



HAL
open science

Toxicité pulmonaire in vitro de mélanges complexes de polluants de l'air intérieur : effets d'une exposition répétée à l'Interface Air-Liquide (IAL)

Carine El Hajjar

► To cite this version:

Carine El Hajjar. Toxicité pulmonaire in vitro de mélanges complexes de polluants de l'air intérieur : effets d'une exposition répétée à l'Interface Air-Liquide (IAL). Médecine humaine et pathologie. Normandie Université, 2023. Français. NNT : 2023NORMC427 . tel-04832453

HAL Id: tel-04832453

<https://theses.hal.science/tel-04832453v1>

Submitted on 12 Dec 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.



Normandie Université



UNIVERSITÉ
CAEN
NORMANDIE

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité ASPECTS MOLECULAIRES ET CELLULAIRES DE LA BIOLOGIE

Préparée au sein de l'Université de Caen Normandie

Toxicité pulmonaire in vitro de mélanges complexes de polluants de l'air intérieur : effets d'une exposition répétée à l'Interface Air-Liquide (IAL)

Présentée et soutenue par
CARINE EL HAJJAR

Thèse soutenue le 11/12/2023
devant le jury composé de

MME ARMELLE BAEZA	Professeur des universités, Université Paris Cité	Rapporteur du jury
M. THIERRY ORSIERE	Ingénieur HDR, UNIVERSITE AIX MARSEILLE 1 PROVENCE	Rapporteur du jury
M. GUILLAUME GARCON	Professeur des universités, Université de Lille	Membre du jury
MME IVANNAH POTTIER	Maître de conférences, Université de Caen Normandie	Membre du jury
MME VALERIE LECUREUR	Professeur des universités, Université de Rennes (EPE)	Président du jury
MME VERONIQUE ANDRE	Maître de conférences, Université de Caen Normandie	Directeur de thèse

Thèse dirigée par **VERONIQUE ANDRE (Aliments bioprocédés toxicologie environnements)**



Normande de Biologie Intégrative,
Santé, Environnement



Aliments Bioprocédés
Toxicologie Environnements

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier les deux rapporteurs de ma thèse, le **Pr Armelle Baeza** et **Mr Thierry Orsière** de m'avoir fait l'honneur d'évaluer mon travail. Je tiens à exprimer ma profonde gratitude envers les autres éminents membres du jury, **Pr Valérie Lecureur** et **le Pr Guillaume Garçon**, pour avoir pris le temps d'examiner ce manuscrit de thèse. C'est un plaisir de vous avoir dans mon jury !

Je remercie également les membres de mon comité de suivi de thèse et en particulier le **Dr Aline Hajj** qui m'a accompagnée dans mon parcours académique depuis la licence et qui m'a fait découvrir le domaine de la pharmacie.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance au **Dr Véronique André**, ma directrice de thèse. Je vous remercie de l'intérêt que vous portez à ce projet et le temps que vous avez consacré pour la réalisation de ce travail. Je profite de cette occasion pour exprimer mon admiration pour votre passion pour la recherche scientifique et votre connaissance vaste dans ce domaine. Ce travail ne serait pas réalisé avec perfection sans votre professionnalisme et vos compétences dans le domaine de la toxicologie.

Merci aussi au **Dr Ivannah Pottier**, ma co-encadrante de thèse, pour son investissement dans l'élaboration de ce projet et l'accompagnement que vous m'avez accordé de près ou de loin tout au long de ce travail.

Je tiens à exprimer ma gratitude à **Mme Hélène Desqueyroux**, la coordinatrice technique du projet au sein de l'Agence de la transition écologique (ADEME), pour le suivi de l'avancement de mon travail durant les réunions du comité de pilotage du projet et pour m'avoir accordé une prolongation de mon contrat pour achever le travail.

Mes remerciements vont **aux collègues de l'équipe ToxEMAC** (Toxicologie de l'Environnement, Milieux Aériens et Cancers) pour leur soutien, leurs conseils et leur amitié.

Un grand merci également au **Pr François Sichel**, directeur de l'unité de recherche ABTE (Aliments Bioprocédés Toxicologie et Environnement), de m'avoir accueillie au sein du laboratoire et de m'avoir accordé des missions d'enseignement au sein de l'UFR de Santé et des Sciences avec une telle confiance.

Au **Dr Mathilde Lechevrel**, maître de conférences, ce fut un réel plaisir d'avoir travaillé à vos côtés pour la réalisation des travaux pratiques de toxicologie cellulaire mais également d'avoir échangé avec vous sur la culture de mon pays.

A **Mme Carine Laurent**, je suis véritablement reconnaissante de votre aide en particulier en microscopie à fluorescence et spectrophotomètre.

A **Mme Maryline Guillamin**, technicienne de la plateforme de cryométrie en flux, je tiens à vous remercier pour avoir généreusement partagé avec moi votre savoir en cytométrie.

Au **Dr Stéphanie Gente** et au **Dr Antoine Géry** pour leur aide indispensable dans les PCR.

Au **Dr Virginie Seguin** et au **Pr David Garon** pour avoir apporté à ce projet leur expertise en mycologie.

A **Mme Mélody Mahier**, technicienne de laboratoire, de m'avoir aidée dans la réalisation des dosages en ELISA.

Aux anciens doctorants : **Adeline Clergé, Héléna Alamil, Ilham Benjelloun, Samia Chaouini et Antoine Géry**, pour toutes les sorties que nous avons effectuées ensemble et je vous souhaite du succès dans vos carrières professionnelles.

À tous les stagiaires rencontrés au laboratoire ou avec lesquels j'ai collaboré sur mon projet, notamment **Nadira Iamarene, Victor Lecannuet, Angèle Rauline...**

Merci à tous les **collaborateurs du projet « ToxiALMix »**, sans qui ce travail n'aurait pas vu le jour.

Mes remerciements s'adressent spécifiquement au **Pr Valérie Lecureur** et à **Mme Marie Lelong** de l'équipe « Contaminants environnementaux et barrière pulmonaire » de l'IRST-UMR Inserm 1085, pour leur précieuse collaboration et leur expertise en immuno-toxicologie. Je suis également reconnaissante pour l'attention que vous avez porté à mes sollicitations et pour votre disponibilité à répondre à mes questions.

Un grand merci à mes amis d'enfance **Noura, Mada et Ahmad** pour votre soutien à distance mais également à mes amis **Carine, Reine, Rima, Karim, Ali, Hoda, Alexandre et Mira** pour tous les moments de joies et de rires partagés ensemble en France. Merci d'être présents dans ma vie.

Toute ma gratitude à ma chère **famille** qui m'a énormément soutenue, notamment mes parents et mes sœurs. Je vous remercie infiniment. Merci pour votre encouragement et votre soutien morale.

Finalement, je tiens à remercier aussi tous ceux qui ont cru en moi et qui ont contribué à la réussite de cette thèse par leur soutien et leurs conseils.

Collaborations

Ce doctorat a été réalisé dans l'unité de recherche ABTE EA4651 au sein de l'équipe ToxEMAC, dirigée par le Pr François Sichel. L'unité ABTE, créée en 2012, regroupe des enseignants-chercheurs et chercheurs des Universités de Caen et de Rouen (UFR Médecine-Pharmacie). L'équipe ToxEMAC, dirigée par le Pr Christelle Monteil, s'est spécialisée dans l'évaluation des effets toxiques des polluants aériens sur différents modèles d'étude *in vitro* (bactéries, cellules humaines épithéliales d'origine alvéolaire ou bronchique et tranches de poumons) et *in vivo* (rats). Ce projet de thèse, a été mené en partenariat avec le Pr Valérie Lecureur et Mme Marie Lelong (équipe « contaminants environnementaux et barrière pulmonaire » de l'UMR Inserm 1085 de l'Institut de Recherche sur la Santé, l'Environnement et le Travail (IRSET) à Rennes) qui s'intéressent à la santé environnementale dans le domaine des pathologies respiratoires chez l'Homme.



UNIVERSITÉ
CAEN
NORMANDIE



UR ABTE
EA-4651
Aliments Bioprocédés
Toxicologie Environnements



Financements

Ce doctorat s'inscrit dans le cadre du projet « ToxIAlMix », financé par l'ADEME pour une durée de 66 mois et un montant alloué de 215 500 €.

La thèse a été soutenue par une bourse doctorale régionale de la région Normandie (RIN100) (39 mois) cofinancée par l'ADEME (6 mois).



Table des matières

Valorisation Scientifique.....	1
Liste des figures.....	3
Liste des tableaux.....	6
Liste des abréviations	7
Avant-propos	13
État de l'Art.....	16
1. Pollution de l'air intérieur.....	17
1.1. Généralités.....	17
1.2. Polluants particuliers de l'air intérieur	18
1.2.1. Sources d'émission	18
1.2.2. Composition chimique	20
1.2.3. Granulométrie et forme.....	21
1.2.4. Poussières sédimentées.....	22
2. Inhalation des polluants particuliers	24
2.1. Rappels anatomiques.....	24
2.2. Mécanismes de dépôts des particules.....	29
2.3. Mécanismes de défense	30
3. Impacts sanitaires de l'inhalation d'aérosols issus de l'air intérieur	34
3.1. Effets sur les populations exposées.....	34
3.2. Mécanismes de toxicité des particules.....	37
3.2.1. Stress oxydant.....	37
3.2.2. Inflammation.....	40
3.2.3. Génotoxicité.....	40
4. Règlementations	41
5. Évaluation de la pneumotoxicité <i>in vitro</i>	45
5.1. Méthodes comparées	45

5.1.1.	Modèles cellulaires pulmonaires	45
5.1.1.1.	Lignées cellulaires	45
5.1.1.2.	Cellules primaires.....	47
5.1.1.3.	Organoïdes et organes-sur-puce	49
5.1.2.	Conditions de culture et d'exposition.....	51
5.1.2.1.	Culture en immergé	51
5.1.2.2.	Culture à l'interface air-liquide (IAL) et Vitrocell®	51
5.1.2.3.	Co-culture.....	53
5.1.2.4.	Expositions répétées.....	54
5.2.	Toxicité in vitro des polluants particulaires de l'air intérieur.....	55
6.	Objectifs et apports innovants du projet	56
6.1.	Matériel Standard de Référence (SRM® 2585).....	56
6.1.1.	Définition	56
6.1.2.	Composition chimique	57
6.1.3.	Toxicité du SRM 2585®	58
6.2.	Choix du modèle cellulaire, du mode d'exposition et des concentrations	59
	Matériels et Méthodes	61
1.	Caractérisation des propriétés intrinsèques des poussières en conditions acellulaires	62
2.	Système VITROCELL® Cloud MAX	63
2.1.	Dispositif	63
2.2.	Mesures préalables des masses de particules déposées	64
2.3.	Efficacité du dépôt	66
2.4.	Préparation et calibration des échantillons de poussières.....	67
3.	Effets biologiques et moléculaires de l'exposition des NHBE différenciées aux PM₁₀ ..	68
3.1.	Modèle cellulaire : cellules NHBE	68
3.1.1.	Protocole de mise en prolifération : Culture en immergée.....	68
3.1.2.	Protocole de différenciation cellulaire à l'IAL sur inserts.....	69
3.1.3.	Protocoles d'exposition des cellules.....	70

3.1.3.1.	Exposition des NHBE non différenciés en immergé	70
3.1.3.2.	Exposition des NHBE différenciés sur inserts aux PM ₁₀	70
3.2.	Microscopie.....	72
3.2.1.	Coloration des différents types cellulaires	72
3.2.2.	Microscopie Électronique	72
3.3.	Paramètres biologiques analysés	73
3.3.1.	Mesure du TEER	73
3.3.2.	Activité métabolique : test au Bleu Alamar	74
3.3.3.	Dosage des mucines : méthode « Sandwich Enzyme Linked Lectin Assay » (ELLA)	75
3.3.4.	Dosage des cytokines : méthode « Enzyme-linked immunosorbent assay » (ELISA)	76
3.3.5.	Production d'ERO.....	76
3.3.6.	Expression de gènes d'intérêt par RT-qPCR.....	77
3.3.6.1.	Extraction et purification d'ARN des cellules NHBE	77
3.3.6.2.	Niveaux d'expression d'un panel de gènes impliqués dans le stress oxydant et la génotoxicité	78
3.3.6.2.1.	Transcription Inverse.....	78
3.3.6.2.2.	qPCR : Kit Qiagen.....	78
3.3.6.3.	Expression de gènes codant pour des cytokines et des mucines	79
3.3.6.3.1.	Préparation des banques d'ADNc	79
3.3.6.3.2.	Choix des amorces et validation	80
i.	PCR classique.....	80
ii.	Electrophorèse.....	81
3.3.6.3.3.	PCR quantitative en temps réel.....	82
4.	Co-exposition des NHBE différenciées aux PM₁₀ à l'IAL et aux milieux « conditionnés » des cellules MDM exposées aux PM_{2,5}	83
4.1.	Protocole d'exposition des MDM aux PM _{2,5} en immergé.....	83
4.2.	Protocole de la co-exposition	84

