurs mois sans altération de son homéostasie tissulaire, permettant ainsi de réaliser des expositions à l'interface air-liquide sur une période prolongée pour étudier la chronicité ou le cumul des expositions (Baxter et al., 2015; Cervena et al., 2019; Kooter et al., 2016; Kuper et al., 2015; Zavala et al., 2016).

Cependant, une variabilité importante est apparue lors des analyses statistiques entre les épithéliums reconstruits, en raison de l'étape de reconstruction, qui même si elle est réalisée avec les mêmes lots de cellules primaires, conduit très certainement à des réarrangements cellulaires que nous ne maîtrisons pas. Cette variabilité doit être prise en compte lors de l'analyse des résultats et impose l'utilisation d'un grand nombre d'échantillons, ce qui demande un budget important étant donné le coût de ce modèle.

Les cellules épithéliales, quant à elles, permettent d'effectuer des essais de façon plus autonome, en constituant, à partir d'un cryotube, notre propre banque de cellules. Elles offrent l'opportunité de réaliser davantage de manipulations et, grâce à leur stabilité phénotypique le temps des expérimentations, présentent une plus grande reproductibilité, augmentant ainsi la puissance des analyses statistiques. De plus, elles donnent la possibilité de conduire des essais à partir de différents donneurs pour un même statut physiopathologique et ainsi, d'étudier la variabilité interindividuelle. Ce modèle est également moins onéreux, ce qui constitue un autre atout.

Toutefois, les cellules épithéliales sont des modèles monocellulaires et monocouches ne sécrétant ni mucus ni surfactant, ce qui limite leur durée d'exposition à l'interface air-liquide. De plus, ces cellules ont une durée de vie courte, ce qui ne permet pas de faire des études sur le long terme.

### V.1.2. Particules fines et fractions chimiques associées

L'utilisation de PM<sub>2.5-0.3</sub> collectées sur des sites ATMO provenant de sources d'émission différentes, industrie ou trafic, et bien caractérisées sur le plan physico-chimique et morphologique par des équipes spécialisées, est une force de ce travail de thèse.

L'étude de l'impact des PM<sub>2.5-0.3</sub> dans leur entièreté, en fonction de leur source d'émission et donc de leur composition chimique, ainsi que du rôle des différentes fractions chimiques les constituant, a contribué à améliorer les connaissances quant aux réponses cellulaires et moléculaires de l'épithélium bronchique suite à de telles expositions. En effet, nos résultats montrent que les particules issues de sources différentes conduisent à des réponses biologiques distinctes, notamment en termes d'intensité, en lien avec certains composés chimiques présents à leur surface.

Cependant, lors de la préparation des différentes fractions chimiques, il est possible que certains composés aient été perdus lors des étapes d'extraction successives, comme par exemple certains

éléments métalliques solubles pouvant intervenir dans le stress oxydant et l'inflammation (Guo et al., 2019; Pardo et al., 2015).

De plus, la quantité limitée des échantillons collectés n'a pas permis d'effectuer des expositions à l'interface air-liquide, et nous a contraint à mener des expositions en « semi air-liquide » par déposition d'un volume précis desdits échantillons. Cette méthode d'exposition offre toutefois l'avantage de contrôler les quantités mises en contact avec les cellules épithéliales.

Enfin, comme c'est le cas dans la majorité des études *in vitro*, les concentrations de PM<sub>2.5-0.3</sub> testées sont plus élevées que les concentrations réelles d'exposition. Il convient cependant de noter que les concentrations utilisées pour les expositions des cellules épithéliales, sont parmi les plus faibles rapportées dans la littérature (Badran et al., 2020; Boublil et al., 2013; Gualtieri et al., 2010; Leclercq et al., 2016; Longhin, Holme, et al., 2013). En revanche, pour les expérimentations menées avec les épithéliums reconstruits, les concentrations d'exposition sont plus élevées que celles envisagées lors des essais sur cellules. En effet, piégées dans le mucus, une grande quantité de particules est déplacée vers le contour de l'insert et y reste jusqu'au moment où la partie apicale est lavée (Kuper et al., 2015). Certains auteurs mettent en avant la plus grande résistance des épithéliums aux polluants, qu'ils attribuent à la présence d'une couche de mucus et de jonctions serrées fonctionnelles (Cervena et al., 2019; Zavala et al., 2016), justifiant l'utilisation de niveaux plus importants.

Il est important d'indiquer que la transposition des concentrations réelles d'exposition à un modèle d'exposition *in vitro* reste complexe car il faudrait pouvoir tenir compte, par exemple, de la vitesse de l'air inhalé, du mouvement brownien des particules au niveau bronchique et de la surface d'échange au niveau de l'appareil respiratoire.

### V.1.3. Marqueurs étudiés

L'évaluation de la modulation de l'expression d'un nombre important de gènes par RT-qPCR, suite aux expositions des épithéliums reconstruits aux PM<sub>2.5-0.3</sub>, est un point fort de ce travail de thèse. Cette approche a permis d'explorer différents mécanismes notamment, l'inflammation (9 gènes), le métabolisme (5 gènes), le stress oxydant (4 gènes), le remodelage tissulaire (2 gènes), la production de mucus (2 gènes), l'autophagie (1 gène) et les modifications épigénétiques (10 gènes). Les expressions de l'ensemble de ces gènes ont été évaluées dans la première étude, mais seules les expressions de 7 et 10 gènes ont été retenues pour la deuxième et la troisième études respectivement, en raison de contraintes de temps.

Les résultats obtenus sur l'ensemble des trois études proposées dans ce travail, mettent en évidence que l'exposition aux PM<sub>2.5-0.3</sub> induit principalement des modulations de l'expression de gènes de l'inflammation et du métabolisme.

La réponse métabolique observée est caractérisée par une surexpression significative des gènes *CYP1A1* et *CYP1B1*, deux gènes régulés par la voie de signalisation AhR (Vogel et al., 2020). Toutefois, nos résultats n'ont pas démontré d'augmentation de l'expression du gène du facteur de transcription *AhR* et ce, quels que soient le modèle utilisé, la durée et la concentration d'exposition. Cette absence de modulation de *AhR* n'est pas documentée dans la plupart des études expérimentales relevées dans la littérature (Badran et al., 2020; Kim et al., 2020; T. Wang et al., 2023), ce qui nous amène à envisager la possibilité d'une erreur dans la conception des amorces de ce gène.

#### V.1.4. Méthodes d'analyse de la modulation de l'expression des gènes

Pour évaluer la modulation de l'expression des gènes suite aux expositions aux PM<sub>2.5-0.3</sub> et à leurs fractions chimiques associées, la méthode d'analyse classique des  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  (Livak & Schmittgen, 2001) et la méthode d'analyse graphique par réseaux (Curis et al., 2019) ont été appliquées.

La méthode d'analyse graphique par réseaux, ayant pour principe de comparer l'expression de l'ensemble des gènes entre eux, présente de nombreux avantages par rapport à la méthode classique, qui sont :

- de permettre d'identifier des groupes de gènes ayant un comportement homogène ;
- de s'affranchir de variations inattendues dans la modulation de l'expression du ou des gène(s) de référence ;
- d'être utilisable dans n'importe quel contexte expérimental, et pas seulement dans les expériences à deux conditions ;
- d'offrir la possibilité de tenir compte de l'influence de plusieurs variables, telles que la concentration, la durée d'exposition, le type de particule, le statut physiopathologique, la reconstruction, etc. et d'explorer les interactions entre ces variables.

Toutefois la représentation sous forme de graphe par réseaux ne permet pas de déterminer le sens de la modulation de l'expression des gènes (sur ou sous-expression) ni leur niveau de modulation, ce que permet l'analyse classique des  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ .

## V.2. Apport en termes de connaissances et potentielles implications en termes de santé publique

Les résultats obtenus au cours de ces travaux de thèse ont permis de mettre en évidence **pour la première fois**, avec une approche *in vitro*, que l'**impact des PM<sub>2.5-0.3</sub> sur les réponses cellulaires et moléculaires** de cellules épithéliales bronchiques dépend à la fois :

- du **statut physiopathologique** du donneur ayant permis d'obtenir les cellules ;
- de la **source d'émission** des PM<sub>2.5-0.3</sub> et donc de leur **composition chimique** ;
- de la **nature de la fraction chimique** (organique, inorganique) composant les PM<sub>2.5-0.3</sub>.

### V.2.1. Impact des PM<sub>2.5-0.3</sub> selon le statut physiopathologique du donneur

Indépendamment du statut physiopathologique du donneur, l'exposition aux PM<sub>2.5-0.3</sub> induit des réponses inflammatoire et métabolique après exposition des cellules épithéliales bronchiques. Ces réponses sont plus prononcées pour les modèles « asthmatiques » que pour les modèles « sains », elles-mêmes plus importantes que pour le modèle « BPCO ».

Les résultats obtenus dans la troisième étude révèlent l'existence d'une variabilité entre les différents lots de cellules issues de donneurs asthmatiques. Cette variabilité est très certainement due à l'histoire des donneurs (type d'asthme, sévérité, traitements, etc.), informations dont nous ne disposons pas.

Les résultats des expérimentations menées sur nos deux modèles, épithéliums reconstruits et cellules, corroborent ceux obtenus avec des modèles *in vivo* et apportent une plausibilité biologique aux observations épidémiologiques, en renforçant l'idée selon laquelle les individus asthmatiques présentent une vulnérabilité accrue aux PM<sub>2.5</sub> par rapport aux individus sans pathologie respiratoire (Kikuchi et al., 2006; Yu et al., 2019, J. Luo et al., 2022).

Plusieurs mécanismes semblent expliquer la plus grande vulnérabilité des personnes asthmatiques aux effets des PM<sub>2.5</sub>. Tout d'abord, ces particules peuvent transporter des aéroallergènes à leur surface, pénétrant dans l'appareil respiratoire lors de l'inhalation et entrant en contact avec l'épithélium bronchique. En cas d'atopie, ce contact augmente la sensibilisation de l'épithélium et intensifie la réponse inflammatoire (Guarnieri & Balmes, 2014; Tiotiu et al., 2020). De plus, les individus asthmatiques présentent une augmentation du nombre de cellules productrices de mucus



et une diminution du nombre de cellules ciliées (Hiemstra et al., 2015), ce qui altère la fonction de clairance mucociliaire et prolonge la rétention des particules dans les voies respiratoires (Jesenak et al., 2023). Par ailleurs, des polymorphismes de certaines enzymes anti-oxydantes, et notamment des glutathion S-transférases, ont été observés chez les personnes asthmatiques, réduisant les capacités anti-oxydantes de leur épithélium bronchique. Il en résulte une augmentation du stress oxydant et par conséquent de l'inflammation, conduisant à un remodelage tissulaire et à une augmentation de la perméabilité membranaire aux polluants (Guarnieri & Balmes, 2014; Tiotiu et al., 2020).

Les cellules épithéliales bronchiques issues d'un donneur atteint de BPCO se sont révélées, quant à elles, moins sensibles aux expositions aux PM<sub>2.5-0.3</sub> que celles issues des donneurs sains ou asthmatiques. La littérature suggère généralement une vulnérabilité plus importante des individus atteints de BPCO aux PM<sub>2.5</sub> par rapport aux individus sans pathologie respiratoire (N. Li et al., 2022; Sotty et al., 2019; Yao et al., 2021). Nos résultats ne corroborent pas cette tendance et à ce jour, nous ne disposons d'aucune explication satisfaisante pour cette disparité, en dehors du statut tabagique du donneur. Cependant, il convient de noter qu'un seul donneur a été utilisé. Il est tout à fait envisageable qu'une étude sur des cellules provenant d'autres donneurs puisse mettre en évidence des réponses cellulaires et moléculaires différentes, comme cela a été observé lors de la troisième étude menée sur les cellules asthmatiques.

#### **Implications en termes de santé publique :**

##### 1) Mise en place de mesures par les autorités de santé

À côté des valeurs limite et valeur cible existantes, nos résultats plaident pour la mise en place d'un seuil d'information/recommandation pour les PM<sub>2.5</sub>, à destination des personnes les plus vulnérables, notamment les individus asthmatiques, appuyant la recommandation de l'Anses de créer un seuil spécifique pour les PM<sub>2.5</sub> (Anses, 2021), qui à l'heure actuelle n'existe pas.

##### 2) Actions de sensibilisation et d'éducation

Nos résultats soulignent la nécessité de sensibiliser les individus asthmatiques aux risques associés à l'exposition aux PM<sub>2.5</sub>, de manière similaire à ce qui est fait pour les PM<sub>10</sub>. De plus, il est nécessaire de renforcer les actions de communication (affiches en pharmacie, distribution de flyers, mise en place d'atelier, etc.) à des fins d'éducation des personnes les plus vulnérables sur les mesures à prendre en cas d'épisode de pollution particulière, l'objectif étant de :

- **réduire leur exposition :**
  - en privilégiant les sorties brèves et celles qui demandent le moins d'effort,

- en évitant les activités physiques et sportives intenses, notamment celles en plein air,
- en évitant les zones à forte activité industrielle ou avec un fort trafic routier.
- **gérer leurs symptômes** : en prenant conseil auprès
  - d'un professionnel de santé en cas de gêne respiratoire,
  - d'un médecin pour adapter le traitement si nécessaire.

Ces actions d'éducation et de prévention contribueraient à une meilleure gestion de l'asthme et à la prévention de crises graves.

## V.2.2. Impact des PM<sub>2.5-0.3</sub> selon leur chimie

Ces travaux de thèse démontrent un impact différentiel des PM<sub>2.5-0.3</sub> en lien avec leur source d'émission. Ces résultats sont en accord avec ceux récemment publiés par F. Dans notre étude, les PM<sub>2.5-0.3</sub> issues de source industrielle (PM<sub>Ind</sub>) apparaissent plus impactantes que celles issues de source urbaine à dominante trafic (PM<sub>Traf</sub>). Les PM<sub>2.5</sub> sont un mélange complexe de composés organiques et inorganiques, variant en fonction de leur source d'émission. La différence d'impact entre les PM<sub>Ind</sub> et les PM<sub>Traf</sub> est probablement liée aux HAP, composés organiques adsorbés à la surface des PM<sub>2.5-0.3</sub>. En effet, les PM<sub>Ind</sub>, 8 fois plus riches en HAP que les PM<sub>Traf</sub>, ont notamment induit une réponse métabolique plus importante.

Afin d'étudier plus finement le rôle des différentes fractions chimiques (organique et inorganique) des PM<sub>2.5-0.3</sub>, les deuxième et troisième études se sont intéressées à l'impact des PM<sub>Ind</sub> « totales » (wPM) et à deux fractions chimiques associées, la fraction organique extractible (O-PM) et la fraction non extractible (Ne-PM). Les HAP et les ions hydrosolubles sont retrouvés dans la fraction O-PM et les métaux et le carbone inorganique dans la fraction Ne-PM.

Une réponse métabolique plus importante a été observée suite aux expositions à la fraction O-PM par rapport aux expositions à la fraction Ne-PM. Ce résultat va dans le sens de l'induction des CYPs par les HAP présents dans la fraction O-PM. La réponse métabolique après exposition à la fraction Ne-PM est très probablement due à la présence de certains métaux, comme par exemple le cuivre et le plomb (Korashy & El-Kadi, 2005, 2006). De façon intéressante, la réponse métabolique était plus importante lorsque les deux fractions O-PM et Ne-PM étaient présentes dans le même échantillon, c'est-à-dire dans les particules « totales », wPM et les particules reconstituées, recPM. Il semble donc y avoir un effet synergique entre ces deux fractions sur la réponse métabolique. Cette observation souligne l'importance d'étudier les polluants en mélange.

L'augmentation de l'expression des gènes *CYP* entraîne une augmentation de la synthèse des enzymes associées intervenant dans les voies de biotransformation de nombreux xénobiotiques (polluants, médicaments, etc.), induisant ou non des métabolites toxiques (Abbas et al., 2019; M. Zhao et al., 2021). Ainsi, leur induction peut conduire à des effets collatéraux non négligeables pour la santé humaine et surtout non maîtrisés.

La réponse inflammatoire, quant à elle, est principalement associée à la fraction Ne-PM. Parmi les biomarqueurs de l'inflammation étudiés, le gène *CXCL10* est toujours significativement modulé suite aux expositions. Bien que le marqueur *CXCL10* ait été utilisé pour évaluer l'impact d'expositions à des agents biologiques, tels que les virus (Dissanayake et al., 2020; Yuan et al., 2022), sa recherche en tant que biomarqueur de l'inflammation en réponse aux polluants particulaires reste limitée. Il est intéressant de remarquer que, dans notre étude, le sens de la modulation de *CXCL10* diffère en fonction du modèle utilisé ; ce gène est sous-exprimé après exposition des épithéliums reconstruits et surexprimé après exposition des cellules épithéliales bronchiques. Les mécanismes sous-jacents à cette différence de réponse restent à élucider.

Pour expliquer cette différence dans la modulation de l'expression de *CXCL10*, nous proposons deux hypothèses. La première est schématisée sur la Figure 50 ci-dessous.