4.3. Paramètres étudiés après la co-exposition	85
5. Analyses statistiques	86
Résultats et Discussions.....	87
1. Caractérisation des propriétés intrinsèques des différentes fractions de poussières en condition acellulaire	88
1.1. Objectifs	88
1.2. Principaux résultats.....	88
1.3. Discussion partielle	90
2. Evaluation de la toxicité sur le modèle NHBE non différencié : viabilité et réponse inflammatoire.....	92
3. Mutagénicité des particules.....	97
4. Caractérisation du pseudo-épithélium	98
4.1. Différenciation des cellules NHBE sur inserts.....	98
4.2. Intégrité du tapis cellulaire	99
5. Evaluation de la toxicité des PM₁₀ sur le modèle NHBE différencié	101
5.1. Altérations morphologiques	101
5.2. Mesure du TEER	105
5.3. Viabilité cellulaire.....	106
5.4. Sécrétion du mucus et expression des mucines	108
5.5. Battement ciliaire.....	111
5.6. Evaluation de la réponse cellulaire pro-oxydante	112
5.7. Evaluation de la réponse inflammatoire.....	115
5.8. Evaluation de la génotoxicité.....	119
6. Evaluation de la co-exposition des NHBE différenciées aux PM₁₀ à l'IAL et aux milieux « conditionnés » des MDM exposées aux PM_{2,5}.....	120
6.1. Evaluation de la réponse cellulaire pro-oxydante	121
6.2. Evaluation de l'effet inflammatoire	122
6.3. Evaluation de l'expression de mucines.....	125
Discussion Générale.....	127

1. Caractérisation physico-chimique complémentaire des PM ₁₀	128
2. Effets biologiques des PM ₁₀ vis-à-vis du pseudo-épithélium trachéo-bronchique	129
3. Réponses biologiques du pseudo-épithélium à une co-exposition aux PM ₁₀ et aux milieux « conditionnés » issus des macrophages exposés aux PM _{2,5}	134
Conclusions et Perspectives	136
Références Bibliographiques.....	139
Annexes	166
Formations	181
Mission d'enseignement.....	182
Encadrement de stagiaires	183
Activités administratives.....	184

Valorisation Scientifique

Publications

El Hajjar C., Rogez-Florent T., Seguin V., Verdin A., Garon D., Pottier I. & André V. (2022). **Intrinsic Characteristics and Biological Effects of Standard Reference Indoor Dust SRM® 2585 and Its Inhalable Subfractions PM₁₀ and PM_{2.5}**. *Atmosphere*, 13(11), 1818. <https://doi.org/10.3390/atmos13111818>

El Hajjar C., Rogez-Florent T., Seguin V., Pottier I. & André V. (2022). **The biological effects of repeated exposure of Normal Human Bronchial Epithelial (NHBE) cells to the PM₁₀ fraction of indoor dust**. Indoor Air 2022 conference, 17th International Conference on Indoor Air Quality and Climate. hal-04066879. <https://normandie-univ.hal.science/hal-04066879/>

Lelong M., El Hajjar C., Pottier I., André V & Lecureur V. (2022). **Impact of repeated exposure to indoor dust on human macrophage polarization profile**. Indoor Air 2022 conference, 17th International Conference on Indoor Air Quality and Climate. hal-04066882. <https://normandie-univ.hal.science/hal-04066882/>

Communications orales

El Hajjar C., Pottier I. & André V. **Toxicité pulmonaire in vitro de mélanges de polluants de l'air intérieur : effet d'une exposition répétée à l'Interface Air-Liquide (IAL)**. Société de Toxicologie Cellulaire et Moléculaire (STCM), Journée des Jeunes Toxicologues. En ligne. Mars 2022.

El Hajjar C. **Comment respirer un air de meilleure qualité ?** « Animation d'une médiathèque normande », Fête de la Science 2021, Lisieux, France. Septembre 2021.

El Hajjar C., Pottier I., Lecureur V. & André V. **The biological effects of repeated exposure of monocyte-derived macrophages cells (MDM) and human bronchial epithelial cells (NHBE) to indoor airborne particles *in vitro***. Journées de l'École doctorale Normande de Biologie Intégrative, Santé, Environnement (EDnBISE). En ligne. Mai 2021.

Communications affichées

El Hajjar C., Rogez-Florent T., Seguin V., Pottier I. & André V. **The biological effects of repeated exposure of Normal Human Bronchial Epithelial (NHBE) cells to the PM₁₀ fraction of indoor**

dust. Indoor Air 2022, 17^{ème} Conférence Internationale de la Société internationale de la qualité de l'air intérieur et le climat, Kuopio, Finlande. Juin 2022.

Lelong M., El Hajjar C., Pottier I., André V & Lecureur V. **Impact of repeated exposure to indoor dust on human macrophage polarization profile.** Indoor Air 2022, 17^{ème} Conférence Internationale de la Société internationale de la qualité de l'air intérieur et le climat, Kuopio, Finlande. Juin 2022.

Liste des figures

Figure 1. Structure de l'appareil respiratoire. Adapté de (BéruBé et al., 2009).	25
Figure 2. Schéma simplifié de la structure de l'épithélium trachéo-bronchique, bronchiolaire et alvéolaire. La couche épithéliale passe progressivement de pseudo-stratifiée à cuboïde, puis à pavimenteuse. Adapté de (BéruBé et al., 2009).	26
Figure 3. Mécanismes de dépôt des particules inhalées dans les voies respiratoires. Adapté de (Mossman et al., 2011).	30
Figure 4. Mécanisme de la clairance muco-ciliaire médié par l'épithélium respiratoire et la glande sous-muqueuse. Adapté de (Whitsett, 2018).	32
Figure 5. Voies de signalisation AhR et Nrf-2. Adapté de (Whitlock & Baek, 2012).	38
Figure 6. Epithélium pseudo-stratifié issu de cellules NHBE différenciées après 4 semaines de culture à l'IAL.	49
Figure 7. Structure poumon-sur-puce. Adapté de (Hiemstra et al., 2018).	50
Figure 8. Propriétés intrinsèques du SRM [®] 2585 total et de ses deux sous-fractions inhalables PM ₁₀ et PM _{2,5}	62
Figure 9. Réponses biologiques analysées après exposition en immergé des cellules NHBE non différenciées aux particules (SRM [®] 2585, PM ₁₀ et PM _{2,5}).	63
Figure 10. Présentation du système Vitrocell [®] Cloud MAX.	64
Figure 11. Signal QCM typique observé après nébulisation de 30 µL d'une suspension de particules sur la microbalance du système Vitrocell [®] Cloud MAX (logiciel Vitrocell [®] Monitor).	65
Figure 12. Protocole de mise en culture et de différenciation des cellules NHBE pour les expositions à l'IAL.	69
Figure 13. Protocole d'exposition répétée des cellules NHBE différenciées aux PM ₁₀ à l'IAL.	71
Figure 14. Suivi cinétique des paramètres étudiés (J8 et J11) après exposition des cellules NHBE différenciées aux PM ₁₀	72
Figure 15. Récapitulatif des travaux effectués sur les cellules MDM par Pr Valérie Lecureur et son équipe à l'IRSET à Rennes	84

Figure 16. Protocole de la co-exposition des cellules NHBE différenciées simultanément aux PM ₁₀ en apical (IAL) à l'aide du Vitrocell® et en basal aux milieux « conditionnés » des MDM exposées aux PM _{2,5} .	85
Figure 17. Potentiel oxydant intrinsèque du SRM® 2585, des PM ₁₀ et des PM _{2,5} évalué par la déplétion du DTT (A) et de l'AA (B)	89
Figure 18. Production intrinsèque d'ERO par le SRM® 2585, les PM ₁₀ et les PM _{2,5} mesurée à partir de la fluorescence émise par la sonde DCFDA	90
Figure 19. Effets biologiques mesurés sur les cellules NHBE non différenciées après 24 h (A) ; 48 h (B) et 72 h (C) d'exposition au SRM® 2585 ou à la fraction PM ₁₀	95
Figure 20. Analyse par microscopie optique de cellules NHBE différenciées après 2 semaines de culture à l'IAL. Coloration H&E et Bleu alcian (mise en évidence du mucus)	99
Figure 21. Analyse par MEB des cellules NHBE différenciées après 2 semaines de culture à l'IAL.	100
Figure 22. Valeurs du TEER mesuré à J2, J4, J8 et J11 sur des cellules « Témoins IAL ».	101
Figure 23. Analyse par MEB de cellules NHBE différenciées cultivées à l'IAL à J4.	102
Figure 24. Analyse par microscopie optique de cellules NHBE différenciées après culture à l'IAL à J4 (A) et (B) et à J11 (C) et (D). Coloration H&E et Bleu alcian.	103
Figure 25. Analyse par MET de cellules NHBE différenciées cultivées à l'IAL à J4 (A) et à J11 (B).	104
Figure 26. Valeurs du TEER ($\Omega.cm^2$) mesurées à J2, J4, J8 et J11 sur le tapis cellulaire du groupe « Témoin PBS » et des cellules exposées aux PM ₁₀ à 0,1 ; 1 et 6 $\mu g/cm^2/j$	105
Figure 27. Viabilité des cellules NHBE différenciées après 4 jours d'exposition consécutifs (J4) aux PM ₁₀ à 0,1 ; 1 et 6 $\mu g/cm^2/j$ et jusqu'à 7 jours post-exposition (J8 et J11)	107
Figure 28. Évaluation de la production du mucus par les NHBE différenciées après 4 jours consécutifs d'exposition (J4) aux PM ₁₀ à 1 et 6 $\mu g/cm^2/j$, puis en post-traitement à J8 et J11	109
Figure 29. Expression par rapport aux conditions « Témoin PBS » après 4 jours d'exposition répétée (à J4) des cellules NHBE différenciées aux PM ₁₀ à 1 et 6 $\mu g/cm^2/j$	110

Figure 30. Évaluation de la fonction ciliaire (à J7) visualisable par l'ajout de particules DEP à J4. De J1 à J4, le pseudo-épithélium a préalablement été laissé à l'air (groupe « Témoin IAL ») ou exposé au PBS (groupe « Témoin PBS ») ou aux PM ₁₀ (4 expositions à 1 et 6 µg/cm ² /j).	111
Figure 31. Production d'ERO par les cellules NHBE différenciées après 4 jours d'expositions consécutives aux PM ₁₀ (0,1 ; 1 et 6 µg/cm ² /j) à J4, J8 et J11.....	113
Figure 32. Niveaux d'excrétion de l'IL-6 (A), du MCP-1 (B) et de l'IL-8 (C) à J4, J8 et J11 des cellules NHBE différenciées exposées pendant 4 jours consécutifs au PBS ou aux PM ₁₀ à 1 et 6 µg/cm ² /j.....	116
Figure 33. Expression relative des cytokines (IL-6, MCP-1 et IL-8) par rapport aux conditions « Témoin PBS » après 4 jours d'expositions répétées des cellules NHBE différenciées aux PM ₁₀ à 1 et 6 µg/cm ² /j.....	118
Figure 34. Sécrétion de cytokines (IL-6, IL-8, TNF-α, CCL3/4, CXCL10 et IL-10) à J4 après 4 expositions consécutives des cellules MDM à 1 et 10 µg/cm ² /j de PM _{2,5}	123
Figure 35. Expression relative des cytokines (IL-6, MCP-1 et IL-8) par rapport aux conditions « Témoin PBS/M0 » à J4 après co-exposition des cellules NHBE différenciées aux PM ₁₀ à 1 et 6 µg/cm ² /j pendant 4 jours consécutifs et aux milieux de culture « conditionnés » issus de l'exposition des MDM aux PM _{2,5} (1 et 10 µg/cm ² /j) pendant 2 jours.....	124
Figure 36. Expression relative des mucines (MUC5AC et MUC5B) par rapport au Témoin « PBS/M0 » à J4 après co-exposition des cellules NHBE différenciées aux PM ₁₀ à 1 et 6 µg/cm ² /j pendant 4 jours consécutifs et aux milieux de culture « conditionnés » issus de l'exposition des MDM aux PM _{2,5} (1 et 10 µg/cm ² /j) pendant 2 jours.....	126