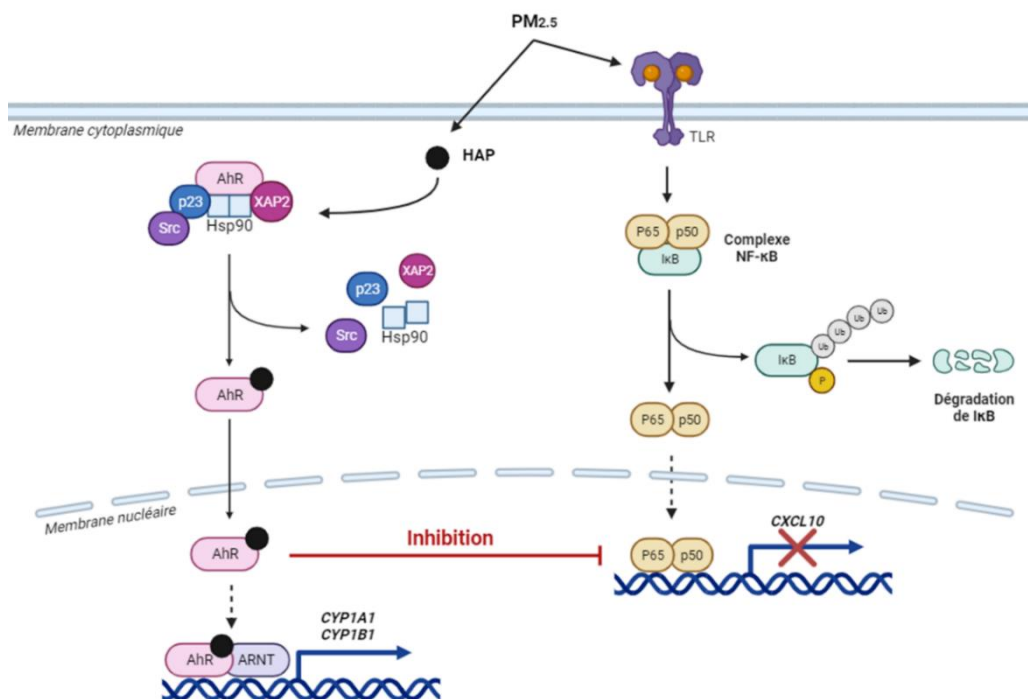


Figure 50 : Hypothèse du mécanisme pouvant se mettre en place suite aux expositions des épithéliums bronchiques reconstruits aux PM<sub>2.5-0.3</sub>, expliquant l'inhibition de l'expression de *CXCL10*

Lorsque les cellules épithéliales bronchiques sont exposées aux PM<sub>2.5-0.3</sub>, le facteur de transcription AhR est activé, comme en témoigne l'augmentation de l'expression des gènes *CYP1A1* et *CYP1B1*

(Alessandrini et al., 2022). En parallèle, un autre facteur de transcription, NF- $\kappa$ B, est également activé et se transloque dans le noyau de la cellule, où il se lie à des sites spécifiques du promoteur du gène *CXCL10*. Cette liaison permet le recrutement de la machinerie transcriptionnelle, conduisant à la synthèse de l'ARN messager correspondant au gène *CXCL10* (C. K. Wong et al., 2005) et donc à sa surexpression. Il est possible que lorsque les épithéliums reconstruits sont exposés, l'activation du facteur de transcription AhR entraîne à la fois une augmentation de l'expression des gènes *CYP1A1* et *CYP1B1*, et une inhibition de l'action du facteur de transcription NF- $\kappa$ B. En effet, il est décrit que le facteur de transcription AhR activé peut inhiber la sous-unité p65 du complexe NF- $\kappa$ B (Beischlag et al., 2008; Gutiérrez-Vázquez & Quintana, 2018; Øvrevik et al., 2014), et expliquer, au moins en partie, la diminution de l'expression de *CXCL10* (Figure 50).

La seconde hypothèse pourrait être que l'exposition des épithéliums reconstruits aux PM<sub>2.5-0.3</sub> entraîne une méthylation au niveau du promoteur de l'un des gènes correspondant à une sous-unité du facteur de transcription NF- $\kappa$ B (p50 ou p65). Cette méthylation spécifique de l'ADN obstruit les sites d'arrivée des complexes de transcription, empêchant la formation du complexe NF- $\kappa$ B et expliquant ainsi, en partie, la diminution de l'expression de *CXCL10*.

Ces divergences de réponses en fonction du modèle utilisé suggèrent que la différenciation et la polarisation des cellules épithéliales, propres aux épithéliums reconstruits, jouent un rôle clé dans la mise en place des réponses cellulaires et moléculaires suite à des expositions aux PM<sub>2.5-0.3</sub>. D'autre part, les fibroblastes en co-culture dans le modèle reconstruit pourraient contribuer à cette réponse différentielle. Les modèles d'épithéliums reconstruits, plus proches de la physiologie de l'épithélium *in situ*, permettent vraisemblablement une étude plus fidèle de ces réponses biologiques.

#### **Implications en termes de santé publique :**

Nos résultats plaident pour intégrer la composition chimique des PM<sub>2.5</sub> dans les programmes de surveillance de la qualité de l'air, afin de mieux évaluer les risques pour la santé.

Les sources d'émission varient en fonction de l'urbanisation, de l'industrialisation, de l'intensité du trafic routier, maritime ou aérien, des activités agricoles, etc. il serait pertinent de réaliser une cartographie détaillée des compositions chimiques des PM<sub>2.5</sub>, à partir de ces données de surveillance. Ces données croisées avec les données sanitaires permettraient d'établir par modélisation des relations dose-réponse en fonction de la composition chimique, actuellement inexistantes. Ce serait un préalable nécessaire à la proposition d'une évolution de la

réglementation des PM<sub>2.5</sub> vers la prise en compte à la fois de leur taille mais aussi de leur composition chimique.

En outre, ces données de surveillance pourraient être exploitées pour identifier les sources d'émission les plus préoccupantes d'un point de vue sanitaire. L'analyse des données d'émission ouvrirait la voie à l'instauration de réglementations ciblant des sources spécifiques de PM<sub>2.5</sub>. Cela pourrait inclure l'adoption de règlements plus stricts concernant les émissions des véhicules, le renforcement des contrôles de la pollution industrielle, ainsi que d'autres mesures visant à réduire la formation de PM<sub>2.5</sub>.

Par ailleurs, nos résultats soulignent l'importance d'étudier l'impact de mélanges de polluants plutôt que d'analyser les effets de chaque polluant pris individuellement, et ils justifient la mise en place de valeur toxicologique de référence (VTR) mélange, une orientation vers laquelle travaillent actuellement les experts de l'Anses (Anses, 2022). Les VTR mélange permettraient, par exemple, d'évaluer plus précisément les risques associés à l'exposition aux PM<sub>2.5</sub> en fonction de leurs sources d'émission, et donc de leur composition chimique.

## VI. Conclusion

---



À la convergence de plusieurs disciplines scientifiques (biologie, pharmacologie, toxicologie, épidémiologie, bio-informatique, etc.) le concept d'exposome s'est enrichi pour inclure les influences environnementales et les réponses biologiques associées.

Les données issues des expérimentations *in vitro*, associant « expositions et modèles cellulaires réalistes », c'est-à-dire au plus proche des conditions réelles d'exposition humaine, permettront demain de participer à ce grand défi de Santé publique, et c'est dans ce sens que ce travail de thèse apporte une contribution innovante.

Le développement d'un modèle intégrant un facteur de stress environnemental (PM<sub>2.5-0.3</sub> et leur chimie), des modèles *in vitro* issus de donneurs avec ou sans pathologie respiratoire, a permis de générer un nombre de données permettant l'application d'une méthode d'analyse graphique par réseaux faisant ressortir l'importance de certains marqueurs biologiques des réponses inflammatoire et métabolique, comme l'illustre la Figure 51.

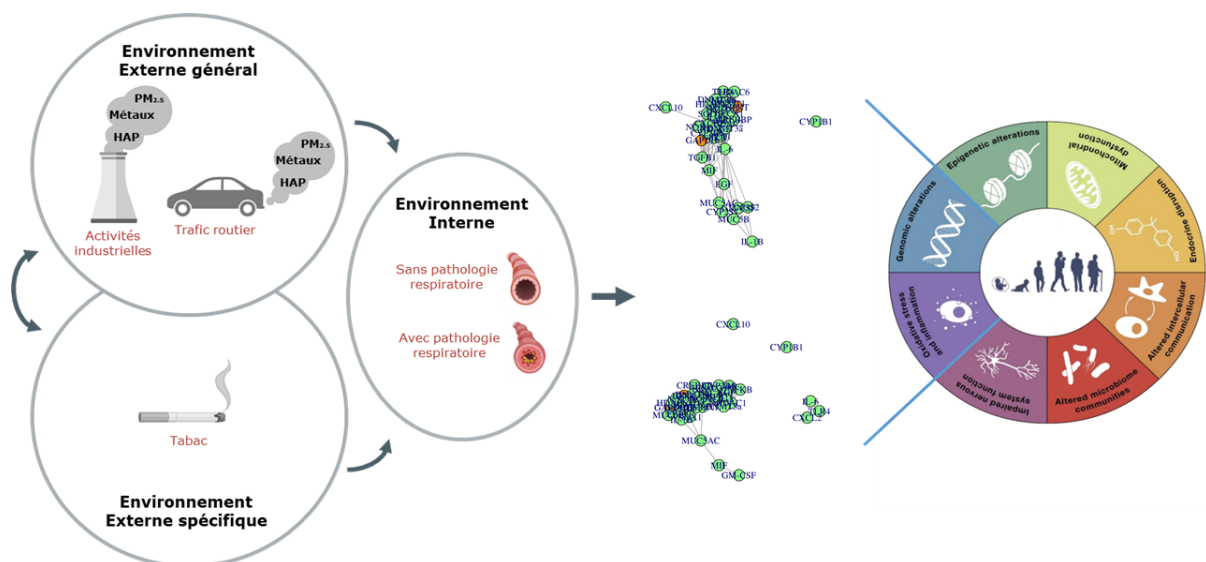


Figure 51 : Contribution de ces travaux de thèse à la connaissance de l'exposome. Importance de la chimie des PM<sub>2.5-0.3</sub> sur leur impact au niveau bronchique humain.

Cette démarche, dont les résultats sont très encourageants, est à poursuivre pour que demain, les méthodes alternatives trouvent leur place légitime dans la recherche sur l'exposome.





## VII. Perspectives de recherche

---



Ces travaux de thèse ouvrent de nombreuses perspectives de recherche.

**Dans un futur proche**, il serait intéressant de compléter les expérimentations entreprises au cours de ces travaux, et plus particulièrement en :

- envisageant d'autres donneurs ( $n=3$  *a minima*) pour chaque statut physiopathologique et dans l'ensemble des trois études, afin d'affiner l'analyse de la variabilité interindividuelle au sein d'un même statut ;
- collectant plus d'informations sur les donneurs, notamment des données relatives à l'histoire et à la sévérité de leur pathologie, les traitements médicaux en cours, ainsi que d'autres facteurs pouvant influencer les réponses cellulaires et moléculaires ;
- complétant, pour les deuxième et troisième études, l'analyse de la modulation de l'expression génique avec l'ensemble des gènes envisagés dans la première étude ;
- réalisant une validation protéique des résultats d'expression génique, afin de renforcer la fiabilité de nos données en confirmant que les modifications d'expression génique observées conduisent à des changements au niveau de la traduction des protéines ;
- poursuivant l'étude des modifications épigénétiques pour mieux comprendre les mécanismes de régulation des gènes se mettant en place suite aux expositions aux PM<sub>2.5-0.3</sub>, en analysant, par exemple, la méthylation globale ou spécifique de l'ADN ou encore l'expression de micro-ARN ;
- améliorant le modèle d'analyse graphique par réseaux, avec un code couleur pour indiquer si un gène est surexprimé ou sous-exprimé, et en intégrant une notion de distance pour représenter le niveau de significativité et/ou l'amplitude des modulations,

**Dans un futur plus lointain**, il serait intéressant de faire évoluer :

- **Les modèles *in vitro*** par :
  - l'utilisation d'un modèle d'épithélium bronchique reconstruit en co-culture avec des cellules immunitaires, afin de prendre en compte les interactions complexes entre différents types cellulaires présents au niveau bronchique ;
  - l'utilisation d'organoïdes pulmonaires, ce qui permettrait d'étudier l'impact d'expositions aux PM<sub>2.5-0.3</sub> pendant le développement de l'appareil respiratoire, un domaine de recherche encore peu exploré ;
  - la conception à l'aide d'une imprimante 3D, d'un support reproduisant l'appareil respiratoire (de la trachée aux alvéoles) sur lequel nous pourrions faire pousser des

cellules trachéales, bronchiques et alvéolaires. Ce modèle permettrait de mieux comprendre les effets des PM<sub>2.5-0.3</sub> sur l'ensemble des voies respiratoires inférieures pouvant conduire au développement ou à l'exacerbation de pathologies respiratoires.

- **Le protocole d'exposition** en :
  - utilisant des systèmes permettant des expositions à l'interface air-liquide, comme des systèmes de nébulisation de particules, ce qui offrirait la possibilité d'expositions à des concentrations plus faibles et sur des durées plus prolongées ;
  - mesurant le potentiel oxydant (PO) des PM<sub>2.5-0.3</sub> avant chaque exposition afin d'évaluer leur capacité à générer un stress oxydant et une inflammation.
- **Les techniques et les méthodes d'analyses**, en intégrant des techniques omiques, telles que la génomique, la protéomique, la métabolomique, et l'épigénomique, permettant d'obtenir une quantité de données beaucoup plus vaste concernant les réponses biologiques se mettant en place suite aux expositions aux PM<sub>2.5-0.3</sub>. Les nombreuses données recueillies nécessiteraient des méthodes analytiques plus avancées, notamment des modélisations plus complexes voire l'utilisation de l'intelligence artificielle.

En outre, la recherche sur l'exposome doit élargir son champ d'étude au-delà des PM<sub>2.5</sub>. Il est essentiel d'explorer d'autres facteurs environnementaux tels que d'autres polluants atmosphériques, des substances chimiques, des radiations, des contaminants biologiques, etc. ainsi que les effets de combinaisons de plusieurs de ces facteurs. De plus, l'exploration d'autres systèmes biologiques que l'appareil respiratoire permettra une démarche d'investigation plus complète afin de mieux appréhender l'exposome.

## Références bibliographiques

---



- Abbas, I., Badran, G., Verdin, A., Ledoux, F., Roumie, M., Lo Guidice, J.-M., Courcot, D., & Garçon, G. (2019). In vitro evaluation of organic extractable matter from ambient PM<sub>2.5</sub> using human bronchial epithelial BEAS-2B cells : Cytotoxicity, oxidative stress, pro-inflammatory response, genotoxicity, and cell cycle deregulation. *Environmental Research*, *171*, 510-522. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.01.052>
- Abdel-Shafy, H. I., & Mansour, M. S. M. (2016). A review on polycyclic aromatic hydrocarbons : Source, environmental impact, effect on human health and remediation. *Egyptian Journal of Petroleum*, *25*(1), 107-123. <https://doi.org/10.1016/j.ejpe.2015.03.011>
- Aghaei-Zarch, S. M., Alipourfard, I., Rasoulzadeh, H., Najafi, S., Aghaei-Zarch, F., Partov, S., Movafagh, A., Jahanara, A., Toolabi, A., Sheikhmohammadi, A., Pour, N. N., Neghad, S. K., & Ashrafi-Asgarabad, A. (2023). Non-coding RNAs : An emerging player in particulate matter 2.5-mediated toxicity. *International Journal of Biological Macromolecules*, *235*, 123790. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.123790>
- Airparif. (2021a). *La réglementation en France*. <https://www.airparif.asso.fr/la-reglementation-en-france>
- Airparif. (2021b). *Les sources de pollution de l'air*. <https://www.airparif.asso.fr/comprendre-la-pollution/comprendre-les-polluants-de-lair>
- Alessandrini, F., de Jong, R., Wimmer, M., Maier, A.-M., Fernandez, I., Hils, M., Buters, J. T., Biedermann, T., Zissler, U. M., Hoffmann, C., Esser-von-Bieren, J., Schmidt-Weber, C. B., & Ohnmacht, C. (2022). Lung Epithelial CYP1 Activity Regulates Aryl Hydrocarbon Receptor Dependent Allergic Airway Inflammation. *Frontiers in Immunology*, *13*, 901194. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.901194>
- Anderson, S. E., Khurshid, S. S., Meade, B. J., Lukomska, E., & Wells, J. R. (2013). Toxicological analysis of limonene reaction products using an in vitro exposure system. *Toxicology in Vitro*:



- An International Journal Published in Association with BIBRA*, 27(2), 721-730.  
<https://doi.org/10.1016/j.tiv.2012.11.017>
- Anses. (2018). *Avis et rapport de l'Anses relatif à l'identification, la catégorisation et la hiérarchisation de polluants actuellement non réglementés pour la surveillance de la qualité de l'air*.  
<https://www.anses.fr/fr/system/files/AIR2015SA0216Ra.pdf>
- Anses. (2021). *Avis de l'agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail relatif à « la modification des seuils de déclenchement des procédures préfectorales en cas d'épisodes de pollution de l'air ambiant »*. <https://www.anses.fr/fr/system/files/AIR2020SA0110.pdf>
- Anses. (2022). *Avis de l'Anses et rapport d'expertise collective sur les valeurs toxicologiques de référence : Méthode pour un mélange de substances et application au mélange benzène, toluène, éthylbenzène et xylènes*.  
<https://www.anses.fr/fr/system/files/VSR2018SA0152Ra-1.pdf>
- Åström, D. O., Adolfsson, R., Segersson, D., Forsberg, B., & Oudin, A. (2021). Local Contrasts in Concentration of Ambient Particulate Air Pollution (PM<sub>2.5</sub>) and Incidence of Alzheimer's Disease and Dementia : Results from the Betula Cohort in Northern Sweden. *Journal of Alzheimer's Disease: JAD*, 81(1), 83-85. <https://doi.org/10.3233/JAD-201538>
- Badran, G., Ledoux, F., Verdin, A., Abbas, I., Roumie, M., Genevray, P., Landkocz, Y., Lo Guidice, J.-M., Garçon, G., & Courcot, D. (2020). Toxicity of fine and quasi-ultrafine particles: Focus on the effects of organic extractable and non-extractable matter fractions. *Chemosphere*, 243, 125440. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125440>
- Balharry, D., Sexton, K., & BéruBé, K. A. (2008). An in vitro approach to assess the toxicity of inhaled tobacco smoke components : Nicotine, cadmium, formaldehyde and urethane. *Toxicology*, 244(1), 66-76. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2007.11.001>
- Ball, M., Hossain, M., & Padalia, D. (2023). Anatomy, Airway. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459258/>