Liste des tableaux

<i>Tableau 1. Valeurs guides de qualité d'air intérieur (VGAI). Adapté de (ANSES, 2018) .</i>	<i>43</i>
<i>Tableau 2. Familles chimiques et nombre de substances constituant le SRM® 2585 en fonction du niveau de confiance des concentrations rapportées. D'après (NIST, 2018).</i>	<i>58</i>
<i>Tableau 3. Protocole de synthèse de l'ADN_c à partir de 25 ng d'ARN purifié (kit « QuantiTect® Whole Transcriptome », Qiagen).</i>	<i>79</i>
<i>Tableau 4. Caractéristiques des amorces utilisées en qPCR : nom de l'amorce, séquence de nucléotides, longueur de l'amplicon (en paires de bases (pb)) et température de fusion (T_m).</i>	<i>80</i>
<i>Tableau 5. Composition du mélange réactionnel pour l'amplification en PCR classique.</i>	<i>81</i>
<i>Tableau 6. Programme utilisé pour la PCR classique.</i>	<i>81</i>
<i>Tableau 7. Composition du mix réactionnel pour l'amplification en qPCR (kit « QuantiNova™ SYBR® Green PCR », Qiagen).</i>	<i>82</i>
<i>Tableau 8. Programme de qPCR (kit « QuantiNova™ SYBR® Green PCR », Qiagen).</i>	<i>83</i>
<i>Tableau 9. Effet mutagène des extraits organiques obtenus à partir du SRM® 2585 et des PM₁₀.</i>	<i>97</i>
<i>Tableau 10. Modulation de l'expression de gènes (Fold Regulation) impliqués dans la réponse cellulaire au stress oxydant après exposition des cellules NHBE aux PM₁₀ (1 et 6 µg/cm²/j).</i>	<i>114</i>
<i>Tableau 11. Modulation de l'expression de gènes (Fold Regulation) impliqués dans la réponse génotoxique après exposition des cellules NHBE aux PM₁₀ (1 et 6 µg/cm²/j).</i>	<i>120</i>
<i>Tableau 12. Modulation de l'expression de gènes impliqués dans le stress oxydant après co-exposition des cellules NHBE aux PM₁₀ (1 et 6 µg/cm²/j) et aux milieux « conditionnés » issus de l'exposition des MDM aux PM_{2,5} (1 et 10 µg/cm²/j) pendant 2 jours.</i>	<i>121</i>

Liste des abréviations

A

A549 : lignée de cellules épithéliale alvéolaire

AA : acide ascorbique

ACTB : gène bêta-actine

ADEME : Agence de la Transition Ecologique ; anciennement connu sous le nom d'Agence De l'Environnement et de la Maîtrise de l'Énergie

ADN_c : acide désoxyribonucléique complémentaire

AEC1 et 2 : « Alveolar Epithelial Cells » ; cellules épithéliales alvéolaires ou pneumocytes de type 1 et 2

Ag : argent

AgCl : chlorure d'argent

AhR : récepteur aryl hydrocarbone

Al : aluminium

ANSES : Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

AOX1 : aldéhyde oxydase 1

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

ARN_m : acide ribonucléique messager

ATP : adénosine triphosphate

B

B2M : gène bêta-2 microglobuline

BC : noir de carbone

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

BPCO : broncho-pneumopathie chronique obstructive

C

CaCl₂ : chlorure de calcium

CAT : catalase

CCL5 : chimiokine (C-C motif) ligand 5

CCSP : « Club Cell Secretory Protein », protéine des cellules Club

CD : diène conjugué plasmatique

CD8A : cluster de différenciation 8A

CDB : cassures doubles brins

CeO₂ : oxyde de cerium

C_{fluo.mesurée.insert} : concentration de fluorescéine mesurée sur l'insert

C_{fluo.mesurée.QCM} : concentration de fluorescéine mesurée sur la microbalance

C_{fluo.néb.} : concentration de fluorescéine nébulisée dans la chambre

C_{fluo.théorique.insert} : concentration théorique déposée sur l'insert
C_{fluo.théorique.QCM} : concentration théorique déposée sur la microbalance
CIRC : Centre International de Recherche sur le Cancer
CMAbio3 : Centre de Microscopie Appliquée à la Biologie (EMerode, UNICAEN, France).
CMR : Cancérogènes, Mutagènes et Reprotoxique
C_{néb.} : concentration de suspension particulaire nébulisée
CO : monoxyde de carbone
CO₂ : dioxyde de carbone
COSV : composés organiques semi-volatils
COV : composés organiques volatils
COX-2 : cyclo-oxygénase-2
Cr : chrome
CSB : cassures simple brin
C_t : « threshold cycle » ; cycle de seuil
Cu : cuivre
CVC : Chauffage, Ventilation et Climatisation
CXCL1 : « Human Growth-regulated alpha protein »
CXCL10 : « C-X-C motif chemokine ligand 10 »
CXCL6 : « Chemokine (C-X-C motif) ligand 6 »
CYBB : cytochrome b-245, bêta polypeptide
CYP 450 : cytochromes P450

D

DCFDA : dichlorodihydrofluorescéine
DCFH : 2',7'-dichloro-dihydrofluorescéine
DEP : « Diesel Exhaust Particles » ; particules de diesel
DMSO : diméthylsulfoxyde
DTT : dithiothreitol

E

EDTA : acide éthylènediaminetétraacétique
EFS : enceintes ferroviaires souterraines
EFS : Etablissement Français du Sang
ELISA : « Enzyme-linked immunosorbent assay »
ELLA : « Sandwich Enzyme Linked Lectin Assay »
EPA : « Environmental Protection Agency », Agence de Protection Environnementale
ERO : Espèces Réactives de l'Oxygène (ou ROS en anglais)

F

FANCG : Fanconi anemia, complementation group G
Fe : fer

Fluo_{blanc} : fluorescence du blanc

Fluo_{éch.traité} : fluorescence de l'échantillon traité

Fluo_{témoin négatif} : fluorescence du témoin négatif non exposé aux particules

G

GAPDH : gène glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase

GAPDH : glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase

GM-CSF : « Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor », facteur de stimulation des colonies de granulocytes et de macrophages

GPx : glutathion peroxydase

GPX3 : Glutathionne peroxydase 3 (plasma)

GSH : glutathion réduit

H

16-HBE14o- (16HBE) : « SV40ori-transformed Human Bronchial Epithelial Cell line »

H&E : Hématoxyline-Eosine

H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène

HAP : hydrocarbures aromatiques polycycliques (ou PAH en anglais)

hBEC : « human Bronchial Epithelial Cells »

HCN : Acide cyanhydrique

HCSP : Haut conseil de la santé publique

HeLa : cellules immortelles d'Henrietta Lacks issues d'un cancer de col de l'utérus

HEPES : acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique

HepG2 : « Hepatoblastoma cell line », lignée de cellules hépatiques d'un carcinome hépatocellulaire

HGDC : « Human Genomic DNA Contamination », témoin de contamination d'ADN génomique

HO-1 : hème oxygénase-1

HPRT1 : gène hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1

HUS1 : « HUS1 checkpoint homolog (S. pombe) »

I

I : intensité

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

IgA : immunoglobuline de type A

IL-10 : interleukine 10

IL-13 : interleukine 13

IL-1β : interleukine 1 bêta

IL-6 : interleukine 6

IL-8 : interleukine 8

INF : interféron

IP-10 : protéine 10

ITGAX : intégrine sous unité alpha X

L

LDH : lactate déshydrogénase

LPS : lipopolysaccharide

LYZ : lysozyme

M

M-CSF : « Macrophage Colony-Stimulating Factor », facteur de croissance macrophagique

MAO : monoamines oxydases

MCP-1 : « Monocyte Chemoattractant Protein 1 » (chemokine ligand 2), chimiokine des monocytes

MDA : malondialdéhyde plasmatique

MDM : « Monocyte-Derived Macrophages » ; macrophages dérivés de monocytes humains

MEB : microscope électronique à balayage

MET : microscope électronique à transmission

MIP-3 α : « Macrophage Inflammatory Protein-3 alpha »

Mn : manganèse

MT3 : Métallothionéine 3

MUC : protéines mucines

N

NaCl : chlorure de sodium

NADPH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate Hydrogène

NHBE : « Normal Human Bronchial Epithelial Cells » ; cellules épithéliales trachéo-bronchiques humaines normales

Ni : nickel

NIST : National Institute of Standards and Technology

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

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

NuLi-1 : lignée immortalisée de cellules épithéliales bronchiques humaines normales

O

O₂ : oxygène

O₂^{•-} : anion superoxyde

8-OH-dG : 8-hydroxy-2'-déoxyguanosine

OH[•] : radical hydroxyle

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

OQAI : Observatoire de la Qualité de l'Air Intérieur

P

pb : paire de base

Pb : plomb

PBDE : retardateurs de flamme polybromés

PBEC : « Primary Bronhial Epithelial Cells »

PBMC : « Peripheral Blood Mononuclear Cell », cellules mononuclées du sang périphérique

PCB : polychlorobiphényles

PCR : « Polymerase Chain Reaction », réaction en chaîne par polymérase

PFA : paraformaldéhyde

PFAA : acides perfluoroalkyles

PM : « Particulate Matter »

PNSE : Plan National Santé Environnement

PO : potentiel oxydant

PPC : « Positive PCR Control », témoin permettant de tester l'efficacité de la PCR

PRDX1 : peroxyredoxine 1

PTGS2 (COX-2) : « Prostaglandine-endoperoxyde synthase 2 »

PTPRC : « protein tyrosine phosphatase receptor type C »

PVC : poly-chlorure de vinyle

Q

QAI : Qualité de l'Air Intérieur

QCM : « Quartz Crystal Microbalance » ; microbalance à cristal de quartz

R

R : résistance

RAW 264.7 : « Macrophage-like, Abelson leukemia virus-transformed cell line derived from BALB/c mice », lignée de cellules macrophagiques

R_{Blanc} : résistance du blanc (même condition sans cellules ni exposition)

RIN : « RNA Integrity Number »

R_{mesurée} : résistance mesurée

RNS : espèces réactives de l'azote

RPLP0 : « ribosomal protein lateral stalk subunit P0 »

RTC : « Reverse Transcription Control », témoin évaluant l'efficacité de la transcription inverse

S

SAEC : « Small Airway Epithelial Cells »

S_{chambre} : surface de la chambre de nébulisation

SELENOP : « selenoprotein P »

S_{insert} : surface insert

SiO₂ : dioxyde de silicium

SOD : superoxyde dismutase

SP : protéine du surfactant

S_{QCM} : surface de la microbalance

SRM : « Standard Reference Material » ; matériel de référence

SV40 : virus simien 40

T

TBE : tampon composé de Tris, acide borique et EDTA

TBHP : tert-butyl hydroperoxide

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

TGF- α : « Transforming growth factor alpha », facteurs de croissance transformant alpha

THP-1 : « human leukemia monocytic cell line »

TiO₂: dioxyde de titane

T_m : « melting time » ; température de fusion des amorces

TMB : 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine

TNF- α : « Tumor Necrosis Factor », facteur de nécrose tumorale

TSP : « Total Suspended Particles », particules totales en suspension

TTF-1 : transcription tissu-spécifique 1

U

U : voltage

UV : ultra-violet

V

VAR : valeurs d'action rapide

V_{fluo.néb} : volume de fluorescéine nébulisée dans la chambre

VGAI : valeurs guides de l'air intérieur

V_{insert} : volume ajouté en apical des inserts

VLEP : valeurs limites d'Exposition professionnelles

V_{néb} : volume de suspension particulaire nébulisée

V_{QCM} : volume de fluorescéine nébulisée sur la microbalance

VRAI : valeurs repères pour l'air intérieur

VTR : valeurs toxicologiques de référence

W

WST1 : « Water-soluble tetrazolium salt »

X

XRE : « Xenobiotic Responsive Element », éléments de réponses aux xénobiotiques

Z

Zn : zinc

ZnO : oxyde de zinc

ZO-1 : zonula occludens-1

Avant-propos

Les efforts de la recherche scientifique se sont focalisés non seulement sur les impacts sanitaires de la pollution de l'air ambiant, mais aussi sur les effets de la pollution de l'air intérieur qui est restée longtemps ignorée alors que nous passons près de 85% de notre temps dans des environnements clos. L'inhalation de ces polluants est suspectée d'engendrer et/ou d'aggraver diverses pathologies respiratoires. Cette prise de conscience est relativement récente et représente aujourd'hui un enjeu majeur de santé publique. De ce fait, il apparaît indispensable d'apporter de nouvelles connaissances sur les mécanismes d'action et la toxicité par inhalation de mélanges de polluants chimiques, physiques et biologiques, représentatifs de l'air intérieur souvent présents à de faibles concentrations, afin de mieux évaluer et maîtriser les risques liés aux expositions dans des milieux intérieurs privés ou professionnels.