- Bannister, A. J., & Kouzarides, T. (2011). Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Research*, 21(3), 381-395. <https://doi.org/10.1038/cr.2011.22>
- Barbier, E., Carpentier, J., Simonin, O., Gosset, P., Platel, A., Happillon, M., Alleman, L. Y., Perdrix, E., Riffault, V., Chassat, T., Lo Guidice, J.-M., Anthérieu, S., & Garçon, G. (2023). Oxidative stress and inflammation induced by air pollution-derived PM2.5 persist in the lungs of mice after cessation of their sub-chronic exposure. *Environment International*, 181, 108248. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2023.108248>
- Barnes, P. J. (2016). Inflammatory mechanisms in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 138(1), 16-27. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.05.011>
- Baudin, B. (2020). Stress oxydant et protections antioxydantes. *Revue Francophone des Laboratoires*, 2020(522), 22-30. [https://doi.org/10.1016/S1773-035X\(20\)30159-3](https://doi.org/10.1016/S1773-035X(20)30159-3)
- Baxter, A., Thain, S., Banerjee, A., Haswell, L., Parmar, A., Phillips, G., & Minet, E. (2015). Targeted omics analyses, and metabolic enzyme activity assays demonstrate maintenance of key mucociliary characteristics in long term cultures of reconstituted human airway epithelia. *Toxicology in Vitro*, 29(5), 864-875. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2015.03.004>
- Beischlag, T. V., Morales, J. L., Hollingshead, B. D., & Perdew, G. H. (2008). The Aryl Hydrocarbon Receptor Complex and the Control of Gene Expression. *Critical reviews in eukaryotic gene expression*, 18(3), 207-250. <https://doi.org/10.1615/critreveukargeneexpr.v18.i3.20>
- Bekkar, B., Pacheco, S., Basu, R., & DeNicola, N. (2020). Association of Air Pollution and Heat Exposure With Preterm Birth, Low Birth Weight, and Stillbirth in the US : A Systematic Review. *JAMA Network Open*, 3(6), e208243. <https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2020.8243>

- Benjamini, Y., & Hochberg, Y. (1995). Controlling the False Discovery Rate : A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)*, 57(1), 289-300. <https://doi.org/10.1111/j.2517-6161.1995.tb02031.x>
- Bezerra, F. S., Lanzetti, M., Nesi, R. T., Nagato, A. C., Silva, C. P. e, Kennedy-Feitosa, E., Melo, A. C., Cattani-Cavaliere, I., Porto, L. C., & Valenca, S. S. (2023). Oxidative Stress and Inflammation in Acute and Chronic Lung Injuries. *Antioxidants*, 12(3), Article 3. <https://doi.org/10.3390/antiox12030548>
- Bisig, C., Comte, P., Güdel, M., Czerwinski, J., Mayer, A., Müller, L., Petri-Fink, A., & Rothen-Rutishauser, B. (2018). Assessment of lung cell toxicity of various gasoline engine exhausts using a versatile in vitro exposure system. *Environmental Pollution*, 235, 263-271. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.12.061>
- Biswas, S. K. (2016). Does the Interdependence between Oxidative Stress and Inflammation Explain the Antioxidant Paradox? *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 5698931. <https://doi.org/10.1155/2016/5698931>
- Boningari, T., & Smirniotis, P. G. (2016). Impact of nitrogen oxides on the environment and human health : Mn-based materials for the NO<sub>x</sub> abatement. *Current Opinion in Chemical Engineering*, 13, 133-141. <https://doi.org/10.1016/j.coche.2016.09.004>
- Borgie, M., Ledoux, F., Verdin, A., Cazier, F., Greige, H., Shirali, P., Courcot, D., & Dagher, Z. (2015). Genotoxic and epigenotoxic effects of fine particulate matter from rural and urban sites in Lebanon on human bronchial epithelial cells. *Environmental Research*, 136, 352-362. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2014.10.010>
- Boublil, L., Assémat, E., Borot, M.-C., Boland, S., Martinon, L., Sciare, J., & Baeza-Squiban, A. (2013). Development of a repeated exposure protocol of human bronchial epithelium in vitro to study the long-term effects of atmospheric particles. *Toxicology in Vitro: An*

*International Journal Published in Association with BIBRA*, 27(2), 533-542.  
<https://doi.org/10.1016/j.tiv.2012.11.008>

Briffa, J., Sinagra, E., & Blundell, R. (2020). Heavy metal pollution in the environment and their toxicological effects on humans. *Heliyon*, 6(9), e04691.  
<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04691>

Brusselle, G. G., Joos, G. F., & Bracke, K. R. (2011). New insights into the immunology of chronic obstructive pulmonary disease. *The Lancet*, 378(9795), 1015-1026.  
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)60988-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60988-4)

Camina, N., & Penning, T. M. (2022). Genetic and epigenetic regulation of the NRF2-KEAP1 pathway in human lung cancer. *British Journal of Cancer*, 126(9), Article 9.  
<https://doi.org/10.1038/s41416-021-01642-0>

Casalino-Matsuda, S. M., Monzon, M. E., Day, A. J., & Forteza, R. M. (2009). Hyaluronan Fragments/CD44 Mediate Oxidative Stress–Induced MUC5B Up-Regulation in Airway Epithelium. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 40(3), 277-285.  
<https://doi.org/10.1165/rcmb.2008-0073OC>

Casalino-Matsuda, S. M., Monzón, M. E., & Forteza, R. M. (2006). Epidermal Growth Factor Receptor Activation by Epidermal Growth Factor Mediates Oxidant-Induced Goblet Cell Metaplasia in Human Airway Epithelium. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 34(5), 581-591. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2005-0386OC>

Casarett, L. J., Doull, J., & Klaassen, C. D. (Éds.). (2008). *Casarett and Doull's toxicology: The basic science of poisons* (7th ed). McGraw-Hill.

Cazier, F., Genevray, P., Dewaele, D., Nouali, H., Verdin, A., Ledoux, F., Hachimi, A., Courcot, L., Billet, S., Bouhsina, S., Shirali, P., Garçon, G., & Courcot, D. (2016). Characterisation and seasonal variations of particles in the atmosphere of rural, urban and industrial areas:

- Organic compounds. *Journal of Environmental Sciences*, 44, 45-56.  
<https://doi.org/10.1016/j.jes.2016.01.014>
- Cecinato, A., Guerriero, E., Balducci, C., & Muto, V. (2014). Use of the PAH fingerprints for identifying pollution sources. *Urban Climate*, 10, 630-643.  
<https://doi.org/10.1016/j.uclim.2014.04.004>
- Cervena, T., Vrbova, K., Rossnerova, A., Topinka, J., & Rossner, P. (2019). Short-term and Long-term Exposure of the MucilAir™ Model to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Alternatives to Laboratory Animals*, 47(1), 9-18. <https://doi.org/10.1177/0261192919841484>
- Chana, K. K., Fenwick, P. S., Nicholson, A. G., Barnes, P. J., & Donnelly, L. E. (2014). Identification of a distinct glucocorticosteroid-insensitive pulmonary macrophage phenotype in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 133(1), 207-216.e11. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2013.08.044>
- Chen, H., Liu, X., Gao, X., Lv, Y., Zhou, L., Shi, J., Wei, W., Huang, J., Deng, L., Wang, Z., Jin, Y., & Yu, W. (2021). Epidemiological evidence relating risk factors to chronic obstructive pulmonary disease in China : A systematic review and meta-analysis. *PLOS ONE*, 16(12), e0261692. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0261692>
- Chen, Y., Luo, X.-S., Zhao, Z., Chen, Q., Wu, D., Sun, X., Wu, L., & Jin, L. (2018). Summer–winter differences of PM2.5 toxicity to human alveolar epithelial cells (A549) and the roles of transition metals. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 165, 505-509.  
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.09.034>
- Chenoweth, J. A., Albertson, T. E., & Greer, M. R. (2021). Carbon Monoxide Poisoning. *Critical Care Clinics*, 37(3), 657-672. <https://doi.org/10.1016/j.ccc.2021.03.010>

- Chiba, T., Chihara, J., & Furue, M. (2012). Role of the Arylhydrocarbon Receptor (AhR) in the Pathology of Asthma and COPD. *Journal of Allergy*, 2012, 372384. <https://doi.org/10.1155/2012/372384>
- Chung, Y., Chang, S. H., Martinez, G. J., Yang, X. O., Nurieva, R., Kang, H. S., Ma, L., Watowich, S. S., Jetten, A. M., Tian, Q., & Dong, C. (2009). Critical regulation of early Th17 cell differentiation by interleukin-1 signaling. *Immunity*, 30(4), 576-587. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.02.007>
- Crobeddu, B., Aragao-Santiago, L., Bui, L.-C., Boland, S., & Baeza Squiban, A. (2017). Oxidative potential of particulate matter 2.5 as predictive indicator of cellular stress. *Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)*, 230, 125-133. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.06.051>
- Curis, E., Courtin, C., Geoffroy, P. A., Laplanche, J.-L., Saubaméa, B., & Marie-Claire, C. (2019). Determination of sets of covarying gene expression using graph analysis on pairwise expression ratios. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 35(2), 258-265. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty629>
- Danel, V. (2019). Particules en suspension dans l'air : Leurs effets sur la santé. *Encyclopédie de l'environnement*. <https://www.encyclopedie-environnement.org/sante/particules-air-effets-sante/>
- Demedts, I. K., Demoor, T., Bracke, K. R., Joos, G. F., & Brusselle, G. G. (2006). Role of apoptosis in the pathogenesis of COPD and pulmonary emphysema. *Respiratory Research*, 7(1), 53. <https://doi.org/10.1186/1465-9921-7-53>
- Deng, X., Zhang, F., Rui, W., Long, F., Wang, L., Feng, Z., Chen, D., & Ding, W. (2013). PM2.5-induced oxidative stress triggers autophagy in human lung epithelial A549 cells. *Toxicology in Vitro*, 27(6), 1762-1770. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2013.05.004>

- Dergham, M., Lepers, C., Verdin, A., Billet, S., Cazier, F., Courcot, D., Shirali, P., & Garçon, G. (2012). Prooxidant and proinflammatory potency of air pollution particulate matter (PM<sub>2.5-0.3</sub>) produced in rural, urban, or industrial surroundings in human bronchial epithelial cells (BEAS-2B). *Chemical Research in Toxicology*, 25(4), 904-919. <https://doi.org/10.1021/tx200529v>
- Dergham, M., Lepers, C., Verdin, A., Cazier, F., Billet, S., Courcot, D., Shirali, P., & Garçon, G. (2015). Temporal–spatial variations of the physicochemical characteristics of air pollution Particulate Matter (PM<sub>2.5–0.3</sub>) and toxicological effects in human bronchial epithelial cells (BEAS-2B). *Environmental Research*, 137, 256-267. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2014.12.015>
- Dharmage, S. C., Perret, J. L., & Custovic, A. (2019). Epidemiology of Asthma in Children and Adults. *Frontiers in Pediatrics*, 7, 246. <https://doi.org/10.3389/fped.2019.00246>
- Diehl, S., Chow, C.-W., Weiss, L., Palmetshofer, A., Twardzik, T., Rounds, L., Serfling, E., Davis, R. J., Anguita, J., & Rincón, M. (2002). Induction of NFATc2 Expression by Interleukin 6 Promotes T Helper Type 2 Differentiation. *The Journal of Experimental Medicine*, 196(1), 39-49. <https://doi.org/10.1084/jem.20020026>
- Dissanayake, T. K., Schäuble, S., Mirhakkak, M. H., Wu, W.-L., Ng, A. C.-K., Yip, C. C. Y., López, A. G., Wolf, T., Yeung, M.-L., Chan, K.-H., Yuen, K.-Y., Panagiotou, G., & To, K. K.-W. (2020). Comparative Transcriptomic Analysis of Rhinovirus and Influenza Virus Infection. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1580. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01580>
- Duffin, R., Tran, L., Brown, D., Stone, V., & Donaldson, K. (2007). Proinflammogenic Effects of Low-Toxicity and Metal Nanoparticles In Vivo and In Vitro : Highlighting the Role of Particle Surface Area and Surface Reactivity. *Inhalation Toxicology*, 19(10), 849-856. <https://doi.org/10.1080/08958370701479323>

- Edginton, S., O'Sullivan, D. E., King, W. D., & Lougheed, M. D. (2021). The effect of acute outdoor air pollution on peak expiratory flow in individuals with asthma : A systematic review and meta-analysis. *Environmental Research*, *192*, 110296. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.110296>
- European Environment Agency. (2016). *Exposure pathways and monitoring*. <https://www.eea.europa.eu/publications/2599XXX/page006.html>
- European Environment Agency. (2020). *Air quality in Europe—2020 report*. <https://www.eea.europa.eu/publications/air-quality-in-europe-2020-report>
- Fan, X., Dong, T., Yan, K., Ci, X., & Peng, L. (2022). PM<sub>2.5</sub> increases susceptibility to acute exacerbation of COPD via NOX4/Nrf2 redox imbalance-mediated mitophagy. *Redox Biology*, *59*, 102587. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2022.102587>
- Fang, W., Zhang, Y., Li, S., Liu, A., Jiang, Y., Chen, D., Li, B., Yao, C., Chen, R., & Shi, F. (2021). Effects of Air Pollutant Exposure on Exacerbation Severity in Asthma Patients with or without Reversible Airflow Obstruction. *Journal of Asthma and Allergy*, *14*, 1117-1127. <https://doi.org/10.2147/JAA.S328652>
- Fazlzadeh, M., Rostami, R., Hazrati, S., & Rastgu, A. (2015). Concentrations of carbon monoxide in indoor and outdoor air of Ghalyun cafes. *Atmospheric Pollution Research*, *6*(4), 550-555. <https://doi.org/10.5094/APR.2015.061>
- Feng, S., Gao, D., Liao, F., Zhou, F., & Wang, X. (2016). The health effects of ambient PM<sub>2.5</sub> and potential mechanisms. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *128*, 67-74. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.01.030>
- Fernando, I. P. S., Jayawardena, T. U., Kim, H.-S., Lee, W. W., Vaas, A. P. J. P., De Silva, H. I. C., Abayaweera, G. S., Nanayakkara, C. M., Abeytungga, D. T. U., Lee, D.-S., & Jeon, Y.-J. (2019). Beijing urban particulate matter-induced injury and inflammation in human lung



- epithelial cells and the protective effects of fucosterol from *Sargassum binderi* (Sonder ex J. Agardh). *Environmental Research*, 172, 150-158.  
<https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.02.016>
- Finlayson-Pitts, B. J., Wingen, L. M., Perraud, V., & Ezell, M. J. (2020). Open questions on the chemical composition of airborne particles. *Communications Chemistry*, 3(1), Article 1.  
<https://doi.org/10.1038/s42004-020-00347-4>
- Fischer, B. M., Voynow, J. A., & Ghio, A. J. (2015). COPD : Balancing oxidants and antioxidants. *International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*, 10, 261-276.  
<https://doi.org/10.2147/COPD.S42414>
- Fishler, R., Hofemeier, P., Etzion, Y., Dubowski, Y., & Sznitman, J. (2015). Particle dynamics and deposition in true-scale pulmonary acinar models. *Scientific Reports*, 5, 14071.  
<https://doi.org/10.1038/srep14071>
- Froehlich, E., & Salar-Behzadi, S. (2014). Toxicological Assessment of Inhaled Nanoparticles : Role of in Vivo, ex Vivo, in Vitro, and in Silico Studies. *International journal of molecular sciences*, 15, 4795-4822. <https://doi.org/10.3390/ijms15034795>
- Gao, M., Liang, C., Hong, W., Yu, X., Zhou, Y., Sun, R., Li, H., Huang, H., Gan, X., Yuan, Z., Zhang, J., Chen, J., Mo, Q., Wang, L., Lin, B., Li, B., & Ran, P. (2022). Biomass-related PM2.5 induces mitochondrial fragmentation and dysfunction in human airway epithelial cells. *Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)*, 292(Pt B), 118464.  
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.118464>
- Gao, W., Li, L., Wang, Y., Zhang, S., Adcock, I. M., Barnes, P. J., Huang, M., & Yao, X. (2015). Bronchial epithelial cells : The key effector cells in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease? *Respirology*, 20(5), 722-729. <https://doi.org/10.1111/resp.12542>

- GBD 2019 Diseases and Injuries Collaborators. (2020). Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990-2019 : A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet (London, England)*, *396*(10258), 1204-1222. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30925-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30925-9)
- Gibb, T. (2013, février 7). *Indoor air quality may be hazardous to your health*. MSU Extension. [https://www.canr.msu.edu/news/indoor\\_air\\_quality\\_may\\_be\\_hazardous\\_to\\_your\\_health](https://www.canr.msu.edu/news/indoor_air_quality_may_be_hazardous_to_your_health)
- Grundy, S., Plumb, J., Lea, S., Kaur, M., Ray, D., & Singh, D. (2013). Down Regulation of T Cell Receptor Expression in COPD Pulmonary CD8 Cells. *PLOS ONE*, *8*(8), e71629. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071629>
- Gu, L.-Z., Sun, H., & Chen, J.-H. (2017). Histone deacetylases 3 deletion restrains PM2.5-induced mice lung injury by regulating NF- $\kappa$ B and TGF- $\beta$ /Smad2/3 signaling pathways. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, *85*, 756-762. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.11.094>
- Gualtieri, M., Øvrevik, J., Holme, J. A., Perrone, M. G., Bolzacchini, E., Schwarze, P. E., & Camatini, M. (2010). Differences in cytotoxicity versus pro-inflammatory potency of different PM fractions in human epithelial lung cells. *Toxicology in Vitro: An International Journal Published in Association with BIBRA*, *24*(1), 29-39. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2009.09.013>
- Guarnieri, M., & Balmes, J. (2014). Outdoor Air Pollution and Asthma. *Lancet*, *383*, 1581-1592. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)60617-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)60617-6)
- Guo, H.-B., Li, M., Lyu, Y., Cheng, T.-T., Xv, J.-J., & Li, X. (2019). Size-resolved particle oxidative potential in the office, laboratory, and home : Evidence for the importance of water-soluble