Dans ce contexte, le travail de thèse mené dans le cadre du projet global « ToxIAlMix » (financé par l'Agence de la Transition Ecologique (ADEME)) concerne l'évaluation *in vitro* de la toxicité cellulaire de poussières représentatives de la pollution de l'air intérieur en utilisant un matériel standard de référence, le SRM® 2585.

Ce travail de thèse s'articule en 3 volets :

- i. La caractérisation physico-chimiques, à l'aide de méthodes acellulaires, de la fraction totale du SRM® 2585 et de ses 2 sous-fractions inhalables PM_{2,5} et PM₁₀ obtenues après séparation granulométrique.
- ii. La détermination de la toxicité des PM₁₀ après expositions répétées d'un pseudo-épithélium trachéo-bronchique humain, obtenu après différenciation de cultures primaires de cellules épithéliales trachéo-bronchiques humaines normales (NHBE) cultivées à l'interface air-liquide (IAL). Afin de se rapprocher de la situation physiologique, les expositions sont effectuées par nébulisation des particules à la surface du pseudo-épithélium, sans phase d'immersion. Cette approche *in vitro* intègre également l'étude de la cinétique des effets observés durant, immédiatement après puis à distance des expositions afin d'identifier s'il s'agit d'effets pérennes, transitoires ou retardés.
- iii. L'étude des éventuelles interactions entre les cellules NHBE différenciées et des macrophages dérivés de monocytes humains (MDM), qui de par leurs capacités de phagocytose et de relargage de médiateurs de l'inflammation, représentent des partenaires majeurs de la réponse tissulaire pulmonaire globale.

Ce manuscrit se compose de cinq chapitres. Le premier est un état de l'art sur la pollution de l'air intérieur et plus précisément la fraction particulaire, les effets connus sur la santé humaine et les méthodes utilisées *in vitro* pour caractériser la toxicité pulmonaire. Le-deuxième chapitre est consacré aux méthodes déployées au cours de ce travail de thèse. Les résultats suivis d'une discussion partielle sont présentés dans le 3^{ème} chapitre. Un premier volet, basé sur l'article

publié correspondant, évoque la caractérisation intrinsèque des particules en conditions acellulaires. Le deuxième volet présente les réponses biologiques observées après expositions répétées des NHBE aux PM₁₀. Enfin, le troisième volet détaille les résultats obtenus après co-exposition. Le quatrième chapitre est dédié à la discussion générale. Les principales conclusions remises en perspective avec le projet global « ToxIAlMix » font l'objet du cinquième chapitre.

État de l'Art

1. Pollution de l'air intérieur

1.1. Généralités

La pollution de l'air intérieur désigne « les contaminants présents dans l'air des environnements clos indépendamment de leur source, qu'elle soit endogène à cet environnement et ses occupants, ou bien extérieure à celui-ci » (Réseau français Villes-Santé, 2015). Elle englobe à la fois une phase gazeuse et particulaire, composées d'éléments chimiques et/ou biogéniques susceptibles d'interagir avec l'organisme. La phase gazeuse se présente sous forme de composés chimiques volatiles divers, tels que le formaldéhyde, le radon et le monoxyde de carbone (CO), qui sont couramment rencontrés dans l'air intérieur. Les poussières englobent quant à elles toutes les substances solides et matériaux qui peuvent être présents dans l'air intérieur y compris les particules en suspension. Dans le cadre de cette étude et tout au long de ce manuscrit, nous nous sommes exclusivement intéressés à la phase particulaire de la pollution de l'air intérieur et plus particulièrement aux poussières sédimentées, pour laquelle nous avons fourni un descriptif et une analyse détaillée (cf. chapitre 1.2.4).

Les polluants présents dans l'air intérieur sont typiques de cet environnement, ils sont variés (les principaux seront détaillés au chapitre 1.2) et nécessitent d'être pris en compte dans leur globalité. La campagne « Logements » menée par l'Observatoire de la Qualité de l'Air Intérieur (OQAI) entre 2003 et 2004 a ainsi mis en évidence la présence de diverses substances non détectées à l'extérieur ou à des teneurs nettement plus importantes à l'intérieur telles que les terpènes issus des désodorisants, des parfums d'intérieur et des produits de nettoyage (Ministère de la Santé et du Sport, 2020).

La pollution de l'air intérieur serait responsable au niveau mondial de 3,8 millions de décès prématurés dus à des accidents vasculaires cérébraux, des cardiopathies ischémiques, des bronchopneumopathies chroniques obstructives (BPCO) et des cancers du poumon (OMS, 2018). Chaque année deux millions d'années de vie en bonne santé seraient perdues dans les pays européens à cause d'une mauvaise qualité de l'air intérieur (QAI), ce qui représente à peu près 3 % de la totalité de la morbidité liée à toutes les causes de maladies dans l'Union Européenne (Jantunen et al., 2011). Les enfants, les personnes âgées ou immunodéprimées et les malades souffrant de pathologies pulmonaires chroniques sont particulièrement sensibles. Ainsi selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), la moitié des décès par pneumonie chez l'enfant de moins de cinq ans serait causée par l'inhalation de polluants de l'air intérieur (OMS, 2018).

Les effets de l'amiante présent dans les bâtiments ont également contribué à la prise de conscience de l'impact sanitaire de la pollution de l'air intérieur par les pouvoirs publics. Depuis, la France construit progressivement une politique visant à contrôler et améliorer la QAI. La compréhension et l'identification des mécanismes cellulaires et moléculaires mis en jeu dans la

toxicité des polluants impliqués est au sein cette politique nationale. Une attention est également portée à la sensibilisation des différents acteurs (professionnels de santé, professionnels du bâtiment et grand public) et à l'élaboration d'une réglementation relative à certains polluants, populations et lieux (ANSES, 2016). Les produits de construction et de décoration sont soumis à une obligation d'étiquetage sur leur niveau d'émission en polluants volatils depuis janvier 2012. Des substances chimiques telles que le trichloroéthylène, le benzène, le phtalate de dibutyle et le phtalate de bis (2-éthylhexyle) classées Cancérogènes, Mutagènes et Reprotoxique (CMR) ont été interdites d'utilisation dans les matériaux de construction et les produits de décoration en 2009. L'amiante, le radon, le CO et le plomb (Pb) sont suivis de près et font également l'objet d'une réglementation spécifique qui est sans cesse renforcée. Certains environnements, tels que les Enceintes Ferroviaires Souterraines (EFS) servent à la fois de lieux de travail et d'établissements recevant du public. Ils ne sont pas encore réglementés de manière spécifique en ce qui concerne la pollution intérieure, en dehors du code du travail comprenant des dispositions relatives à la QAI et assurant le bien-être de la population active. En revanche, il existe des endroits qui font l'objet de mesures spécifiques liées aux activités professionnelles des travailleurs. C'est par exemple le cas des installations de nettoyage à sec adjacents à des locaux occupés par des tiers où des mesures réglementaires ont été mises en place pour progressivement substituer le perchloroéthylène, un solvant dangereux, par des solvants moins nocifs afin de réduire les risques à la fois pour la santé des travailleurs mais aussi pour celle de la population générale qui occupe les locaux adjacents. Des réglementations existent également pour les locaux à pollution non spécifique, comme les bureaux qui accueillent les salariés (Ministère de l'intérieur et des outre-mer, 2019).

1.2. Polluants particuliers de l'air intérieur

1.2.1. Sources d'émission

Les impacts sanitaires les plus graves de la pollution de l'air ont été attribués aux matières particulaires (PM) (Wu et al., 2018). La multiplicité des sources d'émission et de composition des atmosphères intérieures expliquent les difficultés actuelles pour en contrôler l'origine et estimer la contribution relative des contaminants, mais aussi pour étudier leurs effets sanitaires.

Un nombre non négligeable de polluants de l'air intérieur est multi-source, pouvant provenir d'émissions d'origine interne ou externe. Ils sont dépendant de nombreux facteurs propres à chaque construction et à l'usage qu'il en est fait (Ministère de l'intérieur et des outre-mer, 2019).

- Sources intérieures de polluants

Les sources intérieures de polluants peuvent être associées aux équipements et à l'état global du logement. Par exemple, la détérioration de bâtiments à cause de leur vieillissement ou du mauvais entretien peut induire une dégradation de la QAI.

Le choix des matériaux de construction joue un rôle primordial dans la QAI. La peinture, la nature et la qualité des revêtements des sols ainsi que l'ameublement peuvent libérer des substances dangereuses pour les occupants. Actuellement, nombre de substances nuisibles font l'objet d'une réglementation stricte afin de diminuer les effets néfastes qu'elles peuvent engendrer. C'est le cas de l'amiante qui est interdit en France, tandis que pour d'autres composés, il existe des valeurs réglementaires qui seront abordées au chapitre 4.

La prise en compte des conditions hygrothermiques par la mesure de la température et du taux d'humidité de l'air d'un local, permet de vérifier le respect de conditions compatibles avec la sécurité sanitaire des habitants et des infrastructures. En effet, les matériaux souillés et endommagés par l'eau sont à l'origine de contaminations bactériennes et fongiques pouvant affecter la QAI.

La complexité des systèmes de Chauffage, Ventilation et Climatisation (CVC) des constructions modernes engendre des contraintes d'entretien qui peuvent aussi impacter la qualité de l'air respiré dans les logements : leur bon fonctionnement et leur maintenance sont indispensables pour assurer la sécurité sanitaire des occupants.

- Occupants et activités

Le mode de vie et les habitudes des occupants sont susceptibles d'influencer la QAI. Le tabagisme, l'utilisation de pesticides pour les plantes ou pour le traitement des animaux de compagnie, l'utilisation de produits chimiques pour l'entretien des surfaces ou pour désodoriser peuvent engendrer la libération de polluants nuisibles à la santé, surtout si l'aération est insuffisante.

Les loisirs et les activités pratiqués à l'intérieur, tels que le brûlage d'encens ou de bougies parfumées, les activités culinaires et le chauffage impliquant la combustion du bois/charbon, sont également des facteurs importants. D'ailleurs, chaque année au niveau mondial plus de 4 millions d'individus meurent prématurément de maladies attribuables à la pollution de l'air domestique liée aux combustibles utilisés pour la cuisson des aliments (OMS, 2018).