- transition metals. *Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)*, 246, 704-709.  
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.12.094>
- Gutiérrez-Vázquez, C., & Quintana, F. J. (2018). Regulation of the Immune Response by the Aryl Hydrocarbon Receptor. *Immunity*, 48(1), 19-33.  
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.12.012>
- Halwani, R., Al-Muhsen, S., Al-Jahdali, H., & Hamid, Q. (2011). Role of transforming growth factor- $\beta$  in airway remodeling in asthma. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 44(2), 127-133. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2010-0027TR>
- Hammond, J., Maher, B. A., Gonet, T., Bautista, F., & Allsop, D. (2022). Oxidative Stress, Cytotoxic and Inflammatory Effects of Urban Ultrafine Road-Deposited Dust from the UK and Mexico in Human Epithelial Lung (Calu-3) Cells. *Antioxidants*, 11(9), Article 9.  
<https://doi.org/10.3390/antiox11091814>
- Hamra, G. B., Guha, N., Cohen, A., Laden, F., Raaschou-Nielsen, O., Samet, J. M., Vineis, P., Forastiere, F., Saldiva, P., Yorifuji, T., & Loomis, D. (2014). Outdoor particulate matter exposure and lung cancer: A systematic review and meta-analysis. *Environmental Health Perspectives*, 122(9), 906-911. <https://doi.org/10.1289/ehp/1408092>
- Hanley, M. E., & Patel, P. H. (2023). Carbon Monoxide Toxicity. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK430740/>
- Hervouet, E., Peixoto, P., Delage-Mourroux, R., Boyer-Guittaut, M., & Cartron, P.-F. (2018). Specific or not specific recruitment of DNMTs for DNA methylation, an epigenetic dilemma. *Clinical Epigenetics*, 10, 17. <https://doi.org/10.1186/s13148-018-0450-y>
- Heusinkveld, H. J., Wahle, T., Campbell, A., Westerink, R. H. S., Tran, L., Johnston, H., Stone, V., Cassee, F. R., & Schins, R. P. F. (2016). Neurodegenerative and neurological disorders by

- small inhaled particles. *Neurotoxicology*, 56, 94-106.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuro.2016.07.007>
- Hiemstra, P. S., Grootaers, G., van der Does, A. M., Krul, C. A. M., & Kooter, I. M. (2018). Human lung epithelial cell cultures for analysis of inhaled toxicants : Lessons learned and future directions. *Toxicology in Vitro*, 47, 137-146. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2017.11.005>
- Hiemstra, P. S., McCray, P. B., & Bals, R. (2015). The innate immune function of airway epithelial cells in inflammatory lung disease. *The European respiratory journal*, 45(4), 1150-1162. <https://doi.org/10.1183/09031936.00141514>
- Hoesel, B., & Schmid, J. A. (2013). The complexity of NF- $\kappa$ B signaling in inflammation and cancer. *Molecular Cancer*, 12, 86. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-12-86>
- Hollingshead, B. D., Beischlag, T. V., Dinatale, B. C., Ramadoss, P., & Perdew, G. H. (2008). Inflammatory signaling and aryl hydrocarbon receptor mediate synergistic induction of interleukin 6 in MCF-7 cells. *Cancer Research*, 68(10), 3609-3617. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-6168>
- Huang, B.-F., Chang, Y.-C., Han, A.-L., & Hsu, H.-T. (2018). Metal composition of ambient PM2.5 influences the pulmonary function of schoolchildren : A case study of school located nearby of an electric arc furnace factory. *Toxicology and Industrial Health*, 34(4), 253-261. <https://doi.org/10.1177/0748233717754173>
- Huang, K., Yang, X., Liang, F., Liu, F., Li, J., Xiao, Q., Chen, J., Liu, X., Cao, J., Shen, C., Yu, L., Lu, F., Wu, X., Zhao, L., Wu, X., Li, Y., Hu, D., Huang, J., Liu, Y., ... Gu, D. (2019). Long-Term Exposure to Fine Particulate Matter and Hypertension Incidence in China : The China-PAR Cohort Study. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)*, 73(6), 1195-1201. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.119.12666>

- Huang, S., Boda, B., Vernaz, J., Ferreira, E., Wiszniewski, L., & Constant, S. (2017). Establishment and characterization of an in vitro human small airway model (SmallAir™). *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics: Official Journal of Arbeitsgemeinschaft Fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V.*, 118, 68-72. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2016.12.006>
- Huang, S. K., Tripathi, P., Koneva, L. A., Cavalcante, R. G., Craig, N., Scruggs, A. M., Sartor, M. A., Deng, F., & Chen, Y. (2021). Effect of concentration and duration of particulate matter exposure on the transcriptome and DNA methylome of bronchial epithelial cells. *Environmental Epigenetics*, 7(1), dvaa022. <https://doi.org/10.1093/eep/dvaa022>
- Huang, S., Wiszniewski, L., Constant, S., & Roggen, E. (2013). Potential of in vitro reconstituted 3D human airway epithelia (MucilAir™) to assess respiratory sensitizers. *Toxicology in Vitro: An International Journal Published in Association with BIBRA*, 27(3), 1151-1156. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2012.10.010>
- Hung, T.-H., Chen, P.-H., Tung, T.-H., Hsu, J., Hsu, T.-Y., & Wan, G.-H. (2023). Risks of preterm birth and low birth weight and maternal exposure to NO<sub>2</sub>/PM<sub>2.5</sub> acquired by dichotomous evaluation : A systematic review and meta-analysis. *Environmental Science and Pollution Research International*, 30(4), 9331-9349. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-24520-5>
- Hussain, S., Boland, S., Baeza-Squiban, A., Hamel, R., Thomassen, L. C. J., Martens, J. A., Billon-Galland, M. A., Fleury-Feith, J., Moisan, F., Pairon, J.-C., & Marano, F. (2009). Oxidative stress and proinflammatory effects of carbon black and titanium dioxide nanoparticles: Role of particle surface area and internalized amount. *Toxicology*, 260(1), 142-149. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2009.04.001>
- Ineris. (2005). *Rapport d'étude sur les hydrocarbures aromatiques polycycliques—Données d'entrée des modèles analytiques ou numériques de transferts dans les sols et les eaux souterraines : Synthèse bibliographique relative aux paramètres K<sub>d</sub> (sorption) et T<sub>1/2</sub> (biodégradation).*

- Inserm. (2017a). *Bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO), une toux chronique et un essoufflement à ne pas négliger*. Inserm. <https://www.inserm.fr/dossier/bronchopneumopathie-chronique-obstructive-bpco/>
- Inserm. (2017b). *Épigénétique : Un génome, plein de possibilité!* Inserm. <https://www.inserm.fr/dossier/epigenetique/>
- Inserm. (2023). *Asthme, une inflammation chronique des bronches de mieux en mieux contrôlée*. Inserm. <https://www.inserm.fr/dossier/asthme/>
- Institute for Quality and Efficiency in Health Care (IQWiG). (2010). What is an inflammation? In *InformedHealth.org*. Institute for Quality and Efficiency in Health Care (IQWiG). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279298/>
- Ishihara, N., Okuda, T., Hagino, H., Oguro, A., Tani, Y., Okochi, H., Tokoro, C., Fujii-Kuriyama, Y., Itoh, K., Vogel, C. F. A., & Ishihara, Y. (2022). Involvement of polycyclic aromatic hydrocarbons and endotoxin in macrophage expression of interleukin-33 induced by exposure to particulate matter. *The Journal of Toxicological Sciences*, 47(5), 201-210. <https://doi.org/10.2131/jts.47.201>
- Ishihara, Y., Haarmann-Stemann, T., Kado, N. Y., & Vogel, C. F. A. (2019). Interleukin 33 Expression Induced by Aryl Hydrocarbon Receptor in Macrophages. *Toxicological Sciences*, 170(2), 404-414. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfz114>
- Jesenak, M., Durdik, P., Oppova, D., Franova, S., Diamant, Z., Golebski, K., Banovcin, P., Vojtkova, J., & Novakova, E. (2023). Dysfunctional mucociliary clearance in asthma and airway remodeling – New insights into an old topic. *Respiratory Medicine*, 218, 107372. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2023.107372>

- Jia, H., Liu, Y., Guo, D., He, W., Zhao, L., & Xia, S. (2021). PM2.5-induced pulmonary inflammation via activating of the NLRP3/caspase-1 signaling pathway. *Environmental Toxicology*, 36(3), 298-307. <https://doi.org/10.1002/tox.23035>
- Jin, X., Xue, B., Zhou, Q., Su, R., & Li, Z. (2018). Mitochondrial damage mediated by ROS incurs bronchial epithelial cell apoptosis upon ambient PM2.5 exposure. *The Journal of Toxicological Sciences*, 43(2), 101-111. <https://doi.org/10.2131/jts.43.101>
- Jørgensen, J. T., Johansen, M. S., Ravnskjær, L., Andersen, K. K., Bräuner, E. V., Loft, S., Ketzel, M., Becker, T., Brandt, J., Hertel, O., & Andersen, Z. J. (2016). Long-term exposure to ambient air pollution and incidence of brain tumours : The Danish Nurse Cohort. *Neurotoxicology*, 55, 122-130. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2016.06.003>
- Jung, C.-R., Chen, W.-T., Tang, Y.-H., & Hwang, B.-F. (2019). Fine particulate matter exposure during pregnancy and infancy and incident asthma. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 143(6), 2254-2262.e5. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2019.03.024>
- Kaur, R., & Chupp, G. (2019). Phenotypes and endotypes of adult asthma : Moving toward precision medicine. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 144(1), 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2019.05.031>
- Kazantsev, A. G., & Thompson, L. M. (2008). Therapeutic application of histone deacetylase inhibitors for central nervous system disorders. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 7(10), 854-868. <https://doi.org/10.1038/nrd2681>
- Kelly, F. J., & Fussell, J. C. (2012). Size, source and chemical composition as determinants of toxicity attributable to ambient particulate matter. *Atmospheric Environment*, 60, 504-526. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2012.06.039>
- Khaniabadi, Y. O., Polosa, R., Chaturkova, R. Z., Daryanoosh, M., Goudarzi, G., Borgini, A., Tittarelli, A., Basiri, H., Armin, H., Nourmoradi, H., Babaei, A. A., & Naserian, P. (2017).

- Human health risk assessment due to ambient PM10 and SO2 by an air quality modeling technique. *Process Safety and Environmental Protection*, 111, 346-354. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2017.07.018>
- Kikuchi, I., Kikuchi, S., Kobayashi, T., Hagiwara, K., Sakamoto, Y., Kanazawa, M., & Nagata, M. (2006). Eosinophil trans-basement membrane migration induced by interleukin-8 and neutrophils. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 34(6), 760-765. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2005-0303OC>
- Kim, S. Y., Kim, K. W., Lee, S. M., Lee, D., Park, S., Son, B. S., & Park, M. K. (2020). Overexpression of the Aryl Hydrocarbon Receptor (Ahr) Mediates an Oxidative Stress Response following Injection of Fine Particulate Matter in the Temporal Cortex. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020, 6879738. <https://doi.org/10.1155/2020/6879738>
- Kinde, B., Gabel, H. W., Gilbert, C. S., Griffith, E. C., & Greenberg, M. E. (2015). Reading the unique DNA methylation landscape of the brain: Non-CpG methylation, hydroxymethylation, and MeCP2. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(22), 6800-6806. <https://doi.org/10.1073/pnas.1411269112>
- Kooter, I. M., Gröllers-Mulderij, M., Steenhof, M., Duistermaat, E., van Acker, F. A. A., Staal, Y. C. M., Tromp, P. C., Schoen, E., Kuper, C. F., & van Someren, E. (2016). Cellular Effects in an In Vitro Human 3D Cellular Airway Model and A549/BEAS-2B In Vitro Cell Cultures Following Air Exposure to Cerium Oxide Particles at an Air-Liquid Interface. *Applied In Vitro Toxicology*, 2(1), 56-66. <https://doi.org/10.1089/aivt.2015.0030>
- Korashy, H. M., & El-Kadi, A. O. S. (2005). Regulatory mechanisms modulating the expression of cytochrome P450 1A1 gene by heavy metals. *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology*, 88(1), 39-51. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfi282>



- Korashy, H. M., & El-Kadi, A. O. S. (2006). Transcriptional regulation of the NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 and glutathione S-transferase ya genes by mercury, lead, and copper. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*, 34(1), 152-165. <https://doi.org/10.1124/dmd.105.005397>
- Kouassi, K. S., Billet, S., Garçon, G., Verdin, A., Diouf, A., Cazier, F., Djaman, J., Courcot, D., & Shirali, P. (2010). Oxidative damage induced in A549 cells by physically and chemically characterized air particulate matter (PM2.5) collected in Abidjan, Côte d'Ivoire. *Journal of Applied Toxicology*, 30(4), 310-320. <https://doi.org/10.1002/jat.1496>
- Krittanawong, C., Qadeer, Y. K., Hayes, R. B., Wang, Z., Virani, S., Thurston, G. D., & Lavie, C. J. (2023). PM2.5 and Cardiovascular Health Risks. *Current Problems in Cardiology*, 48(6), 101670. <https://doi.org/10.1016/j.cpcardiol.2023.101670>
- Krol, A. J., Beaune, P., de Waziers, I., & Loriot, M.-A. (2015, mars 5). *Métabolisme des xénobiotiques*. EM-Consulte. <https://www.em-consulte.com/article/959682/metabolisme-des-xenobiotiques>
- Kuper, C. F., Gröllers-Mulderij, M., Maarschalkerweerd, T., Meulendijks, N. M. M., Reus, A., van Acker, F., Zondervan-vanden Beuken, E. K., Wouters, M. E. L., Bijlsma, S., & Kooter, I. M. (2015). Toxicity assessment of aggregated/agglomerated cerium oxide nanoparticles in an in vitro 3D airway model : The influence of mucociliary clearance. *Toxicology in Vitro: An International Journal Published in Association with BIBRA*, 29(2), 389-397. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2014.10.017>
- Kuruvilla, M. E., Lee, F. E.-H., & Lee, G. B. (2019). Understanding Asthma Phenotypes, Endotypes, and Mechanisms of Disease. *Clinical reviews in allergy & immunology*, 56(2), 219-233. <https://doi.org/10.1007/s12016-018-8712-1>

- Latella, G. (2018). Redox Imbalance in Intestinal Fibrosis : Beware of the TGF $\beta$ -1, ROS, and Nrf2 Connection. *Digestive Diseases and Sciences*, 63(2), 312-320. <https://doi.org/10.1007/s10620-017-4887-1>
- Le Borgne-Krams, A., Guilleminault, L., Mailhol, C., & Didier, A. (2016). Traitement par anti-IL-5 dans l'asthme sévère : Vers la guerre des mabs ? *Revue Française d'Allergologie*, 56(7), 549-555. <https://doi.org/10.1016/j.reval.2016.08.003>
- Leclercq, B., Happillon, M., Antherieu, S., Hardy, E. M., Alleman, L. Y., Grova, N., Perdrix, E., Appenzeller, B. M., Lo Guidice, J.-M., Coddeville, P., & Garçon, G. (2016). Differential responses of healthy and chronic obstructive pulmonary diseased human bronchial epithelial cells repeatedly exposed to air pollution-derived PM4. *Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)*, 218, 1074-1088. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.08.059>
- Leclercq, B., Platel, A., Antherieu, S., Alleman, L. Y., Hardy, E. M., Perdrix, E., Grova, N., Riffault, V., Appenzeller, B. M., Happillon, M., Nesslany, F., Coddeville, P., Lo-Guidice, J.-M., & Garçon, G. (2017). Genetic and epigenetic alterations in normal and sensitive COPD-diseased human bronchial epithelial cells repeatedly exposed to air pollution-derived PM2.5. *Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)*, 230, 163-177. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.06.028>
- Lecureur, V., Ferrec, E. L., N'diaye, M., Vee, M. L., Gardyn, C., Gilot, D., & Fardel, O. (2005). ERK-dependent induction of TNF $\alpha$  expression by the environmental contaminant benzo(a)pyrene in primary human macrophages. *FEBS Letters*, 579(9), 1904-1910. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.01.081>
- Li, D., Li, Y., Li, G., Zhang, Y., Li, J., & Chen, H. (2019). Fluorescent reconstitution on deposition of PM2.5 in lung and extrapulmonary organs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(7), 2488-2493. <https://doi.org/10.1073/pnas.1818134116>

- Li, D., Shi, J., Liang, D., Ren, M., & He, Y. (2023). Lung cancer risk and exposure to air pollution : A multicenter North China case-control study involving 14604 subjects. *BMC Pulmonary Medicine*, 23(1), 182. <https://doi.org/10.1186/s12890-023-02480-x>
- Li, J., Wang, J., Li, Y., Zhao, P., Tian, Y., Liu, X., He, H., & Jia, R. (2021). Effective-component compatibility of Bufei Yishen formula protects COPD rats against PM2.5-induced oxidative stress via miR-155/FOXO3a pathway. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 228, 112918. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112918>
- Li, N., Ma, J., Ji, K., & Wang, L. (2022). Association of PM2.5 and PM10 with Acute Exacerbation of Chronic Obstructive Pulmonary Disease at lag0 to lag7 : A Systematic Review and Meta-Analysis. *COPD: Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*, 19(1), 243-254. <https://doi.org/10.1080/15412555.2022.2070062>
- Li N., Wang S., Zhao L., Mao M., Song N., Li Y., Jia H., & Xia S. (2018). Expression of miR-155 in rats exposed to PM2.5 and its significance. *The Journal of Practical Medicine*, 376-380.
- Liao, F., Tan, Y., Wang, Y., Zhou, C., Wang, Q., Li, J., He, L., & Peng, X. (2021). lncRNA AABR07005593.1 potentiates PM2.5-induced interleukin-6 expression by targeting MCCC1. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 226, 112834. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112834>
- Liu, R., Young, M. T., Chen, J.-C., Kaufman, J. D., & Chen, H. (2016). Ambient Air Pollution Exposures and Risk of Parkinson Disease. *Environmental Health Perspectives*, 124(11), 1759-1765. <https://doi.org/10.1289/EHP135>
- Liu, S., Zhou, Y., Liu, S., Chen, X., Zou, W., Zhao, D., Li, X., Pu, J., Huang, L., Chen, J., Li, B., Liu, S., & Ran, P. (2017). Association between exposure to ambient particulate matter and chronic obstructive pulmonary disease : Results from a cross-sectional study in China. *Thorax*, 72(9), 788-795. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2016-208910>

- Liu, T., Zhang, L., Joo, D., & Sun, S.-C. (2017). NF- $\kappa$ B signaling in inflammation. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/sigtrans.2017.23>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>(-Delta Delta C(T))</sup> Method. *Methods (San Diego, Calif.)*, 25(4), 402-408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Longhin, E., Holme, J. A., Gutzkow, K. B., Arlt, V. M., Kucab, J. E., Camatini, M., & Gualtieri, M. (2013). Cell cycle alterations induced by urban PM<sub>2.5</sub> in bronchial epithelial cells: Characterization of the process and possible mechanisms involved. *Particle and Fibre Toxicology*, 10(1), 63. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-10-63>
- Longhin, E., Pezzolato, E., Mantecca, P., Holme, J. A., Franzetti, A., Camatini, M., & Gualtieri, M. (2013). Season linked responses to fine and quasi-ultrafine Milan PM in cultured cells. *Toxicology in Vitro*, 27(2), 551-559. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2012.10.018>
- Loxham, M., Morgan-Walsh, R. J., Cooper, M. J., Blume, C., Swindle, E. J., Dennison, P. W., Howarth, P. H., Cassee, F. R., Teagle, D. A. H., Palmer, M. R., & Davies, D. E. (2015). The effects on bronchial epithelial mucociliary cultures of coarse, fine, and ultrafine particulate matter from an underground railway station. *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology*, 145(1), 98-107. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfv034>
- Lu, H., Lyu, X., Cheng, H., Ling, Z., & Guo, H. (2019). Overview on the spatial-temporal characteristics of the ozone formation regime in China. *Environmental Science. Processes & Impacts*, 21(6), 916-929. <https://doi.org/10.1039/c9em00098d>
- Ma, Q. (2013). Role of Nrf2 in Oxidative Stress and Toxicity. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 53, 401-426. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-011112-140320>
- Manojkumar, N., Srimuruganandam, B., & Shiva Nagendra, S. M. (2019). Application of multiple-path particle dosimetry model for quantifying age specified deposition of particulate matter

- in human airway. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 168, 241-248.  
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.10.091>
- Matucci, A., Vultaggio, A., Maggi, E., & Kasujee, I. (2018). Is IgE or eosinophils the key player in allergic asthma pathogenesis? Are we asking the right question? *Respiratory Research*, 19(1), 113. <https://doi.org/10.1186/s12931-018-0813-0>
- Miller, G. W., & Jones, D. P. (2014). The nature of nurture : Refining the definition of the exposome. *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology*, 137(1), 1-2. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kft251>
- Ministère de la Transition écologique et de la Cohésion des Territoire, & Ministère de la Transition énergétique. (2023, février 22). *Pollution de l'air : Origines, situation et impacts*. Ministères Écologie Énergie Territoires. <https://www.ecologie.gouv.fr/pollution-lair-origines-situation-et-impacts>
- Montero-Montoya, R., López-Vargas, R., & Arellano-Aguilar, O. (2018). Volatile Organic Compounds in Air : Sources, Distribution, Exposure and Associated Illnesses in Children. *Annals of Global Health*, 84(2), 225-238. <https://doi.org/10.29024/aogh.910>
- Moore, W. C., & Blecker, E. R. (2014). Asthma heterogeneity and severity—Why is comprehensive phenotyping important? *The Lancet Respiratory Medicine*, 2(1), 10-11. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(13\)70288-1](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(13)70288-1)
- Moufarrej, L., Verdin, A., Cazier, F., Ledoux, F., & Courcot, D. (2023). Oxidative stress response in pulmonary cells exposed to different fractions of PM2.5-0.3 from urban, traffic and industrial sites. *Environmental Research*, 216(Pt 2), 114572. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.114572>
- Mühlfeld, C., Rothen-Rutishauser, B., Blank, F., Vanhecke, D., Ochs, M., & Gehr, P. (2008). Interactions of nanoparticles with pulmonary structures and cellular responses. *American*

- Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 294(5), L817-L829.  
<https://doi.org/10.1152/ajplung.00442.2007>
- Murgia, N., & Gambelunghe, A. (2022). Occupational COPD-The most under-recognized occupational lung disease? *Respirology (Carlton, Vic.)*, 27(6), 399-410.  
<https://doi.org/10.1111/resp.14272>
- Nakagome, K., & Nagata, M. (2018). Involvement and Possible Role of Eosinophils in Asthma Exacerbation. *Frontiers in Immunology*, 9, 2220. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02220>
- Nuvolone, D., Petri, D., & Voller, F. (2018). The effects of ozone on human health. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(9), 8074-8088. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9239-3>
- OMS. (2022a). *Pollution de l'air à l'intérieur des habitations et santé*. <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/household-air-pollution-and-health>
- OMS. (2022b). *Pollution de l'air ambiant (extérieur)*. [https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/ambient-\(outdoor\)-air-quality-and-health](https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/ambient-(outdoor)-air-quality-and-health)
- OMS. (2023a). *Bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO)*. [https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/chronic-obstructive-pulmonary-disease-\(copd\)](https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/chronic-obstructive-pulmonary-disease-(copd))
- OMS. (2023b). *Pollution atmosphérique*. <https://www.who.int/fr/health-topics/air-pollution>
- Øvrevik, J., Låg, M., Lecqueur, V., Gilot, D., Lagadic-Gossmann, D., Refsnes, M., Schwarze, P. E., Skuland, T., Becher, R., & Holme, J. A. (2014). AhR and Arnt differentially regulate NF- $\kappa$ B signaling and chemokine responses in human bronchial epithelial cells. *Cell Communication and Signaling: CCS*, 12, 48. <https://doi.org/10.1186/s12964-014-0048-8>
- Pan, S., Qiu, Y., Li, M., Yang, Z., & Liang, D. (2022). Recent Developments in the Determination of PM2.5 Chemical Composition. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 108(5), 819-823. <https://doi.org/10.1007/s00128-022-03510-w>

- Pardo, M., Shafer, M. M., Rudich, A., Schauer, J. J., & Rudich, Y. (2015). Single Exposure to near Roadway Particulate Matter Leads to Confined Inflammatory and Defense Responses : Possible Role of Metals. *Environmental Science & Technology*, 49(14), 8777-8785. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b01449>
- Park, J., Lee, K.-H., Kim, H., Woo, J., Heo, J., Lee, C.-H., Yi, S.-M., & Yoo, C.-G. (2021). The impact of organic extracts of seasonal PM<sub>2.5</sub> on primary human lung epithelial cells and their chemical characterization. *Environmental Science and Pollution Research International*, 28(42), 59868-59880. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-14850-1>
- Park, J.-H., Troxel, A. B., Harvey, R. G., & Penning, T. M. (2006). Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) o-quinones produced by the aldo-keto-reductases (AKRs) generate abasic sites, oxidized pyrimidines, and 8-oxo-dGuo via reactive oxygen species. *Chemical Research in Toxicology*, 19(5), 719-728. <https://doi.org/10.1021/tx0600245>
- Pavón-Romero, G. F., Serrano-Pérez, N. H., García-Sánchez, L., Ramírez-Jiménez, F., & Terán, L. M. (2021). Neuroimmune Pathophysiology in Asthma. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.663535>
- Pekince, B., & Baccioglu, A. (2022). Allergic and non-allergic asthma phenotypes and exposure to air pollution. *The Journal of Asthma: Official Journal of the Association for the Care of Asthma*, 59(8), 1509-1520. <https://doi.org/10.1080/02770903.2021.1955133>
- Pénard-Morand, C., & Annesi-Maesano, I. (2004). Air pollution : From sources of emissions to health effects. *Breathe*, 1(2), 108-119. <https://doi.org/10.1183/18106838.0102.108>
- Pernelet-Joly, V. (2008). *La composition chimique des particules atmosphériques : Quels composants participent à la nocivité des particules ?* INVS.

- Persoz, C., Achard, S., Momas, I., & Seta, N. (2012). Inflammatory response modulation of airway epithelial cells exposed to formaldehyde. *Toxicology Letters*, *211*(2), 159-163. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2012.03.799>
- Quintana, F. J., Basso, A. S., Iglesias, A. H., Korn, T., Farez, M. F., Bettelli, E., Caccamo, M., Oukka, M., & Weiner, H. L. (2008). Control of T(reg) and T(H)17 cell differentiation by the aryl hydrocarbon receptor. *Nature*, *453*(7191), 65-71. <https://doi.org/10.1038/nature06880>
- Rappaport, S. M. (2011). Implications of the exposome for exposure science. *Journal of Exposure Science & Environmental Epidemiology*, *21*(1), 5-9. <https://doi.org/10.1038/jes.2010.50>
- Ravindra, K., Sokhi, R., & Van Grieken, R. (2008). Atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons : Source attribution, emission factors and regulation. *Atmospheric Environment*, *42*(13), 2895-2921. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2007.12.010>
- Ren, H., Lu, J., Ning, J., Su, X., Tong, Y., Chen, J., & Ding, Y. (2020). Exposure to fine particulate matter induces self-recovery and susceptibility of oxidative stress and inflammation in rat lungs. *Environmental Science and Pollution Research International*, *27*(32), 40262-40276. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-10029-2>
- Renzi, M., Scortichini, M., Forastiere, F., de' Donato, F., Michelozzi, P., Davoli, M., Gariazzo, C., Viegi, G., Stafoggia, M., Ancona, C., Bucci, S., de' Donato, F., Michelozzi, P., Renzi, M., Scortichini, M., Stafoggia, M., Bonafede, M., Gariazzo, C., Marinaccio, A., ... Carlino, G. (2022). A nationwide study of air pollution from particulate matter and daily hospitalizations for respiratory diseases in Italy. *Science of The Total Environment*, *807*, 151034. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.151034>
- Rodrigues, S. de O., Cunha, C. M. C. da, Soares, G. M. V., Silva, P. L., Silva, A. R., & Gonçalves-de-Albuquerque, C. F. (2021). Mechanisms, Pathophysiology and Currently Proposed



- Treatments of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 14(10), 979. <https://doi.org/10.3390/ph14100979>
- Rosenquist, N. A., Metcalf, W. J., Ryu, S. Y., Rutledge, A., Coppes, M. J., Grzymiski, J. J., Strickland, M. J., & Darrow, L. A. (2020). Acute associations between PM2.5 and ozone concentrations and asthma exacerbations among patients with and without allergic comorbidities. *Journal of Exposure Science & Environmental Epidemiology*, 30(5), 795-804. <https://doi.org/10.1038/s41370-020-0213-7>
- Rossner, P., Cervena, T., Vojtisek-Lom, M., Vrbova, K., Ambroz, A., Novakova, Z., Elzeinova, F., Margaryan, H., Beranek, V., Pechout, M., Macoun, D., Klema, J., Rossnerova, A., Ciganek, M., & Topinka, J. (2019). The Biological Effects of Complete Gasoline Engine Emissions Exposure in a 3D Human Airway Model (MucilAir™) and in Human Bronchial Epithelial Cells (BEAS-2B). *International Journal of Molecular Sciences*, 20(22), Article 22. <https://doi.org/10.3390/ijms20225710>
- Russell, W. M. S., & Burch, R. L. (1959). *The Principles of Humane Experimental Technique*. Methuen.
- Sahiner, U. M., Birben, E., Erzurum, S., Sackesen, C., & Kalayci, Ö. (2018). Oxidative stress in asthma : Part of the puzzle. *Pediatric Allergy and Immunology: Official Publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology*, 29(8), 789-800. <https://doi.org/10.1111/pai.12965>
- Saito, A., Horie, M., & Nagase, T. (2018). TGF- $\beta$  Signaling in Lung Health and Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(8), 2460. <https://doi.org/10.3390/ijms19082460>
- Santé Publique France. (2016). *Impacts de l'exposition chronique aux particules fines sur la mortalité en France continentale et analyse des gains en santé de plusieurs scénarios de réduction de la pollution atmosphérique*. <https://www.santepubliquefrance.fr/determinants-de-sante/pollution-et-sante/air/impacts-de-l-exposition-chronique-aux-particules-fines-sur-la-mortalite-en-france-continentale-et-analyse-des-gains-en-sante-de-plusieurs-scenarios>

- Santé Publique France. (2022). *Pollution atmosphérique : Quels sont les risques?*  
<https://www.santepubliquefrance.fr/determinants-de-sante/pollution-et-sante/air/articles/pollution-atmospherique-quels-sont-les-risques>
- Schaumann, F., Borm, P. J. A., Herbrich, A., Knoch, J., Pitz, M., Schins, R. P. F., Luettig, B., Hohlfeld, J. M., Heinrich, J., & Krug, N. (2004). Metal-rich Ambient Particles (Particulate Matter<sub>2.5</sub>) Cause Airway Inflammation in Healthy Subjects. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, *170*(8), 898-903. <https://doi.org/10.1164/rccm.200403-423OC>
- Schwarze, P. E., Øvrevik, J., Hetland, R. B., Becher, R., Cassee, F. R., Låg, M., Løvik, M., Dybing, E., & Refsnes, M. (2007). Importance of size and composition of particles for effects on cells in vitro. *Inhalation Toxicology*, *19 Suppl 1*, 17-22. <https://doi.org/10.1080/08958370701490445>
- Shah, A. S. V., Langrish, J. P., Nair, H., McAllister, D. A., Hunter, A. L., Donaldson, K., Newby, D. E., & Mills, N. L. (2013). Global association of air pollution and heart failure : A systematic review and meta-analysis. *Lancet (London, England)*, *382*(9897), 1039-1048. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)60898-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60898-3)
- Shah, A. S. V., Lee, K. K., McAllister, D. A., Hunter, A., Nair, H., Whiteley, W., Langrish, J. P., Newby, D. E., & Mills, N. L. (2015). Short term exposure to air pollution and stroke : Systematic review and meta-analysis. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, *350*, h1295. <https://doi.org/10.1136/bmj.h1295>
- Shao, J., Wheeler, A. J., Chen, L., Strandberg, B., Hinwood, A., Johnston, F. H., & Zosky, G. R. (2018). The pro-inflammatory effects of particulate matter on epithelial cells are associated with elemental composition. *Chemosphere*, *202*, 530-537. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.03.052>

- Shen, R., Liu, Z., Chen, X., Wang, Y., Wang, L., Liu, Y., & Li, X. (2019). Atmospheric levels, variations, sources and health risk of PM<sub>2.5</sub>-bound polycyclic aromatic hydrocarbons during winter over the North China Plain. *Science of The Total Environment*, *655*, 581-590. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.11.220>
- Shibata, S., Miyake, K., Tateishi, T., Yoshikawa, S., Yamanishi, Y., Miyazaki, Y., Inase, N., & Karasuyama, H. (2018). Basophils trigger emphysema development in a murine model of COPD through IL-4-mediated generation of MMP-12-producing macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *115*(51), 13057-13062. <https://doi.org/10.1073/pnas.1813927115>
- Shivanna, B., Chu, C., & Moorthy, B. (2022). The Aryl Hydrocarbon Receptor (AHR) : A Novel Therapeutic Target for Pulmonary Diseases? *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(3), 1516. <https://doi.org/10.3390/ijms23031516>
- Song, L., Li, D., Li, X., Ma, L., Bai, X., Wen, Z., Zhang, X., Chen, D., & Peng, L. (2017). Exposure to PM<sub>2.5</sub> induces aberrant activation of NF- $\kappa$ B in human airway epithelial cells by downregulating miR-331 expression. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, *50*, 192-199. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2017.02.011>
- Sotty, J., Garçon, G., Denayer, F.-O., Alleman, L.-Y., Saleh, Y., Perdrix, E., Riffault, V., Dubot, P., Lo-Guidice, J.-M., & Canivet, L. (2019). Toxicological effects of ambient fine (PM<sub>2.5-0.18</sub>) and ultrafine (PM<sub>0.18</sub>) particles in healthy and diseased 3D organo-typic mucociliary-phenotype models. *Environmental Research*, *176*, 108538. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.108538>
- Surace, A. E. A., & Hedrich, C. M. (2019). *The Role of Epigenetics in Autoimmune/Inflammatory Disease*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01525>

- Testa, B. (2007). 5.06 - Principles of Drug Metabolism 2 : Hydrolysis and Conjugation Reactions. In J. B. Taylor & D. J. Triggle (Éds.), *Comprehensive Medicinal Chemistry II* (p. 133-166). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B0-08-045044-X/00120-6>
- Tétreault, L.-F., Doucet, M., Gamache, P., Fournier, M., Brand, A., Kosatsky, T., & Smargiassi, A. (2016). Severe and Moderate Asthma Exacerbations in Asthmatic Children and Exposure to Ambient Air Pollutants. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *13*(8), 771. <https://doi.org/10.3390/ijerph13080771>
- Thangavel, P., Park, D., & Lee, Y.-C. (2022). Recent Insights into Particulate Matter (PM<sub>2.5</sub>)-Mediated Toxicity in Humans : An Overview. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *19*(12), 7511. <https://doi.org/10.3390/ijerph19127511>
- Thompson, J. E. (2018). Airborne Particulate Matter : Human Exposure and Health Effects. *Journal of Occupational and Environmental Medicine*, *60*(5), 392-423. <https://doi.org/10.1097/JOM.0000000000001277>
- Tiotiu, A. I., Novakova, P., Nedeva, D., Chong-Neto, H. J., Novakova, S., Steiropoulos, P., & Kowal, K. (2020). Impact of Air Pollution on Asthma Outcomes. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *17*(17), 6212. <https://doi.org/10.3390/ijerph17176212>
- Tirona, R. G., & Kim, R. B. (2005). Nuclear receptors and drug disposition gene regulation. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, *94*(6), 1169-1186. <https://doi.org/10.1002/jps.20324>
- Valavanidis, A., Vlachogianni, T., Fiotakis, K., & Loridas, S. (2013). Pulmonary Oxidative Stress, Inflammation and Cancer : Respirable Particulate Matter, Fibrous Dusts and Ozone as Major Causes of Lung Carcinogenesis through Reactive Oxygen Species Mechanisms. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *10*(9), 3886-3907. <https://doi.org/10.3390/ijerph10093886>