Les animaux domestiques, les insectes et les acariens sont une source de pollution biologique. Ils sont à l'origine de réactions allergiques chez les personnes sensibles. Une étude menée sur les Français montre qu'un individu sur quatre est actuellement allergique. Néanmoins tous ne sont pas conscients des causes de ces allergies et sous-estiment le rôle de l'environnement intérieur dans leur apparition (Ministère de l'intérieur et des outre-mer, 2019). Une étude effectuée dans 84 écoles maternelles polonaises a montré que les concentrations en allergènes dans une classe sont corrélées au nombre d'enfants ayant des animaux domestiques

(Cyprowski et al., 2013). Morawska & Salthammer, (2006) ont mis en évidence la présence de différents types de micro-organismes (virus, bactéries, moisissures, pollens ou encore acariens) sur des poussières collectées par aspiration dans sept bureaux danois.

- Pollution par infiltration de l'air extérieur

Compte tenu des échanges passifs ou actifs entre l'air atmosphérique et l'air à l'intérieur des bâtiments, toute dégradation de l'air extérieur aura un impact sur la QAI.

L'explosion démographique mondiale est associée à l'augmentation de la pollution atmosphérique, affectant la qualité de l'air respiré. Dans les espaces urbains notamment, la pollution particulaire résulte principalement des activités anthropiques telles que la combustion de composés fossiles ou de bois pour le chauffage associé aux activités industrielles et à la circulation routière (ANSES, 2018; Boublil et al., 2013).

Bien que les activités anthropiques soient les plus productrices de polluants aériens, les sources naturelles de pollution, telles que les éruptions volcaniques, la transformation des paysages (par émissions de gaz et de particules provenant des poussières formées) et les feux de forêt peuvent aussi participer à la dégradation de la qualité de l'air.

Il est donc nécessaire de recenser ces sources afin d'élaborer des politiques plus efficaces de réduction des émissions, et en conséquence de leur infiltration dans les environnements clos ainsi que les effets toxiques qui en découlent (Cheng et al., 2014).

1.2.2. Composition chimique

La composition chimique des particules en suspension est très variable et influence la toxicité éventuellement engendrée par celles-ci. Elles peuvent renfermer une fraction organique et/ou inorganique associée à des sels, des composés minéraux, des éléments biologiques et des métaux, dont les proportions dépendent de leur source d'émission ainsi que de leur interaction avec les autres composants présents dans l'environnement. La pièce échantillonnée, les conditions climatiques et météorologiques et la granulométrie de la poussière conditionnent aussi la proportion de matières inorganiques et organiques présentes dans la poussière échantillonnée (Gustafsson et al., 2018). Par exemple, Yang et al. (2016) ont identifié à l'aide du microscope électronique à balayage (MEB), des fractions organiques (particules carbonées) et minérales (particules issues de l'érosion des sols) ainsi que des éléments biologiques (spores) dans la poussière de logements chinois.

Une revue de la littérature a été réalisée sur les données de contamination en substances chimiques dans des échantillons de poussières collectés dans des logements, des écoles et des crèches en Europe, en Amérique du Nord, en Australie et en Nouvelle-Zélande entre 2005 et 2017 (Larsson & Berglund, 2018). Plusieurs composés organiques volatils (COV) et semi-volatils (COSV) ont été identifiés. La variabilité de leur concentration dans les différents échantillons peut être

expliquée par la proximité d'industries, la saison, la météo et par les paramètres liés aux occupants et leurs pratiques (mobilier, ménage, tabagisme, chauffage, cuisson et autres) (ANSES, 2019).

Selon l'OQAI, les COV sont émis dans les bâtiments par dispersion lors de l'usage, par évaporation ou par abrasion. Du fait de leurs caractéristiques physico-chimiques, ces composés se répartissent à la fois dans l'air, en phases gazeuse et particulaire, et dans les poussières déposées au sol, sur le mobilier et les objets. Certains COV comme le benzène et le formaldéhyde sont classés comme cancérigènes pour l'homme par le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC) (OMS, 2018). L'exposition ponctuelle ou prolongée aux COV peut présenter des risques pour la santé humaine entraînant des irritations de la peau, des muqueuses et du système pulmonaire. (Réseau français Villes-Santé, 2015). Les COSV incluent des substances de différentes familles chimiques parmi lesquelles les phtalates, les polychlorobiphényles (PCB), des composés organochlorés, organobromés et organophosphorés, des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), les pyréthriinoïdes, les phénols et alkylphénols, les muscs synthétiques, les parabènes et les plastifiants. Ils se trouvent surtout dans les matériaux de construction et revêtements de sols en poly-chlorure de vinyle (PVC), les produits d'entretien (détergents), les produits électroniques et le mobilier. Certains composés sont classés comme des perturbateurs endocriniens.

1.2.3. Granulométrie et forme

Les PM sont classées en fonction de leur granulométrie, plus précisément leur diamètre aérodynamique, qui constitue un des paramètres responsables de leur impact sanitaire.

Ainsi, on peut identifier les particules totales en suspension (« Total Suspended Particles » (TSP)) qui regroupent les particules dont la taille peut atteindre quelques dizaines de micromètres.

Les particules grossières (PM_{10}) ont un diamètre aérodynamique inférieur à $10\ \mu\text{m}$ et, après inhalation, ont tendance à se déposer majoritairement au niveau de l'arbre trachéo-bronchique.

Les particules fines ($PM_{2.5}$) ont un diamètre inférieur à $2,5\ \mu\text{m}$ et sont majoritairement formées par réactions chimiques (condensation) à partir de gaz précurseurs présents dans l'environnement ou par combustion suivi de coagulation suite aux chocs entre des particules plus petites (ANSES, 2023). Leur faible taille favorise leur pénétration dans l'appareil respiratoire profond pour atteindre les alvéoles pulmonaires, ce qui les associe souvent à des pathologies respiratoires et cardiovasculaires. Ces particules représentent la moitié de la masse totale des PM_{10} (Wu et al., 2018).

Les particules ultrafines ($PM_{0.1}$) ont un diamètre aérodynamique inférieur à $0,1\ \mu\text{m}$ et sont assimilées à des nanoparticules. Elles résultent notamment de processus de nucléation

(formation de particules solides ou liquides à partir de gaz, en phase homogène ou hétérogène) (ANSES, 2023). Leur durée de vie est brève car elles disparaissent en grossissant par coagulation entre elles ou avec des particules plus grosses. Leur petite taille leur confère des capacités de pénétration intracellulaire et permet leur dépôt au niveau des voies respiratoires distales puis passage dans la circulation générale. Il est donc important de tenir compte non seulement de la masse mais également du nombre de particules ultrafines déposées (Kulshrestha et al., 2009). L'identification de la localisation des particules inhalées au niveau de l'appareil respiratoire est essentielle pour étudier les mécanismes de toxicité associés à leur exposition (Sturm, 2015). Selon de nombreuses études publiées, les particules ultrafines apparaissent, à masse équivalente, plus cytotoxiques, inflammatoires et fibrosantes que les particules fines de même composition (Mossman et al., 2007).

Les effets des particules sont également conditionnés par leur forme qui influence les interactions avec les cellules du tractus respiratoire. Plus la surface de contact est importante, plus le risque d'interaction accru des particules avec les cellules pulmonaires est élevé, favorisant des réactions toxiques. Par exemple, les particules de forme allongée, telles que les fibres, ont tendance à se déposer dès qu'elles entrent en contact avec la paroi respiratoire. Elles présentent un risque accru de toxicité en raison de leur rétention au niveau de la plèvre pariétale où elles peuvent être facilement piégées par les stomates, ce qui rend leur élimination de l'organisme plus difficile. Des études ont montré que les particules allongées ou fibreuses peuvent induire une réponse inflammatoire plus prononcée que les particules sphériques de taille similaire (Wang et al., 2022).

De plus, la forme des particules peut jouer un rôle dans leur capacité d'internalisation dans les cellules. Une étude a été réalisée sur 3 types de particules cationique fabriquées, de tailles et de formes différentes (cubiques, cylindrique et nanoparticules cylindrique), mais de composition chimique constante (Gratton et al., 2008). L'internalisation des particules dans la lignée cellulaire cancéreuse issue d'un prélèvement d'un cancer du col de l'utérus métastatique (cellules HeLa) s'est effectuée à un pourcentage plus élevé pour les particules cylindriques (75 %) que pour les particules cubiques (45 %).

1.2.4. Poussières sédimentées

Les poussières sédimentées sont définies, par opposition aux particules en suspension, comme étant « tout type de particules trouvées dans les espaces intérieurs sous forme déposée » généralement sur des surfaces horizontales indépendamment de leur source et nature (ANSES, 2019; Butte & Heinzow, 2002). Ces poussières sont ainsi représentatives de la complexité des constituants présents dans l'air intérieur et prennent en compte les fluctuations temporelles de composition et de concentration de la phase particulaire. Elles fournissent une indication de

l'exposition à plus long terme, car elles représentent l'accumulation de particules sur une période donnée contrairement aux poussières en suspension qui témoignent de la composition au moment du prélèvement.

Les poussières sédimentées intérieures sont très hétérogènes et sont composées d'une diversité de substances de nature (naturelle ou synthétique, inorganique ou organique) et de tailles différentes. L'étude menée par Lioy et al. (2002) a montré que la plupart des substances présentes dans les poussières sédimentées sont retrouvées dans tous les types de pièces. Des similarités de composition et de granulométrie (inférieures à 75 μm) sont observées, ainsi que d'origine avec notamment la présence de résidus de nourriture, de cheveux ou de poils, de composants synthétiques, de fragments végétaux et de contaminants biologiques. Leur composition diffère néanmoins selon la localisation du logement et plus précisément la pièce d'origine (cuisine, salle de bain, chambre) en raison des spécificités des sources et des activités liées à chaque pièce. Les particules peuvent être directement générées dans l'environnement intérieur (sources internes) puis être contaminées ou non et finalement être déposées. Elles peuvent également être introduites (sources externes) soit par tractage via le flux de personnes et d'animaux soit par l'entrée d'air chargé des particules en suspension par le biais de la ventilation et l'aération du bâtiment puis subir une contamination secondaire par adsorption de contaminants (Morawska & Salthammer, 2006).

La méthode de prélèvement peut également avoir une influence sur l'échantillon (ANSES, 2019; He et al., 2018). Diverses techniques sont utilisées (essuyage par des lingettes, aspiration, balayage, prélèvement passif), sur une surface réduite, représentative de celle avec laquelle la population se trouve en contact. Par exemple, la méthode de prélèvement par aspiration peut remettre en suspension des particules adsorbées sur la surface des poussières modifiant en conséquence le spectre granulométrique du prélèvement (Lewis et al., 2018). L'étude de Rasmussen et al. (2008) a ainsi montré qu'une fraction non négligeable des poussières sédimentées (environ 50 % en poids de PM_{10}) constituent un réservoir de contaminants inhalables via leur remise en suspension.

L'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES) a conduit une expertise sur les méthodes utilisées pour évaluer l'exposition aux poussières sédimentées et la possibilité d'élaborer des valeurs de référence pour les composants présents à la surface de ces poussières (ANSES, 2019). Il apparaît toutefois difficile de comparer les résultats des études déjà menées puisqu'elles font appel à différentes méthodes de prélèvement et d'analyse n'ayant pas permis d'aboutir jusqu'à présent à une norme ou un consensus.

2. Inhalation des polluants particuliers

Nous allons maintenant focaliser sur l'inhalation de ces polluants particuliers. Nous allons dresser un descriptif détaillé du tractus respiratoire, des mécanismes de dépôts des particules inhalées et des mécanismes de défense tissulaire résultant de ce type d'exposition.

2.1. Rappels anatomiques

L'appareil respiratoire constitue la cible privilégiée pour les substances inhalées. Il est caractérisé par une grande surface en contact direct avec l'extérieur (50-100 m³) constituée de trois régions fonctionnelles distinctes (Figure 1) :

- Les voies aériennes supérieures comprennent la cavité nasale (le nez, les fosses nasales et les sinus paranasaux), la cavité buccale, le pharynx et le larynx. Ils sont situés en dehors de la cavité thoracique. Le nez et les fosses nasales sont les principales ouvertures externes du système respiratoire. La bouche constitue une autre source d'entrée d'air, mais sa capacité de filtration est réduite par rapport au nez.
- Les voies aériennes inférieures se trouvent à l'intérieur de la cavité thoracique et sont constituées par la trachée qui se divise en deux bronches primaires puis en de multiples ramifications appelées bronchioles.
- Les voies aériennes distales sont composées des bronchioles terminales, des sacs alvéolaires et de plus de 700 millions d'alvéoles chez l'adulte. La division des bronchioles respiratoires donne naissance aux canaux alvéolaires qui se connectent aux sacs alvéolaires, lesquels contiennent les alvéoles (Bustamante-Marin & Ostrowski, 2017). Ces derniers sont les unités fonctionnelles du poumon et forment une barrière qui est en contact étroit avec la circulation sanguine assurant ainsi les échanges gazeux et l'oxygénation des différents tissus.