- Vogel, C. F. A., Li, W., Wu, D., Miller, J. K., Sweeney, C., Lazennec, G., Fujisawa, Y., & Matsumura, F. (2011). Interaction of aryl hydrocarbon receptor and NF- $\kappa$ B subunit RelB in breast cancer is associated with interleukin-8 overexpression. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *512*(1), 78-86. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2011.05.011>
- Vogel, C. F. A., Van Winkle, L. S., Esser, C., & Haarmann-Stemmann, T. (2020). The aryl hydrocarbon receptor as a target of environmental stressors – Implications for pollution mediated stress and inflammatory responses. *Redox Biology*, *34*, 101530. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101530>
- Wang, B., Li, R., Cai, Y., Li, B., Qin, S., Zheng, K., Zeng, M., Xiao, F., Zhang, Z., & Xu, X. (2020). Alteration of DNA methylation induced by PM2.5 in human bronchial epithelial cells. *Toxicology Research*, *9*(4), 552-560. <https://doi.org/10.1093/toxres/tfaa061>
- Wang, G., Zhao, J., Jiang, R., & Song, W. (2015). Rat lung response to ozone and fine particulate matter (PM2.5) exposures. *Environmental Toxicology*, *30*(3), 343-356. <https://doi.org/10.1002/tox.21912>
- Wang, H., Guo, Y., Liu, L., Guan, L., Wang, T., Zhang, L., Wang, Y., Cao, J., Ding, W., Zhang, F., & Lu, Z. (2016). DDAH1 plays dual roles in PM2.5 induced cell death in A549 cells. *Biochimica Et Biophysica Acta*, *1860*(12), 2793-2801. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2016.03.022>
- Wang, L., Xu, J., Liu, H., Li, J., & Hao, H. (2019). PM2.5 inhibits SOD1 expression by up-regulating microRNA-206 and promotes ROS accumulation and disease progression in asthmatic mice. *International Immunopharmacology*, *76*, 105871. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2019.105871>
- Wang, T., Huang, K., Chen, C., Chang, Y., Chen, H., Hsueh, C., Liu, Y., Yang, S., Yang, P., & Chen, C. (2023). PM2.5 promotes lung cancer progression through activation of the AhR-

- TMPRSS2-IL18 pathway. *EMBO Molecular Medicine*, 15(6), e17014.  
<https://doi.org/10.15252/emmm.202217014>
- Wang, X., Zhu, H., Sun, G., Zhou, M., Zhang, H., Liu, H., Wang, M., Zhang, Z., & Chu, H. (2023). Linc01515 regulates PM2.5-induced oxidative stress via targeting NRF2 in airway epithelial cells. *Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)*, 331(Pt 2), 121798.  
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2023.121798>
- Wei, J.-W., Huang, K., Yang, C., & Kang, C.-S. (2017). Non-coding RNAs as regulators in epigenetics (Review). *Oncology Reports*, 37(1), 3-9. <https://doi.org/10.3892/or.2016.5236>
- Wild, C. P. (2005). Complementing the Genome with an “Exposome” : The Outstanding Challenge of Environmental Exposure Measurement in Molecular Epidemiology. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, 14(8), Article 8. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-05-0456>
- Wild, C. P. (2012). The exposome : From concept to utility. *International Journal of Epidemiology*, 41(1), 24-32. <https://doi.org/10.1093/ije/dyr236>
- Wong, C. K., Wang, C. B., Ip, W. K., Tian, Y. P., & Lam, C. W. K. (2005). Role of p38 MAPK and NF- $\kappa$ B for chemokine release in coculture of human eosinophils and bronchial epithelial cells. *Clinical and Experimental Immunology*, 139(1), 90-100. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2005.02678.x>
- Wong, P. S., Vogel, C. F., Kokosinski, K., & Matsumura, F. (2010). Arylhydrocarbon receptor activation in NCI-H441 cells and C57BL/6 mice : Possible mechanisms for lung dysfunction. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 42(2), 210-217.  
<https://doi.org/10.1165/rcmb.2008-0228OC>
- Wottrich, R., Diabaté, S., & Krug, H. F. (2004). Biological effects of ultrafine model particles in human macrophages and epithelial cells in mono- and co-culture. *International Journal of*

*Hygiene and Environmental Health*, 207(4), 353-361. <https://doi.org/10.1078/1438-4639-00300>

Wu, H., Eckhardt, C. M., & Baccarelli, A. A. (2023). Molecular mechanisms of environmental exposures and human disease. *Nature Reviews. Genetics*, 24(5), 332-344. <https://doi.org/10.1038/s41576-022-00569-3>

Wu, M., Jiang, M., Ding, H., Tang, S., Li, D., Pi, J., Zhang, R., Chen, W., Chen, R., Zheng, Y., & Piao, J. (2023). Nrf2-/- regulated lung DNA demethylation and CYP2E1 DNA methylation under PM2.5 exposure. *Frontiers in Genetics*, 14, 1144903. <https://doi.org/10.3389/fgene.2023.1144903>

Wu, X., Zhu, B., Zhou, J., Bi, Y., Xu, S., & Zhou, B. (2021). The epidemiological trends in the burden of lung cancer attributable to PM2.5 exposure in China. *BMC Public Health*, 21(1), 737. <https://doi.org/10.1186/s12889-021-10765-1>

Xiao, T., Ling, M., Xu, H., Luo, F., Xue, J., Chen, C., Bai, J., Zhang, Q., Wang, Y., Bian, Q., & Liu, Q. (2019). NF- $\kappa$ B-regulation of miR-155, via SOCS1/STAT3, is involved in the PM2.5-accelerated cell cycle and proliferation of human bronchial epithelial cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 377, 114616. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2019.114616>

Xie, X., Wang, Y., Yang, Y., Xu, J., Zhang, Y., Tang, W., Guo, T., Wang, Q., Shen, H., Zhang, Y., Yan, D., Peng, Z., Chen, Y., He, Y., & Ma, X. (2018). Long-Term Effects of Ambient Particulate Matter (With an Aerodynamic Diameter  $\leq 2.5 \mu\text{m}$ ) on Hypertension and Blood Pressure and Attributable Risk Among Reproductive-Age Adults in China. *Journal of the American Heart Association*, 7(9), e008553. <https://doi.org/10.1161/JAHA.118.008553>

Xu, M., Wang, X., Xu, L., Zhang, H., Li, C., Liu, Q., Chen, Y., Chung, K. F., Adcock, I. M., & Li, F. (2021). Chronic lung inflammation and pulmonary fibrosis after multiple intranasal

- instillation of PM<sub>2.5</sub> in mice. *Environmental Toxicology*, 36(7), 1434-1446.  
<https://doi.org/10.1002/tox.23140>
- Yamauchi, K., & Ogasawara, M. (2019). The Role of Histamine in the Pathophysiology of Asthma and the Clinical Efficacy of Antihistamines in Asthma Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(7), 1733. <https://doi.org/10.3390/ijms20071733>
- Yan, W., Wang, X., Dong, T., Sun, M., Zhang, M., Fang, K., Chen, Y., Chen, R., Sun, Z., & Xia, Y. (2020). The impact of prenatal exposure to PM<sub>2.5</sub> on childhood asthma and wheezing : A meta-analysis of observational studies. *Environmental Science and Pollution Research International*, 27(23), 29280-29290. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-09014-6>
- Yang, J., Huo, T., Zhang, X., Ma, J., Wang, Y., Dong, F., & Deng, J. (2018). Oxidative stress and cell cycle arrest induced by short-term exposure to dustfall PM<sub>2.5</sub> in A549 cells. *Environmental Science and Pollution Research International*, 25(23), 22408-22419. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0430-3>
- Yang, L., Liu, G., Lin, Z., Wang, Y., He, H., Liu, T., & Kamp, D. W. (2014). Pro-inflammatory response and oxidative stress induced by specific components in ambient particulate matter in human bronchial epithelial cells. *Environmental Toxicology*, 31(8), 923-936. <https://doi.org/10.1002/tox.22102>
- Yang, L., Wan, W., Yu, C., Xuan, C., Zheng, P., & Yan, J. (2022). Associations between PM<sub>2.5</sub> exposure and Alzheimer's Disease prevalence Among elderly in eastern China. *Environmental Health: A Global Access Science Source*, 21(1), 119. <https://doi.org/10.1186/s12940-022-00937-w>
- Yang, M., Zhou, R., Qiu, X., Feng, X., Sun, J., Wang, Q., Lu, Q., Zhang, P., Liu, B., Li, W., Chen, M., Zhao, Y., Mo, B., Zhou, X., Zhang, X., Hua, Y., Guo, J., Bi, F., Cao, Y., ... Li, Y. -G. (2020). Artificial intelligence-assisted analysis on the association between exposure to



- ambient fine particulate matter and incidence of arrhythmias in outpatients of Shanghai community hospitals. *Environment International*, 139, 105745.  
<https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.105745>
- Yao, Y., Chen, X., Chen, W., Wang, Q., Fan, Y., Han, Y., Wang, T., Wang, J., Qiu, X., Zheng, M., Que, C., & Zhu, T. (2021). Susceptibility of individuals with chronic obstructive pulmonary disease to respiratory inflammation associated with short-term exposure to ambient air pollution: A panel study in Beijing. *Science of The Total Environment*, 766, 142639.  
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142639>
- Younan, D., Petkus, A. J., Widaman, K. F., Wang, X., Casanova, R., Espeland, M. A., Gatz, M., Henderson, V. W., Manson, J. E., Rapp, S. R., Sachs, B. C., Serre, M. L., Gaussoin, S. A., Barnard, R., Saldana, S., Vizuete, W., Beavers, D. P., Salinas, J. A., Chui, H. C., ... Chen, J.-C. (2020). Particulate matter and episodic memory decline mediated by early neuroanatomic biomarkers of Alzheimer's disease. *Brain: A Journal of Neurology*, 143(1), 289-302. <https://doi.org/10.1093/brain/awz348>
- Yu, J., Li, K., & Xu, J. (2019). Indoor PM2.5 from coal combustion aggravates ovalbumin-induced asthma-like airway inflammation in BALB/c mice. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, 317(1), L29-L38. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00012.2019>
- Yuan, X.-H., Pang, L.-L., Yang, J., & Jin, Y. (2022). Comparison of immune response to human rhinovirus C and respiratory syncytial virus in highly differentiated human airway epithelial cells. *Virology Journal*, 19(1), 81. <https://doi.org/10.1186/s12985-022-01805-2>
- Yzydorczyk, C., Mitanchez, D., Buffat, C., Ligi, I., Grandvuillemin, I., Boubred, F., & Simeoni, U. (2015). Stress oxydant chez l'enfant prématuré : Causes, biomarqueurs et possibilités thérapeutiques. *Archives de Pédiatrie*, 22(10), 1047-1055.  
<https://doi.org/10.1016/j.arcped.2015.05.019>

- Zavala, J., O'Brien, B., Lichtveld, K., Sexton, K. G., Rusyn, I., Jaspers, I., & Vizuetete, W. (2016). Assessment of biological responses of EpiAirway 3-D cell constructs versus A549 cells for determining toxicity of ambient air pollution. *Inhalation Toxicology*, 28(6), 251-259. <https://doi.org/10.3109/08958378.2016.1157227>
- Zhang, H.-H., Li, Z., Liu, Y., Xinag, P., Cui, X.-Y., Ye, H., Hu, B.-L., & Lou, L.-P. (2018). Physical and chemical characteristics of PM2.5 and its toxicity to human bronchial cells BEAS-2B in the winter and summer. *Journal of Zhejiang University. Science. B*, 19(4), 317-326. <https://doi.org/10.1631/jzus.B1700123>
- Zhang, S., & Routledge, M. N. (2020). The contribution of PM2.5 to cardiovascular disease in China. *Environmental Science and Pollution Research International*, 27(30), 37502-37513. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-09996-3>
- Zhao, L., Zhang, M., Bai, L., Zhao, Y., Cai, Z., Yung, K. K. L., Dong, C., & Li, R. (2022). Real-world PM2.5 exposure induces pathological injury and DNA damage associated with miRNAs and DNA methylation alteration in rat lungs. *Environmental Science and Pollution Research International*, 29(19), 28788-28803. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-17779-7>
- Zhao, M., Ma, J., Li, M., Zhang, Y., Jiang, B., Zhao, X., Huai, C., Shen, L., Zhang, N., He, L., & Qin, S. (2021). Cytochrome P450 Enzymes and Drug Metabolism in Humans. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(23), 12808. <https://doi.org/10.3390/ijms222312808>
- Zheng, Q., Liu, H., Zhang, J., & Chen, D. (2018). The effect of ambient particle matters on hospital admissions for cardiac arrhythmia: A multi-city case-crossover study in China. *Environmental Health*, 17(1), 60. <https://doi.org/10.1186/s12940-018-0404-z>
- Zhou, J., Geng, F., Xu, J., Peng, L., Ye, X., Yang, D., Zhao, J., & Sun, Q. (2019). PM2.5 exposure and cold stress exacerbates asthma in mice by increasing histone acetylation in IL-4 gene

promoter in CD4+ T cells. *Toxicology Letters*, 316, 147-153.  
<https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2019.09.011>

Zhou, Z., Liu, Y., Duan, F., Qin, M., Wu, F., Sheng, W., Yang, L., Liu, J., & He, K. (2015). Transcriptomic Analyses of the Biological Effects of Airborne PM2.5 Exposure on Human Bronchial Epithelial Cells. *PLoS ONE*, 10(9), e0138267.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138267>

Zou, W., Wang, X., Hong, W., He, F., Hu, J., Sheng, Q., Zhu, T., & Ran, P. (2020). PM2.5 Induces the Expression of Inflammatory Cytokines via the Wnt5a/Ror2 Pathway in Human Bronchial Epithelial Cells. *International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*, 15, 2653-2662. <https://doi.org/10.2147/COPD.S270762>

# Annexes

---



Annexe 1 : Normes européennes (UE) et françaises (FR) de qualité de l'air (source : Ministère de la Transition écologique et de la Cohésion des Territoire et Ministère de la Transition énergétique)

<b>Dioxyde d'azote (NO<sub>2</sub>)</b>		
<b>Objectif de qualité</b>	40 µg/m <sup>3</sup> <b>(FR)</b>	en moyenne annuelle
<b>Valeurs limites pour la protection de la santé humaine</b>	200 µg/m <sup>3</sup> <b>(UE)</b>	en moyenne horaire à ne pas dépasser plus de 18 heures par an
	40 µg/m <sup>3</sup> <b>(UE)</b>	en moyenne annuelle
<b>Niveau critique pour la protection de la végétation (NO<sub>x</sub>)</b>	30 µg/m <sup>3</sup> <b>(UE)</b>	en moyenne annuelle d'oxydes d'azote
<b>Seuil d'information et de recommandation</b>	200 µg/m <sup>3</sup> <b>(FR)</b>	en moyenne horaire
<b>Seuils d'alerte</b>	400 µg/m <sup>3</sup> <b>(UE)</b>	moyenne horaire pendant 3 heures consécutives
	ou si 200 µg/m <sup>3</sup> en moyenne horaire à J-1 et à J et prévision de 200 µg/m <sup>3</sup> à J+1 <b>(FR)</b>	

<b>Oxydes d'azote (NO<sub>x</sub>)</b>		
<b>Niveau critique pour la protection de la végétation</b>	30 µg eq NO <sub>2</sub> .m <sup>-3</sup>	en moyenne annuelle

<b>Particules grossières (PM<sub>10</sub>)</b>		
<b>Objectif de qualité</b>	30 µg/m <sup>3</sup> <b>(FR)</b>	en moyenne annuelle
<b>Valeurs limites pour la protection de la santé humaine</b>	50 µg/m <sup>3</sup> <b>(UE)</b>	en moyenne journalière à ne pas dépasser plus de 35 jours par an
	40 µg/m <sup>3</sup> <b>(UE)</b>	en moyenne annuelle
<b>Seuil d'information et de recommandation</b>	50 µg/m <sup>3</sup> <b>(FR)</b>	en moyenne sur 24 heures
<b>Seuil d'alerte</b>	80 µg/m <sup>3</sup> <b>(FR)</b>	en moyenne sur 24 heures

<b>Particules fines (PM<sub>2,5</sub>)</b>		
<b>Objectif de qualité</b>	10 µg/m <sup>3</sup> <b>(FR)</b>	en moyenne annuelle
<b>Valeur cible pour la protection de la santé humaine</b>	20 µg/m <sup>3</sup> <b>(FR)</b>	en moyenne annuelle
<b>Valeur limite 2015 pour la protection de la santé humaine</b>	25 µg/m <sup>3</sup> <b>(UE)</b>	en moyenne annuelle

<b>Dioxyde de soufre (SO<sub>2</sub>)</b>		
<b>Objectif de qualité</b>	50 µg/m <sup>3</sup> <b>(FR)</b>	en moyenne annuelle
<b>Valeurs limites pour la protection de la santé humaine</b>	350 µg/m <sup>3</sup> <b>(UE)</b>	en moyenne horaire à ne pas dépasser plus de 24 heures par an
	125 µg/m <sup>3</sup> <b>(UE)</b>	en moyenne journalière à ne pas dépasser plus de 3 jours par an
<b>Niveau critique pour la protection des écosystèmes</b>	20 µg/m <sup>3</sup> <b>(UE)</b>	en moyenne annuelle et en moyenne sur la période du 1er octobre au 31 mars
<b>Seuil d'information et de recommandation</b>	300 µg/m <sup>3</sup>	en moyenne horaire
<b>Seuil d'alerte</b>	500 µg/m <sup>3</sup>	en moyenne horaire pendant 3 heures consécutives

<b>Ozone (O<sub>3</sub>)</b>		
<b>Objectif de qualité pour la protection de la santé humaine</b>	120 µg/m <sup>3</sup>	pour le maximum journalier de la moyenne sur 8 heures par an
<b>Objectif de qualité pour la protection de la végétation</b>	6 000 µg/m <sup>3</sup> .h.	en AOT40, calculée à partir des valeurs sur 1 heure de mai à juillet entre 8h et 20h
<b>Valeur cible pour la protection de la santé humaine</b>	120 µg/m <sup>3</sup>	maximum journalier de la moyenne sur 8 heures à ne pas dépasser plus de 25 jours par an (en moyenne sur 3 ans)
<b>Valeur cible pour la protection de la végétation</b>	18 000 µg/m <sup>3</sup> .h. <b>(UE)</b>	en AOT40, calculée à partir des valeurs sur 1 heure de mai à juillet entre 8h et 20h (en moyenne sur 5 ans)
<b>Seuil d'information et de recommandation</b>	180 µg/m <sup>3</sup>	en moyenne horaire
<b>Seuil d'alerte pour une protection sanitaire pour toute la population</b>	240 µg/m <sup>3</sup>	en moyenne horaire
<b>Seuils d'alerte nécessitant la mise en œuvre progressive de mesures d'urgence</b>	1 <sup>er</sup> seuil : 240 µg/m <sup>3</sup>	moyenne horaire pendant 3 heures consécutives
	2 <sup>ème</sup> seuil : 300 µg/m <sup>3</sup>	moyenne horaire pendant 3 heures consécutives
	3 <sup>ème</sup> seuil : 360 µg/m <sup>3</sup>	en moyenne horaire