Les voies respiratoires humaines sont revêtues d'un épithélium continu, dont l'épaisseur varie en fonction de sa position. Par exemple, elle est la plus fine (0,1 µm) dans les alvéoles et plus épaisse dans les bronches et la trachée (BéruBé et al., 2009). Elle est caractérisée par une hétérogénéité cellulaire, chaque type ayant des fonctionnalités spécifiques et donnant naissance à un système de défense physique et chimique efficace (Figure 2). Les cellules épithéliales sont fixées sur une membrane basale qui à son tour repose sur une lamina propria collagénique contenant les glandes séreuses, les glandes à mucus, les muscles lisses et le cartilage. La lamina propria contient également de l'élastine qui joue un rôle dans l'élasticité de la trachée lors de l'inspiration et de l'expiration. Le muscle lisse joue un rôle fonctionnel dans la régulation du débit

d'air et est organisé sous forme spiralée complexe au niveau de la trachée qui devient progressivement moins proéminent dans les voies aériennes distales (Bustamante-Marin & Ostrowski, 2017).

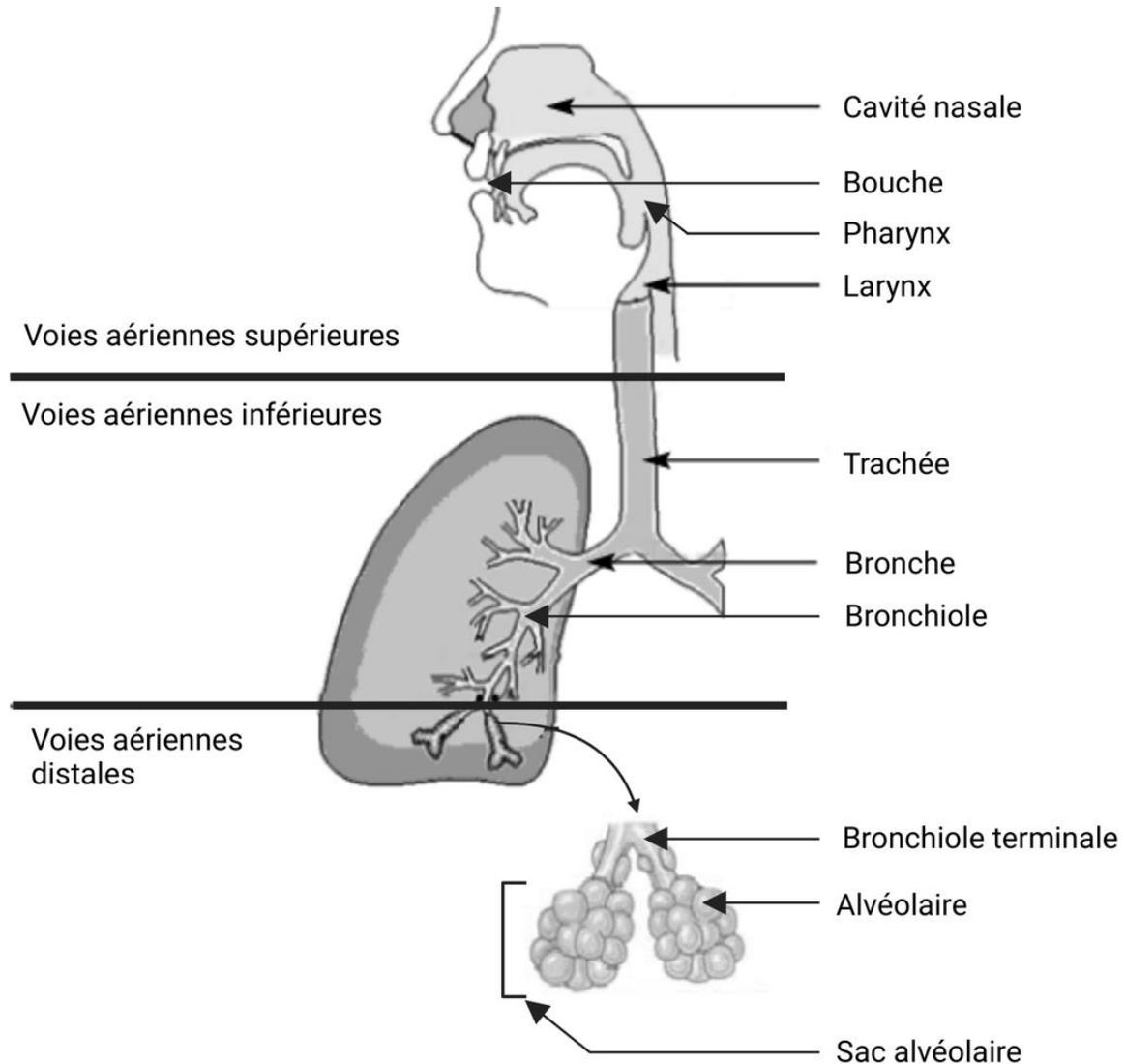


Figure 1. Structure de l'appareil respiratoire. Adapté de (BéruBé et al., 2009).

Les **cellules basales** sont des cellules ovoïdes de petites tailles présentes à la base de l'épithélium. Ce sont des cellules progénitrices capables de proliférer et/ou de se différencier en plusieurs types cellulaires respiratoires (Rock et al., 2009). Les laminines, les glycosaminoglycane et la réticuline sont les principaux constituants de la membrane basale et forment un réseau auquel les cellules peuvent s'ancrer grâce à des hémidesmosomes (Marrazzo et al., 2016). Les cellules basales sont étroitement liées les unes aux autres par un système de jonctions

intercellulaires : les jonctions serrées au niveau de la membrane baso-latérale des cellules, les jonctions adhérentes et les desmosomes au niveau des membranes latérales. Les jonctions serrées sont composées de protéines transmembranaires, telles que les occludines et les claudines, de protéines d'échafaudage, telles que les *Zonula occludens* (ZO), ainsi que d'immunoglobulines. La protéine ZO-1 est un composant essentiel de ces structures. Les jonctions adhérentes renferment des cadhérines et des caténines. Les desmosomes assurent la résistance mécanique du tissu et fournissent des sites d'ancrage des cellules importants pour le maintien de l'architecture (Bhowmick & Gappa-Fahlenkamp, 2016).

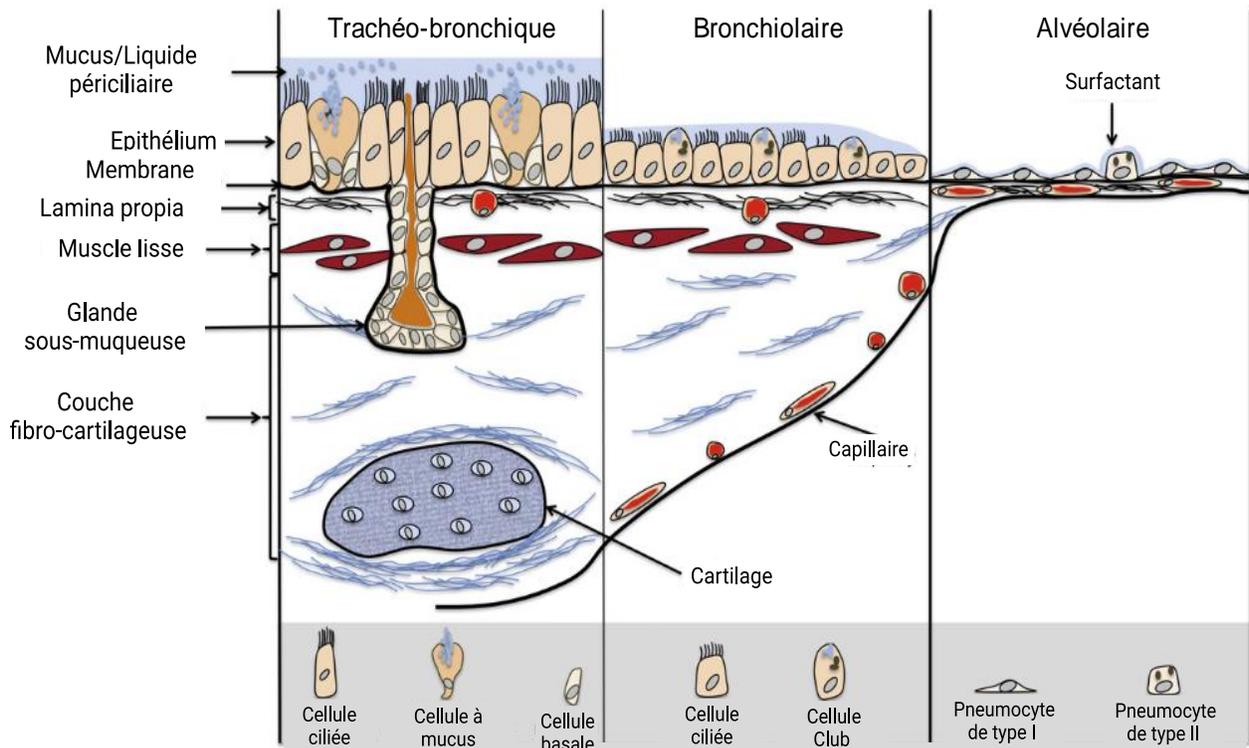


Figure 2. Schéma simplifié de la structure de l'épithélium trachéo-bronchique, bronchiolaire et alvéolaire. La couche épithéliale passe progressivement de pseudo-stratifiée à cuboïde, puis à pavimenteuse. Adapté de (BéruBé et al., 2009).

Les **cellules à mucus** sont les principales cellules sécrétrices de l'épithélium trachéo-bronchique. Ce sont des cellules fortement polarisées qui contiennent des vésicules de sécrétion situées au pôle apical du cytoplasme de la cellule, riche en glycoprotéines de haut poids moléculaire et formant un gel, appelées mucines jouant un rôle de barrière sélective de protection via la clairance muco-ciliaire (Adam et al., 2014). Les mucines (MUC) associées à la membrane, notamment MUC1, MUC4, MUC11, MUC13, MUC15, MUC16 et MUC20, sont également exprimées à la surface de l'épithélium des voies aériennes. Dans les conditions physiologiques, ces cellules expriment majoritairement MUC5AC, tandis que les cellules des

glandes sous-muqueuses expriment principalement MUC5B (Bustamante-Marin & Ostrowski, 2017). Ces 2 mucines sont les principales produites (Lee et al., 2023).

Lorsqu'elles sont entièrement différenciées, les **cellules ciliées** ont une forme cylindrique allongée et sont caractérisées par la présence dans la région apicale de nombreux cils (plus de 100 cils par cellule) et dotées d'une motilité via la production d'adénosine triphosphate (ATP) par les mitochondries présentes dans cette région (Bustamante-Marin & Ostrowski, 2017; Rokicki et al., 2016). Ce sont les cellules les plus abondantes des voies respiratoires (Khan & Lynch, 2023). Elles sont issues d'un processus de différenciation terminale des cellules épithéliales des voies respiratoires mettant en jeu le processus de la ciliogenèse contribuant au système de clairance muco-ciliaire efficace (Adam et al., 2014). La taille d'un cil est comprise entre 6 et 7 μm de long et peut atteindre 0,2 à 0,3 μm de diamètre (Yaghi & Dolovich, 2016). Tandis que le mucus emprisonne les particules inhalées, le battement ciliaire permet de les déplacer vers le pharynx afin de les l'expulser par la toux ou par la déglutition (Khan & Lynch, 2023).