<b>Monoxyde de carbone (CO)</b>		
<b>Valeur limite pour la protection de la santé humaine</b>	10 mg/m <sup>3</sup> soit 10 000 µg/m <sup>3</sup> <b>(FR)</b>	pour le maximum journalier de la moyenne glissante sur 8 heures

Benzène (C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> )		
<b>Objectif de qualité</b>	2 µg/m <sup>3</sup> <b>(FR)</b>	en moyenne annuelle
<b>Valeur limite pour la protection de la santé humaine</b>	5 µg/m <sup>3</sup> <b>(UE)</b>	en moyenne annuelle

Éléments métalliques			
<b>Objectif de qualité</b>	<b>Plomb (Pb)</b>	0,25 µg/m <sup>3</sup> <b>(FR)</b>	en moyenne annuelle
<b>Valeur limite pour la protection de la santé humaine</b>		0,5 µg/m <sup>3</sup> <b>(UE)</b>	
<b>Valeur cible à compter de 2013</b>	<b>Arsenic (As)</b>	6 ng/m <sup>3</sup> <b>(UE)</b>	en moyenne annuelle du contenu total de la fraction PM <sub>10</sub>
	<b>Cadmium (Cd)</b>	5 ng/m <sup>3</sup> <b>(UE)</b>	
	<b>Nickel (Ni)</b>	20 ng/m <sup>3</sup> <b>(UE)</b>	

Benzo(a)Pyrène(B[a]P)		
<b>Valeur cible à compter de 2013</b>	1 ng/m <sup>3</sup> <b>(UE)</b>	en moyenne annuelle du contenu total de la fraction PM <sub>10</sub>

### Définitions des normes Qualité de l'Air

**Objectif de qualité** : niveau de concentration de substances polluantes dans l'atmosphère à atteindre à long terme, sauf lorsque cela n'est pas réalisable par des mesures proportionnées, afin d'assurer une protection efficace de la santé humaine et de l'environnement dans son ensemble;

**Valeur cible** : niveau de concentration de substances polluantes dans l'atmosphère fixé dans le but d'éviter, de prévenir ou de réduire les effets nocifs sur la santé humaine ou sur l'environnement dans son ensemble, à atteindre, dans la mesure du possible, dans un délai donné ;

**Valeur limite** : niveau de concentration de substances polluantes dans l'atmosphère fixé sur la base des connaissances scientifiques à ne pas dépasser dans le but d'éviter, de prévenir ou de réduire les effets nocifs de ces substances sur la santé humaine ou sur l'environnement dans son ensemble;

**Seuil d'information et de recommandation** : niveau de concentration de substances polluantes dans l'atmosphère au-delà duquel une exposition de courte durée présente un risque pour la santé humaine des groupes particulièrement sensibles de la population rendant nécessaires des informations immédiates et adéquates;

**Seuil d'alerte** : niveau de concentration de substances polluantes dans l'atmosphère au-delà duquel une exposition de courte durée présente un risque pour la santé de l'ensemble de la population ou de dégradation de l'environnement justifiant l'intervention de mesures d'urgence.





Table S1

**Chemical composition of the fine particles (PM<sub>2.5-0.3</sub>) from Urban (PMTraf) and Industrial (PMInd) sites. PM<sub>2.5-0.3</sub> are collected respectively from 28/02/2017 until 02/06/2017 and 02/03/2017 until 01/06/2017, periods corresponding to spring, a season generally conducive to particle peak episodes.**

PM were collected using a high volume cascade impaction air sampler as described by Billet (Billet, S. et al., 2007. doi: 10.1016/j.envres.2007.03.001). The physicochemical characterization was carried out by studying their size distributions, specific surface areas, organic and inorganic chemicals and ionic species as described by Cazier (Cazier et al., 2016).

**Tab.S1.A**

The concentrations of total Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) were 8-fold higher in the Industrial site (PMInd) compared to those in the Urban site (PMTraf).

**Tab.S1.B**

The hydrocarbons (HC - paraffin) profiles appeared to be similar for the two site with a majority of compounds were between C12 and C40. However, total HC were 4-fold higher in the Urban site (PMTraf) in comparison to the Industrial site (PMInd). In addition to the traffic, the urban area could also be impacted by the emissions related to heating.

**Tab.S1.C**

The elements Ba, Cu, K, Mo, Sn and Ti were more important on the PM collected on the Urban site (PMTraf) in relation to brake wear, the coating of pistons, and their presence as an additive in oils or in some fuels.

The elements Ca, Fe, Mn, Zn were higher on the PM from Industrial origin, in relation to the installations such as iron and steel industry (steel), production of ferromanganese alloys and the cement factory for example.

<b>Tab.S1.A</b>				
<b>Organic compounds (PAHs)</b>	<b>m/z</b>	<b>PMTraf (µg/g)</b>	<b>PMInd (µg/g)</b>	<b>PMInd/PMTraf</b>
Naphtalene	128	0.24	1.07	4.54
Acenaphthylene	152	0.12	0.18	1.51
Acenaphthene	154	0.00	0.00	-
Fluorene	166	0.09	0.31	3.59
Phenanthrene	178	0.48	1.92	4.00
Anthracene	178	0.18	0.56	3.14
Fluoranthene	202	0.86	6.00	7.01
Pyrene	202	0.83	5.24	6.28
Benzo[a]Anthracene	228	0.65	10.14	15.57
Chrysene	228	2.60	20.54	7.92
Benzo[b]Fluoranthene	252	2.33	19.99	8.58
Benzo[k]Fluoranthene	252	0.56	7.08	12.69
Benzo[a]Pyrene	252	1.70	15.47	9.08
Indeno[1,2,3-c,d]Pyrene	276	4.18	16.93	4.05
Dibenzo[a,h]Anthracene	278	2.57	18.18	7.07
Benzo[g,h,i]Perylene	276	2.96	12.77	4.31
<b>Total</b>		<b>17.77</b>	<b>136.39</b>	<b>7.68</b>

<b>Tab.S1.B</b>			
<b>HydroCarbons (HC-paraffin)</b>	<b>PMTraf (µg/g)</b>	<b>PMInd (µg/g)</b>	<b>PMTraf/PMInd</b>
C12	0.43	0.41	1.04
C13	0.35	0.66	0.53
C14	0.22	0.54	0.41
C15	0.55	0.72	0.77
C16	2.22	1.23	1.80
C17	4.07	2.62	1.55
Pristane	1.87	1.20	1.56
C18	4.41	3.33	1.32
Phytane	9.10	7.05	1.29
C19	4.02	2.25	1.79
C20	4.62	3.29	1.40
C21	7.96	5.19	1.54
C22	11.34	9.26	1.22
C23	23.48	13.84	1.70
C24	29.83	13.04	2.29
C25	42.40	22.15	1.91
C26	30.14	10.51	2.87
C27	53.40	35.76	1.49
C28	24.06	7.37	3.27
C29	56.60	45.79	1.24
C30	23.52	4.99	4.71
C31	46.16	25.74	1.79
C32	21.86	3.56	6.15
C33	30.34	12.14	2.50
C34	16.38	2.04	8.03
C35	9.76	1.68	5.80
C36	7.50	0.90	8.31
C37	3.99	1.96	2.04
C38	0.23	0.25	0.94
<b>Total</b>	<b>903.09</b>	<b>235.83</b>	<b>3.83</b>

<b>Tab.S1.C</b>			
<b>Major and Trace elements (MTE)</b>	<b>PMTraf (µg/g)</b>	<b>PMInd (µg/g)</b>	<b>PMInd/PMTraf</b>
Al	11 869	23 800	2.01
As	9	9	1.00
Ba	932	285	0.31
Ca	35 691	76 087	2.13
Cd	9	9	1.00
Co	13	20	1.48
Cr	251	266	1.06
Cu	933	276	0.30
Fe	38 078	87 549	2.30
K	8 053	6 677	0.83
Mg	2 701	9 307	3.45
Mn	555	6 692	12.06
Mo	36	22	0.62
Na	23 221	27 051	1.16
Ni	59	467	7.85
P	979	1 030	1.05
Pb	210	246	1.17
S	15 070	16 338	1.08
Sn	270	47	0.17
Sr	153	141	0.92
Ti	1 631	1 288	0.79
V	73	134	1.84
Zn	1 257	1 841	1.46
<b>Total</b>	<b>142 054</b>	<b>259 582</b>	<b>1.83</b>

Table S2

Epithelia reconstruction information and donors' characteristics. Certificates of analysis were provided by Epithelix®.

	Human Epithelium bronchial origin	
	Healthy (EpiH)	Asthma (EpiA)
Supplier	Epithelix®	Epithelix®
Product name	MucilAir -HF™	MucilAir -HF™
Batch number	HF-MD0720	HF-MD0744
<b>Cell information</b>		
Cell type	hAEC/Bronchial	hAEC/Bronchial
Date of seeding	May 25 <sup>th</sup> 2021	May 03 <sup>th</sup> 2021
Date of Air-Liquid interface	May 31 <sup>th</sup> 2021	May 10 <sup>th</sup> 2021
Date of fibroblasts co-cultured	June 21 <sup>th</sup> 2021	May 31 <sup>th</sup> 2021
<b>Donor information</b>		
Age	41	47
Sex	Male	Female
Origin	Caucasian	Caucasian
Smoker	No	No
Pathology	No pathology reported	Asthma
Donor history (medication, ...)	N.A	N.A
<b>Quality control</b>		
Sterility	Yes	Yes
Mycoplasma	Negative	Negative
Tissue Integrity TEER ( $\Omega \cdot \text{cm}^2$ )	284 $\pm$ 10 (> 200)	649 $\pm$ 33 (> 200)
Blank membrane resistance ( $\Omega$ )	174	174
Cilia beating frequency (Hz)	8.2 $\pm$ 0.5 (> 5)	5.8 $\pm$ 0.1 (> 5)
Morphology	Normal	Normal
Mucus	Present	Present
Virus testing (HIV-1 ; HIV-2 ; Hepatitis B ; Hepatitis C)	Negative	Negative

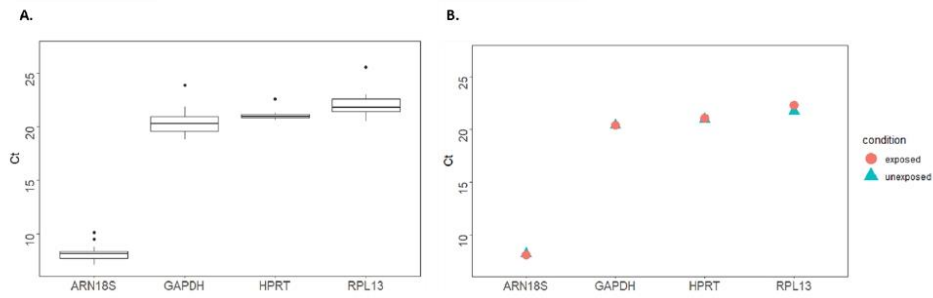
**Table S3**

**Primers for quantitative polymerase chain reaction analysis**

	<b>Genes</b>	<b>Forward primer (5'–3')</b>	<b>Reverse primer (5'–3')</b>
Housekeeping	GAPDH	AAAGGGTCATCATCTCTGCC	AGGGGTGCTAAGCAGTTGGT
	HPRT	TTGCTTTCCTTGGTCAGGCA	ATCCAACACTTCGTGGGGTC
	ARN18S	GGTAACCCGTTGAACCCCAT	TGTGTACAAAGGGCAGGGAC
	RPL13	GAATGGCATGGTCTTGAAGC	GCTTGCCGGCCCTTAC
Inflammation	IL-1 $\beta$	GCCATGGACAAGCTGAGGAA	TCGTGCACATAAGCCTCGTT
	IL-6	GAAAGCAGCAAAGAGGCACTG	CCAGTGATGATTTTACCAGGC
	IL-8	CTCAAACCTTTCCACCCCA	TTCTTGGGGTCCAGACAGA
	CXCL2	TCACAGTGTGTGGTCAACATTT	TCTCTGCTCTAACACAGAGGGGA
	CXCL10	AGCAGAGGAACCTCCAGTCT	ATGCAGGTACAGCGTACAGT
	GM-CSF	TGATGGCCAGCCACTACAAG	CCAGCAGTCAAAGGGGATGA
	MIF	ATCGTAAACACCAACGTGCC	GAAGGCCATGAGCTGGTCC
	TLR4	CCTGAGGCATTTAGGCAGCTA	TGGATGGGGTTTCTGTCAA
	Nf $\kappa$ B	GCTTAGGAGGGAGAGCCAC	AACATTTGTTCCAGCCTTCCC
Oxidative stress	Nrf2	TGAGCAAGTTTGGGAGGAGC	TGGCTTCTGGACTTGAACC
	SOD	CATTGCATCATTGGCCGCA	CCACAAGCCAAACGACTTCC
	NOX1	TTGGGTCAACATTGGCCTGT	AAGGACAGCAGATTGCGACA
	HMOX1	CTTTCAGAAGGGCCAGGTGA	GTAGACAGGGGCGAAGACTG
	NOS2	GGTGACACACCTATTCCC	GCACATCCCCGCAAACATAG
Mucus production	MUC5AC	TAATGTGCTGACCAAGCCCTG	TTGATCACCACCACCGTCTG
	MUC5B	TTCCCTGCCACATGTGTACC	CCGGCCACTCTCTGTACTC
Cell growth	EGF	TGTTCATGTGCTCCTCCTG	CCTGCGACTCCTCACATCTC
	TGF- $\beta$ 1	AGGGCTACCATGCCAATTC	CCCGGGTTATGCTGGTTGT
Autophagy	BECN1	AAACCAGGAGAGACCCAGGA	GGGGGATGAATCTGCGAGAG
Metabolism	AhR	CCAGGCCAACAGGCATTTTAA	TCTGACGGATGATGAAGTGGC
	CYP1B1	AGTGAGGGCAGCAGGTGT	GTTCCGGGCTGAGGCTGG
	CYP2B6	CTTACCGGTACACCTGGGAC	CGACCATGGCGATTTTCCC
	CYP2S1	TTTGCTGTTTGTCTGGGACGA	CCGATTCAGCTCCTCACGTA
Epigenetic	DNMT1	TCTTCGGCAACATCCTGGAC	CTCGGGCITTGGCCAACATA
	DNMT3a	CAGGGCAAAGACCAGCATTT	CAAGCGGCTCATGTTGGAGA
	DNMT3b	GCCATTTCGAGTCCTGTCAT	CACGGTTCCAACAGCAATGG
	TET1	TTCCCCGAATCAAGCGGAAG	ACTTCAGGTTGCACGGTCTC
	HDAC1	CATCGCTGTGAATTGGGCTG	CCCTCTGGTGATACTTTAGCAG
	HDAC2	TGGCCTTCTGAGCTGATTTT	AGCCACTGAAACAAGACTTCAT
	HDAC3	AGTCAGCCCCACCAATATGC	TGTGTAACGCGAGCAGAACT
	HDAC6	TGGTTGAAACGCTAGGGGC	TCTGCCTACTTCTTCGCTGC
	CREBBP	CACAGAACCAGTCCCGTCA	CTGTGACACGCTGTTTGG
	EP300	GCAGTGTGCCAAACCAGATG	GGGTTTGCCGGGGTACAATA

**Figure S1**

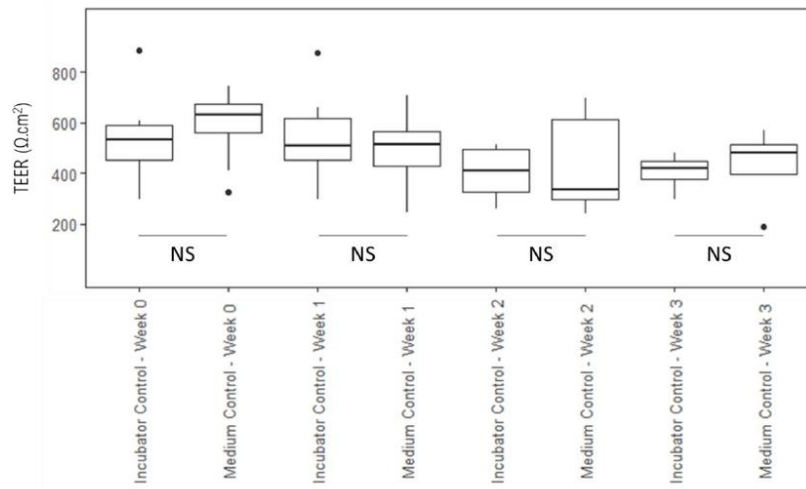
**Evaluation of four housekeeping genes' RNA transcription levels. A.** RNA transcription of housekeeping genes in absolute Ct values over all epithelia probes (n = 24). Gray bars represent the 25/75 percentiles, whisker caps the 10/90 percentiles, the line marks the median, and dots all outliers. **B.** Comparison of the housekeeping genes' average RNA transcription in absolute Ct values for unexposed and exposed epithelia (n = 12 for each condition).