Les **cellules Club**, de forme cubique, contiennent de petits granules de sécrétion riche en substances aqueuses (Bustamante-Marin & Ostrowski, 2017). Elles constituent un système de défense chimique et physique de l'épithélium respiratoire via la sécrétion de substances détoxifiantes et antimicrobiennes qui protègent les voies respiratoires contre le stress oxydatif et l'inflammation (Iwasaki et al., 2017). Elles sécrètent également des protéines, des glycoprotéines et des lipides. Le rôle protecteur de la protéine CC16 a été mis en évidence par des études expérimentales sur des souris. Selon les observations, sa carence a été associée à une sensibilité accrue des poumons aux infections virales et au stress oxydatif (Rokicki et al., 2016). Elles possèdent également des capacités métaboliques importantes (Rokicki et al., 2016). Tout comme les cellules basales, les cellules club sont des cellules progénitrices capables de proliférer et/ou de se différencier en cellules ciliées et en cellules à mucus suite à une lésion bronchiolaire (Bustamante-Marin & Ostrowski, 2017; Iwasaki et al., 2017). Dans des conditions physiologiques, elles constituent approximativement 9 % de la population totale des cellules épithéliales des voies respiratoires humaines et 11 à 22 % des cellules Club sont situées dans les bronchioles terminales (Rokicki et al., 2016).

Les **cellules neuroendocrines** sont des cellules épithéliales endocrines, associées à des fibres nerveuses, isolées ou regroupées pour constituer des îlots innervés. Elles possèdent des fonctions régulatrices locales et réflexes modulant les effets toxiques observés après inhalation de particules, jouent un rôle de régulateur de la croissance et du développement des voies respiratoires et peuvent sécréter différentes substances, notamment des catécholamines et des hormones polypeptidiques, telles que la calcitonine et la sérotonine (Khan & Lynch, 2023). Elles communiquent également avec le système immunitaire et le système nerveux. Il a été démontré que les cellules neuroendocrines sont la progéniture de cellules basales adultes (Tata & Rajagopal, 2017).

Les **pneumocytes de type 1** (AEC1) couvrent environ 95 % de la surface alvéolaire et forment la « barrière air-sang » des poumons assurant l'échange gazeux. Elles sont incapables de se diviser. Les **pneumocytes de type 2** (AEC2) dominent en termes de nombre (environ 70 à 90 %) mais ne représentent que 5 % de la surface alvéolaire (Hastedt et al., 2016). Ces cellules peuvent se diviser et se différencier en AEC1. Les AEC2 sécrètent les corps lamellaires dans l'espace alvéolaire, riches en phospholipides qui sont les principaux composants du surfactant. Le surfactant est stocké à l'intérieur des AEC2 dans des corps lamellaires. Il diminue la tension de surface permettant aux alvéoles de ne pas se collapser. L'épithélium alvéolaire est pourvu également d'un système de défense immunitaire mettant en jeu des médiateurs inflammatoires (cytokines, chimiokines, peptides bronchiques et dérivés lipidiques).

La principale cellule phagocytaire est le **macrophage alvéolaire**, qui provient principalement de la migration depuis la circulation sanguine vers les espaces aériens alvéolaires. Toutefois, une petite population de macrophages alvéolaires tapisse la lumière des alvéoles (BéruBé et al., 2009). On estime que plus de 2,3 milliards de ces cellules sont présentes dans les poumons d'un individu sain (Hastedt et al., 2016).

Dans les voies respiratoires supérieures et inférieures, les cellules basales représentent environ 30 % des cellules de l'épithélium (Rock et al., 2009). La composition de l'épithélium en cellules varie en fonction de sa localisation dans l'appareil respiratoire. Au fur et à mesure que les voies respiratoires se ramifient, le nombre de cellules ciliées et de cellules à mucus diminue (Bustamante-Marin & Ostrowski, 2017).

La **trachée** est composée d'environ 60 % de cellules ciliées et de 20 % de cellules caliciformes (forme prismatique simple) appelées aussi cellules à mucus ou cellules « goblet » en anglais dont la surface est humidifiée par les sécrétions des glandes muqueuses et séreuses qui contiennent des immunoglobulines de type A (IgA), participant à la réponse inflammatoire (Bustamante-Marin & Ostrowski, 2017).

L'épithélium bronchique est également de type muco-ciliaire. Il comprend essentiellement des cellules ciliées constituant avec les cellules basales un épithélium cylindrique pseudo-stratifié. Les cellules ciliées occupent la presque totalité de la surface en contact avec la lumière bronchique alors que les cellules basales couvrent la majorité de la membrane basale.

L'épithélium bronchiolaire est composé de cellules ciliées, de cellules basales et de cellules à mucus qui ensemble participent à la fonction de clairance qui est un mécanisme physiologique de protection des poumons contre les agressions extérieures (Pascal & Tessier, 2004).

Les voies respiratoires distales sont dépourvues de support cartilagineux et de glandes sécrétoires.

L'épithélium évolue au niveau des **bronchioles terminales** en un épithélium cuboïde monocouche moins cilié, avec peu de cellules goblet mais avec un nombre accru de cellules

sécrétrices non ciliées appelées cellules Club à fonction immunitaire (anciennement cellules de Clara) et plus rarement des cellules neuroendocrines (Bustamante-Marin & Ostrowski, 2017).

L'épithélium alvéolaire, quant à lui, est de type pavimenteux simple et renferme uniquement des AEC1 et des AEC2 au sein duquel sont infiltrés des macrophages (Calcabrini et al., 2004).

2.2. Mécanismes de dépôts des particules

L'appareil respiratoire constitue la voie de pénétration majeure dans l'organisme des particules en suspension dans l'air. Une fois inhalées, les particules sont déposées dans l'appareil respiratoire d'une manière non uniforme dans les différentes régions selon leurs propriétés physico-chimiques (taille, forme, densité, charge et hygroscopie) qui conditionnent leur degré de pénétration, de rétention et d'élimination pulmonaire.

Généralement, le dépôt des particules dans l'appareil respiratoire s'effectue selon cinq mécanismes possibles (Falcon-Rodriguez et al., 2016 ; Sturm, 2015) (Figure 3) :

- L'impaction

Les particules en suspension peuvent se déposer par impaction sur les parois des voies aériennes au niveau des bifurcations (courbe ou fourche bronchique), du fait de leur inertie, de leur incapacité à changer leur trajectoire initiale et à suivre le changement de direction de l'air. La probabilité d'impaction dépend de la vitesse de l'air et de la masse de la particule. Généralement, les particules grossières se déposent par impaction dans le nez et la gorge et n'atteignent pas les voies inférieures.

- La sédimentation

L'attraction gravitationnelle et la résistance de l'air finissent par annuler la flottabilité des particules ce qui entraîne leur dépôt sur la muqueuse pulmonaire par sédimentation, particulièrement au niveau des bronches et bronchioles où la vitesse de passage de l'air est faible. C'est le mode de dépôts des particules grossières et fines.

- La diffusion

La diffusion brownienne se définit par le dépôt de particules fines sur la paroi des voies respiratoires après collision aléatoire ou freinage contre d'autres molécules présentes dans l'air. C'est le mécanisme de dépôt majoritaire des nanoparticules au niveau des alvéoles pulmonaires.

- L'interception

L'interception est le piégeage des particules, ne suivant pas l'écoulement d'air ou n'étant pas de taille importante (particules fines), au niveau des points de jonction de l'arbre bronchique.

- Le dépôt électrostatique

L'interaction électrostatique concerne strictement les particules chargées qui vont être attirées par les parois du tractus respiratoire, inversement chargées.

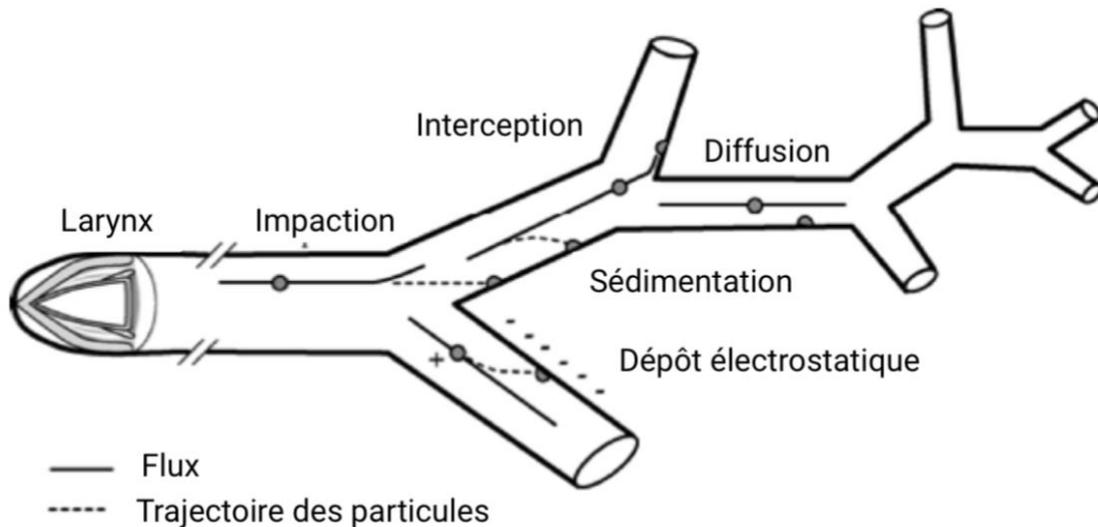


Figure 3. Mécanismes de dépôt des particules inhalées dans les voies respiratoires. Adapté de (Mossman et al., 2011).

2.3. Mécanismes de défense

Des mécanismes de clairance divers assurent l'élimination des agents toxiques de l'organisme et notamment des particules inhalées. Ils jouent un rôle de défense au niveau des voies respiratoires, avec des efficacités variables selon la région pulmonaire concernée. La redirection des particules vers le système digestif, le système lymphatique ou encore le réseau vasculaire pulmonaire peut être aussi envisagée. Le temps d'action potentiel de ces agents inhalés et leur absorption sera d'autant plus réduit que l'élimination des agents toxiques des voies respiratoires est précoce et rapide au niveau.

- Elimination mécanique

Au niveau nasal, les particules sont retenues par les vibrisses (poils courts et épais dans les narines) puis éliminées par mouchage (Hastedt et al., 2016). Certains récepteurs liés aux neurones comme les récepteurs irritants pulmonaires et les fibres C peuvent induire des mécanismes de clairance mécanique, tels que la toux, mais aussi des changements du tonus bronchique et du rythme respiratoire en réponse à l'inhalation de particules. Seuls ces mécanismes d'épuration assurent une réelle élimination des particules.

Plus bas dans les voies respiratoires, les ramifications anatomiques des conduits respiratoires favorisent le piégeage des particules par impaction et sédimentation (Hastedt et al., 2016). L'élimination des particules peut être assurée par « l'ascenseur » muco-ciliaire décrit ci-dessous.

- Clairance muco-ciliaire

Au niveau des voies aériennes supérieures et inférieures, l'épithélium est recouvert de fluides extracellulaires composées d'une couche superficielle de mucus et d'une couche sous-jacente constituant le liquide péri-ciliaire (Bustamante-Marin & Ostrowski, 2017; Pascal & Tessier, 2004). Les cils ne baignent pas directement dans le mucus mais ils sont immergés dans la couche de liquide péri-ciliaire. Cette couche est beaucoup moins visqueuse que la couche de mucus et a une épaisseur presque identique à la longueur des cils (approximativement de 7 μm) assurant le libre battement des cils d'une manière synchrone et selon un mouvement rotatoire (Bustamante-Marin & Ostrowski, 2017; Liu et al., 2016). Ce gel poly-anionique assure le bon fonctionnement des cils et la lubrification de la surface de l'épithélium.