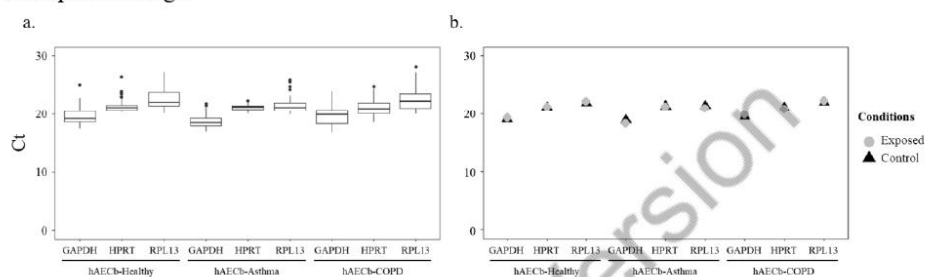
**Figure S2**

**TEER values of reconstructed epithelia before exposure (Week 0) and after 1, 2 or 3 weeks (week1, week 2, week 3) of exposure for Medium Control group (10 $\mu$ L drop) and Incubator Control group (no exposure).**

Each box plot was constructed with at least four TEER values. A Student test was performed to compare TEER values in each group and for each week. P-values were considered statistically significant when  $< 0.05$ . For both condition, TEER values measured were greater than or equal to 200  $\Omega$ .cm<sup>2</sup>. No significant difference (NS) was observed between Medium Control and Incubator Control during the four weeks. Therefore, repeated deposition of 10 $\mu$ L drop of nutrient medium on the apical surface had no impact on tissue integrity.



**Figure S1:** Evaluation of the RNA transcription levels of three housekeeping genes: *GAPDH*, *HPRT*, and *RPL13*. (a) Distribution of Ct values of the three housekeeping genes on hAECb from donors without respiratory disease (hAECb-Healthy) or with respiratory disease (hAECb-Asthma or hAECb-COPD). The box represents the IQR, with the median marked by a horizontal line inside the box. The whiskers extend to the minimum and maximum values within 1.5 times the IQR. Outliers are depicted as individual points beyond the whiskers. (b) Comparison of the housekeeping genes' median RNA transcription in absolute Ct values for control and exposed hAECb from donors without respiratory disease (hAECb-Healthy) or with respiratory disease (hAECb-Asthma or hAECb-COPD). COPD, chronic obstructive pulmonary disease; Ct, cycle threshold; hAECb, human airway epithelial cells of bronchial origin; IQR, interquartile range.



**Table S1.** Chemical composition ( $\mu\text{g/g}$ ) of  $\text{PM}_{2.5-0.3}$  collected under industrial influence (wPM).

	wPM ( $\mu\text{g/g}$ )
Al	23800
As	10.0
Ba	285
Cd	10.0
Co	19.8
Cr	266
Cu	276
Fe	87549
Mn	6692
Mo	22.3
Ni	467
P	1030
Pb	246
Sn	46.8
Sr	140.9
Ti	1288



	<b>wPM (µg/g)</b>
<b>V</b>	134
<b>Zn</b>	1841
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	37106
<b>K<sup>+</sup></b>	6677
<b>Mg<sup>2+</sup></b>	9307
<b>Na<sup>+</sup></b>	41178
<b>NH<sub>4</sub><sup>+</sup></b>	12497
<b>Cl<sup>-</sup></b>	54882
<b>NO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>	116133
<b>SO<sub>4</sub><sup>2-</sup></b>	53062
<b>Total carbon</b>	149000
<b>Naphthalene</b>	1.1
<b>Acenaphthylene</b>	0.2
<b>Acenaphthene</b>	0.0
<b>Fluorene</b>	0.3
<b>Phenanthrene</b>	1.9
<b>Anthracene</b>	0.6
<b>Fluoranthene</b>	6.0
<b>Pyrene</b>	5.2
<b>Benz[a]anthracene</b>	10.1
<b>Chrysene</b>	20.5
<b>Benzo[b]fluoranthene</b>	20.0
<b>Benzo[k]fluoranthene</b>	7.1
<b>Benzo[a]pyrene</b>	15.5
<b>Indeno[1,2,3-c,d]pyrene</b>	16.9
<b>Dibenz[a,h]anthracene</b>	18.2
<b>Benzo[g,h,i]perylene</b>	12.8
<b>Total PAHs</b>	136.4

**Table S2:** Information on hAECb and donor characteristics. Certificates of analysis were provided by Epithelix©. hAECb, human airway epithelial cells of bronchial origin.

	<b>hAECb</b>		
<b>Status</b>	Healthy	Asthma	COPD
<b>Batch number</b>	02AB0793.01	AB0062	02AB066702
	<b>Cell information</b>		
<b>Cell type</b>	hAEC/Bronchial		
<b>Date of cryopreservation</b>	11/2018	09/2008	10/2015
	<b>Donor information</b>		
<b>Age</b>	62	36	65
<b>Sex</b>	Male	Male	Male
<b>Origin</b>	Hispanic	Not known	Hispanic
<b>Smoker</b>	No	No	Yes
<b>Pathology</b>	No pathology reported	Asthma	COPD
	<b>Quality control</b>		
<b>Sterility</b>	Yes	Yes	Yes
<b>Mycoplasma</b>	Negative	Negative	Negative
<b>Viability</b>	> 80%	> 80%	> 80%
<b>Virus testing (HIV-1, HIV-2, hepatitis B, hepatitis C)</b>	Negative	Negative	Negative

**Table S2:** Primers for quantitative polymerase chain reaction analysis.

	<b>Genes</b>	<b>Forward primer (5'–3')</b>	<b>Reverse primer (5'–3')</b>
<b>Housekeeping</b>	<i>GAPDH</i>	AAAGGGTCATCATCTCTGCC	AGGGGTGCTAAGCAGTTGGT
	<i>HPRT</i>	TTGCTTTCCTTGGTCAGGCA	ATCCAACACTTCGTGGGGTC
	<i>RPL13</i>	GAATGGCATGGTCTTGAAGC	GCTTGCCGGGCCTTAC
<b>Inflammation</b>	<i>IL-6</i>	GAAAGCAGCAAAGAGGCACTG	CCAGTGATGATTTTACCAGGC
	<i>IL-8</i>	CTCCAAACCTTCCACCCCA	TTCCTGGGGTCCAGACAGA
	<i>GM-CSF</i>	TGATGGCCAGCCACTACAAG	CCAGCAGTCAAAGGGGATGA
	<i>CXCL10</i>	AGCAGAGGAACCTCCAGTCT	ATGCAGGTACAGCGTACAGT
<b>Metabolism</b>	<i>AhR</i>	CCAGGCCAACAGGCATTTTTA	TCTGACGGATGATGAAGTGGC
	<i>CYP1B1</i>	AGTGAGGGCAGCAGGTGT	GTTCGGGCTGAGGCTGG
	<i>CYP1A1</i>	CAACCCTTCCTGAATGCCT	TGCTTCTCCTGACAGTGCTC

AhR, aryl hydrocarbon receptor; GM-CSF, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; IL, interleukin.

**Table S3:** P-values for cytokines/chemokine (IL-8, IL-6, GM-CSF) level comparisons following exposure to different PM fractions (wPM, O-PM, Ne-PM, recPM) versus control condition for one concentration (3 or 6 µg/cm<sup>2</sup>), one time (6 hours or 24 hours), and one status (Healthy, Asthma, COPD). \*\*\*P > 0.001; \*\*P > 0.01; \*P > 0.05. COPD, chronic obstructive pulmonary disease; GM-CSF, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; h, hours; IL, interleukin; Ne-PM, non-extractable fraction of PM; NS, not significant; O-PM, organic fraction of PM; PM, particulate matter; recPM, recombined fraction; wPM, whole PM.

	IL-8						IL-6						GM-CSF																																				
	6 h			24 h			6 h			24 h			6 h			24 h																																	
	3 µg/cm <sup>2</sup>	6 µg/cm <sup>2</sup>	3 µg/cm <sup>2</sup>	6 µg/cm <sup>2</sup>	3 µg/cm <sup>2</sup>	6 µg/cm <sup>2</sup>	3 µg/cm <sup>2</sup>	6 µg/cm <sup>2</sup>	3 µg/cm <sup>2</sup>	6 µg/cm <sup>2</sup>	3 µg/cm <sup>2</sup>	6 µg/cm <sup>2</sup>	3 µg/cm <sup>2</sup>	6 µg/cm <sup>2</sup>	3 µg/cm <sup>2</sup>	6 µg/cm <sup>2</sup>																																	
Healthy	wPM	1.682e-07 ***	0.154 NS	1.646e-07 ***	0.023 *	5.621e-04 ***	0.014 *	3.775e-15 ***	4.33e-15 ***	0.442 NS	1.618e-04 ***	4.63e-14 ***	4.607e-14 ***	O-PM	1.251e-05 ***	3.894e-12 ***	7.394e-08 ***	0.173 NS	4.369e-04 ***	1.56e-08 ***	2.432e-14 ***	0.037 *	3.643e-07 ***	4.559e-10 ***	Ne-PM	1.944e-07 ***	0.106 NS	2.44e-07 ***	5.327e-04 ***	0.003 **	2.225e-04 ***	7.216e-15 ***	3.553e-15 ***	1 NS	4.652e-14 ***	4.607e-14 ***	recPM	5.211e-10 ***	3.894e-12 ***	3.695e-04 ***	5.94e-14 ***	1.06e-08 ***	2.468e-10 ***	1.049e-10 ***	3.553e-15 ***	0.005 **	0.002 **	0.006 **	4.607e-14 ***
	wPM	1.985e-08 ***	2.511e-12 ***	0.989 NS	0.395 NS	1.661e-07 ***	2.217e-12 ***	0.013 *	0.997 NS	0.724 NS	0.048 *	2.071e-07 ***	1.458e-09 ***	O-PM	0.411 NS	4.352e-14 ***	0.547 NS	1.894e-05 ***	2.853e-04 ***	0.795 NS	5.031e-05 ***	0.345 NS	0.029 *	Ne-PM	1.648e-11 ***	2.998e-14 ***	0.079 NS	0.065 NS	0.013 *	1.87e-06 ***	0.999 NS	1 NS	0.284 NS	3.379e-06 ***	2.991e-05 ***	2.365e-07 ***	recPM	8.338e-14 ***	2.998e-14 ***	0.998 NS	0.998 NS	2.458e-04 ***	4.062e-10 ***	0.007 **	0.991 NS	3.983e-06 ***	6.980e-04 ***	3.667e-08 ***	
	wPM	8.348e-11 ***	2.032e-07 ***	0.120 NS	1 NS	0.016 *	6.484e-05 ***	6.308e-05 ***	1.672e-10 ***	3.002e-05 ***	4.332e-12 ***	0.092 NS	0.007 **	O-PM	7.605e-08 ***	0.006 **	1.875e-11 ***	1.951e-05 ***	2.003e-07 ***	0.134 NS	7.066e-09 ***	0.012 *	0.189 NS	Ne-PM	2.447e-07 ***	2.04e-06 ***	1.385e-09 ***	3.111e-07 ***	1.978e-07 ***	5.518e-07 ***	2.136e-08 ***	2.455e-09 ***	1.648e-10 ***	0.760 NS	0.108 NS	recPM	3.539e-04 ***	0.147 NS	2.215e-05 ***	3.636e-08 ***	0.001 **	8.301e-08 ***	1.393e-07 ***	0.039 *	6.795e-06 ***	1 NS	0.004 **		

**Table S4:** P-values after time-effect comparison (24 hours vs 6 hours) for one PM fraction (wPM, O-PM, Ne-PM, or recPM) at one concentration (3 or 6  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ), one biomarker (IL-6, IL-8, GM-CSF), and one status (Healthy, Asthma, COPD). Adjustment of the quantities of cytokines/chemokines secreted in relation to the secretion by unexposed cells was made and a linear regression model by contrast was applied (Wald test with multiplicity correction “Single-Step method”) (Hothorn et al. 2008). \*\*\*P > 0.001; \*\*P > 0.01; \*P > 0.05. COPD, chronic obstructive pulmonary disease; GM-CSF, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; IL, interleukin; Ne-PM, non-extractable fraction of PM; NS, not significant; O-PM, organic fraction of PM; PM, particulate matter; recPM, recombined fraction; wPM, whole PM.

		IL-8		IL-6		GM-CSF	
		3 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	6 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	3 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	6 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	3 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	6 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$
wPM	Healthy	0.898 NS	0.982 NS	1.76e-5 ***	8.29e-7 ***	0 ***	4.84e-09 ***
	Asthma	5.06e-4 ***	2.14e-07 ***	3.76e-10 ***	1.87e-8 ***	2.38e-4 ***	0 ***
	COPD	0 ***	3.05e-05 ***	0.09 NS	9.85e-5 ***	8.95e-08 ***	7.78e-08 ***
O-PM	Healthy	7.21e-09 ***	1.50e-06 ***	1.8e-7 ***	7.72e-3 **	2.38e-09 ***	8.84e-05 ***
	Asthma	2.98e-08 ***	0.339 NS	3.55e-10 ***	1.57e-10 ***	0.122 NS	0.061 NS
	COPD	0 ***	2.85e-6 ***	2.53e-7 ***	1.68e-5 ***	0.933 NS	3.49e-07 ***
Ne-PM	Healthy	0.875 NS	0.504 NS	7.78e-5 ***	3.01e-6 ***	0 ***	5.77e-13 ***
	Asthma	1.75e-09 ***	8.10e-15 ***	0.019 *	8.36e-3 **	1.13e-05 ***	0 ***
	COPD	0 ***	7.76e-10 ***	0.04 *	0.136 NS	7.627e-08 ***	4.899e-06 ***
recPM	Healthy	9.13e-3 **	4.44e-16 ***	0.941 NS	2.44e-12 ***	7.82e-07 ***	9.77e-15 ***
	Asthma	0.145 NS	0.078 NS	1.11e-16 ***	1.27e-14 ***	0.013 *	1.32e-08 ***
	COPD	1.63e-13 ***	1.33e-6 ***	8.12e-4 ***	1.59e-5 ***	8.78e-4 ***	4.36e-3 ***

**Table S5:** P-values after PM fraction comparison (wPM vs O-PM, wPM vs Ne-PM, wPM vs recPM, Ne-PM vs O-PM) for one concentration (3 or 6 µg/cm<sup>2</sup>), one time (6 hours or 24 hours), one biomarker (IL-6, IL-8, GM-CSF), and one status (Healthy, Asthma, COPD). \*\*\*\*P > 0.001; \*\*P > 0.01; \*P > 0.05. COPD, chronic obstructive pulmonary disease; GM-CSF, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; h, hours; IL, interleukin; Ne-PM, non-extractable fraction of PM; NS, not significant; O-PM, organic fraction of PM; PM, particulate matter; recPM, recombined fraction; wPM, whole PM.

	IL-8						IL-6						GM-CSF										
	6 h		24 h		6 h		24 h		6 h		24 h		6 h		24 h		6 h		24 h				
	3 µg/cm <sup>2</sup>	6 µg/cm <sup>2</sup>	3 µg/cm <sup>2</sup>	6 µg/cm <sup>2</sup>	3 µg/cm <sup>2</sup>	6 µg/cm <sup>2</sup>	3 µg/cm <sup>2</sup>	6 µg/cm <sup>2</sup>	3 µg/cm <sup>2</sup>	6 µg/cm <sup>2</sup>	3 µg/cm <sup>2</sup>	6 µg/cm <sup>2</sup>	3 µg/cm <sup>2</sup>	6 µg/cm <sup>2</sup>	3 µg/cm <sup>2</sup>	6 µg/cm <sup>2</sup>	3 µg/cm <sup>2</sup>	6 µg/cm <sup>2</sup>	3 µg/cm <sup>2</sup>	6 µg/cm <sup>2</sup>			
Healthy	wPM vs O-PM	0.969 NS	1.95e-12 ***	1 NS	1.14e-05 ***	1 NS	2.40e-05 ***	0.133 NS	1.29e-13 ***	4.93e-05 ***	2.06e-09 ***	3.06e-10 ***	5.64e-13 ***	wPM vs Ne-PM	1 NS	0.910 NS	0.728 NS	0.638 NS	0.699 NS	0.192 NS	6.87e-06 NS	0.699 NS	0.031 *
	wPM vs recPM	1 NS	5.68e-11 ***	0.158 NS	1.36e-11 ***	3.71e-04 ***	1.87e-07 ***	6.57e-07 ***	2.54e-11 ***	4.57e-07 ***	1.89e-10 ***	0.999 NS	1.66e-03 **	Ne-PM vs O-PM	0.978 NS	2.65e-12 ***	1.55e-03 **	0.989 NS	9.66e-15 ***	2.18e-07 ***	5.37e-04 ***	1.16e-09 ***	8.91e-10 ***
	wPM vs O-PM	1.34e-10 ***	4.59e-04 ***	0.856 NS	0.569 NS	0.534 NS	1.89e-08 ***	2.19e-04 ***	0.999 NS	0.016 *	0.071 NS	1.41e-05 ***	5.32e-07 ***	wPM vs Ne-PM	9.36e-03 **	1.48e-08 ***	0.876 NS	1.24e-03 **	3.54e-06 ***	0.024 *	8.54e-03 NS	0.441 NS	0.063 NS
	wPM vs recPM	3.27e-07 ***	1.29e-07 ***	1 NS	0.856 NS	0.083 NS	0.115 NS	1 NS	1 NS	4.36e-09 ***	0.177 NS	0.033 *	0.302 NS	Ne-PM vs O-PM	3.14e-13 ***	0.062 NS	0.033 NS	0.504 NS	0.484 NS	0.991 NS	4.78e-03 **	5.90e-04 ***	
COPD	wPM vs O-PM	0.116 NS	5.17e-03 **	1.25e-08 ***	7.26e-05 ***	1 NS	0.633 NS	0.160 NS	0.188 NS	1.68e-03 **	3.45e-04 ***	2.76e-06 ***	0.907 NS	wPM vs Ne-PM	0.041 *	0.799 NS	0.165 NS	0.099 NS	0.951 NS	1.72e-04 ***	0.177 NS	1.22e-03 **	0.999 NS
	wPM vs recPM	2.97e-05 ***	1.87e-04 ***	0.057 NS	2.28e-07 ***	1.61e-03 **	0.985 NS	0.236 NS	0.503 NS	0.067 NS	1.39e-08 ***	0.077 NS	1 NS	Ne-PM vs O-PM	1 NS	0.129 NS	2.59e-03 **	0.916 NS	1.94e-09 ***	0.259 NS	0.431 NS	0.999 NS	
	wPM vs O-PM	1 NS	0.129 NS	0.572 NS	0.839 NS	0.308 NS	2.59e-03 **	1 NS	0.916 NS	1.94e-09 ***	0.259 NS	0.431 NS	0.999 NS										