Le mucus permet pour sa part de piéger les composés exogènes déposés dans les voies respiratoires afin de les éliminer de l'organisme en agissant comme barrière de diffusion pour les substances dissoutes. C'est un hydrogel composé majoritairement d'eau (97 %) (Bustamante-Marin & Ostrowski, 2017). La fraction protéique représente 2 % des constituants du mucus et les sels divers représentent 1 %. Les mucines (1 %) et d'autres protéines aux propriétés antimicrobiennes (1 %) sont sécrétées par les cellules caliciformes de l'épithélium respiratoire. De plus, les glandes sous-muqueuses sont tapissées de cellules goblet et de cellules séreuses qui sécrètent à leur tour des protéines ayant un rôle immunitaire (protéines du surfactant de type A et D), des mucines (MUC5AC et MUC5B), et des électrolytes qui contrôlent l'hydratation des sécrétions. Ces glandes sont innervées par les cellules myoépithéliales, assurant la sécrétion du mucus en réponse à des influx nerveux après stimulation par des irritants et des toxiques (Whitsett, 2018). Cette couche de mucus qui se forme au-dessus des cils peut atteindre une épaisseur maximale de 5 μm au niveau de la trachée chez les personnes non atteintes de maladies respiratoires (Bustamante-Marin & Ostrowski, 2017). Cette épaisseur diminue ensuite

progressivement à mesure que l'on descend dans les voies respiratoires inférieures (Hastedt et al., 2016). Doté de propriétés d'écoulement, le mucus est capable de transporter et de remonter les substances piégées via le battement ciliaire vers les voies aériennes supérieures afin de les évacuer par expectoration ou ingestion, limitant leur accumulation dans les voies respiratoires (Whitsett, 2018). C'est la clairance muco-ciliaire (Figure 4). Les particules inhalées sont majoritairement éliminées par ce processus d'une manière relativement rapide, avec une demi-vie d'environ 1 à 1,5 h (Hastedt et al., 2016). Ce processus de clairance diminue progressivement en allant plus profondément dans les voies respiratoires étant donné l'absence des structures physiologiques assurant ce mécanisme au niveau des alvéoles (Casarett et al., 2001).

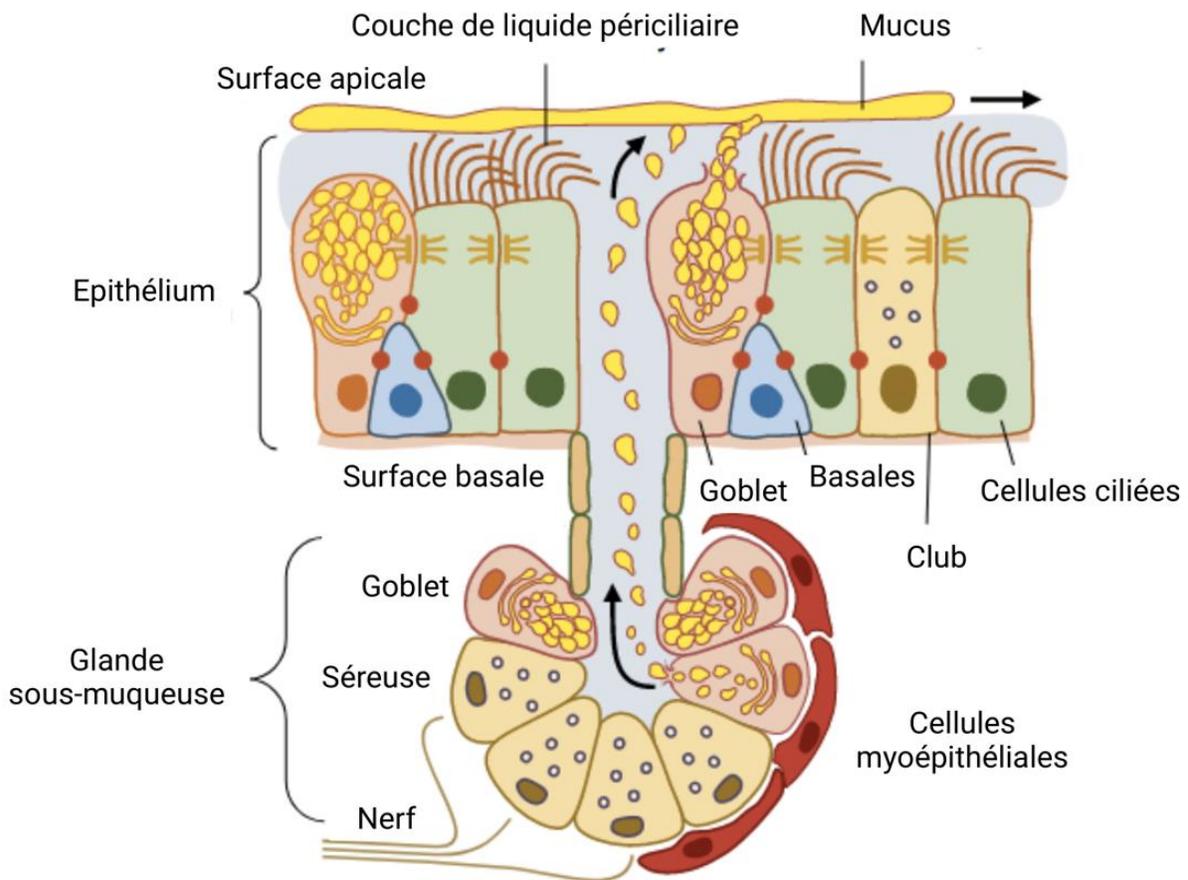


Figure 4. Mécanisme de la clairance muco-ciliaire médié par l'épithélium respiratoire et la glande sous-muqueuse. Adapté de (Whitsett, 2018).

Comme la vitesse du flux d'air passe de 150 cm/s dans les voies respiratoires supérieures à presque zéro dans les voies respiratoires distales, le mouvement des particules et des gaz se fait par action de masse ou diffusion en étant principalement déterminé par la concentration des

substances inhalées. Celles qui se déposent et persistent dans les alvéoles seront dispersées ou éliminées par le surfactant ou les cellules phagocytaires (Hastedt et al., 2016)

- Le surfactant

Le surfactant pulmonaire forme une monocouche tapissant la paroi alvéolaire. Il est constitué principalement de phospholipides (85 %), dont majoritairement la phosphatidylcholine, mais aussi de protéines tensioactives spécifiques appelées protéines du surfactant (SP) (10 %) et de cholestérol (5 %). Les protéines de types B et C sont principalement associées à la diminution de la tension superficielle pour éviter que les alvéoles collapsent, tandis que les protéines de types A et D sont impliquées dans la défense de l'hôte. L'épaisseur de ce revêtement fluide est variable et généralement inférieure à 0,2 μm (0,07 μm en moyenne). Il contribue, par dispersion et adsorption, à l'élimination des particules qui persistent au niveau alvéolaire. En effet, il permet de maintenir la perméabilité des espaces aériens lors de l'inhalation et peut fortement influencer la dispersion des substances se déposant sur la surface alvéolaire en fonction de leurs caractéristiques physico-chimiques. Les particules ou leurs composants solubles se dissolvent dans le surfactant et peuvent rejoindre la circulation sanguine ou lymphatique (Hastedt et al., 2016).

- Barrière cellulaire

Les complexes protéiques (jonctions serrées, adhérentes et desmosomes) joignant les cellules épithéliales entre elles tout au long de l'épithélium pulmonaire permettent de maintenir son intégrité et de former une barrière physique de protection contre les agents pathogènes colonisant les voies respiratoires et les polluants inhalables (Bhowmick & Gappa Fahlenkamp, 2016).

L'épithélium des voies respiratoires renferme une variété de cellules du système immunitaire inné et adaptatif assurant la protection. Au niveau alvéolaire, l'élimination des agents exogènes est essentiellement assurée par les macrophages ayant comme rôle de phagocyter les particules présentes via le déclenchement d'une réaction inflammatoire se traduisant par un afflux de cellules immunitaires (macrophages, neutrophiles et cellules T). Les macrophages « empoussiérés » sont ensuite transportés le long de la surface alvéolaire vers l'ascenseur muco-ciliaire et/ou transloqués vers l'interstitium pour être éliminés. Cependant, la prise en charge souvent incomplète des particules par les macrophages peut être responsable de leur accumulation au niveau alvéolaire (Casarett et al., 2001; Hastedt et al., 2016).

Les particules les plus fines peuvent traverser l'épithélium pulmonaire, atteindre le tissu sous-jacent en résistant au processus de clairance muco-ciliaire et/ou au processus de phagocytose par les macrophages dans les voies respiratoires profondes et atteindre finalement la circulation sanguine entraînant un impact systémique (Casarett et al., 2001;

Hastedt et al., 2016). Cela est dû à la combinaison d'une grande surface alvéolaire (> 100 m²) et de faibles distances de diffusion entre le sang et les espaces aériens (1 µm), facilitant les échanges entre les 2 compartiments. Au niveau alvéolaire, cette « barrière air-sang » associée au surfactant sécrété joue un rôle primordial dans la défense de l'organisme (Hastedt et al., 2016).

En conclusion, les corps étrangers déposés dans les voies respiratoires peuvent être éliminés via des mécanismes divers de défense physique, par dissolution dans les liquides physiologiques des substances selon leur solubilité ou par un mécanisme combinant à la fois des processus mécaniques et chimiques (clairance muco-ciliaire). Néanmoins, une partie de ces composés peut être également absorbée par l'organisme et exercer un effet systémique.

3. Impacts sanitaires de l'inhalation d'aérosols issus de l'air intérieur

Comme les polluants de l'air intérieur sont susceptibles d'engendrer et/ou d'aggraver de nombreuses maladies respiratoires aiguës ou chroniques (Perez-Padilla et al., 2010), nous décrivons dans cette partie les réponses biologiques consécutives à l'inhalation de ces polluants chez différentes populations et à leurs mécanismes de toxicité.

3.1. Effets sur les populations exposées

La problématique émergente de la pollution de l'air intérieur demeure une préoccupation majeure au niveau mondial en raison de l'impact sanitaire associé sur l'ensemble de la population, et de façon accrue sur les personnes sensibles et fragiles (enfants, personnes âgées, personnes immunodéprimées ou souffrant de maladies pulmonaires chroniques) (Guan et al., 2016). Ces problèmes de santé englobent des manifestations cliniques variées qui, pour la majorité, ne sont pas spécifiques des polluants détectés : l'inflammation pulmonaire, l'obstruction des voies aériennes, une susceptibilité accrue aux infections et une sensibilité accrue aux allergènes. Une revue examinant les effets de polluants de l'air intérieur (combustibles solides, CO, noir de carbone (BC) et particules en suspension) sur les enfants de moins de 5 ans atteints de pneumonie a montré une association entre cette pathologie et les combustibles solides employés seuls ou comme indicateur des PM_{2,5}, contrairement au CO (Adaji et al., 2019).

La pollution de l'air intérieur conduit également à des pathologies du système cardiovasculaire. Près d'un million de décès prématurés chaque année, soit 11 % des décès dus à des cardiopathies ischémiques, peuvent être attribués à l'exposition à la pollution des ménages

(OMS, 2018). Une partie des accidents vasculaires cérébraux serait d'autre part imputable à l'exposition quotidienne aux fumées de combustibles solides et du kérosène (OMS, 2018).

Certains polluants présents dans l'air intérieur présentent un risque cancérigène pour l'homme selon le CIRC qui les a classés dans le groupe 1 des substances cancérigènes avérées pour l'Homme (Benbrahim-Tallaa et al., 2012). Environ 17 % des décès par cancer du poumon chez les adultes sont attribuables à l'exposition à des agents cancérigènes provenant de la pollution de l'air intérieur suite à l'exposition résiduelle de fumée de combustion domestique. Le risque pour les femmes est plus élevé, en raison de leur rôle dans la préparation des aliments.

Les études de la pollution de l'air intérieur ont porté principalement sur les logements. Une étude portugaise a évalué la QAI dans 18 maisons de retraite et son impact sur les voies respiratoires de 269 résidents (personnes âgées) en effectuant des mesures de dioxyde de carbone (CO₂), CO, formaldéhyde, COV, PM₁₀ et PM_{2,5}. Les résultats ont montré des niveaux de PM₁₀, de PM_{2,5} et de CO₂ supérieurs à la valeur de référence (respectivement de 36,9 ; 39,7 et 36,6 %) dans des salles de séjour ainsi que dans des chambres à coucher (respectivement de 77,8 ; 43,4 et 36,4 %). La présence de ces contaminants a été corrélée avec l'apparition de maladies respiratoires chez 29,4 % des participants qui se manifestaient sous forme de toux (19,3 %), expectorations fréquentes (14,9 %), respiration sifflante (67,2 %) et obstruction des voies respiratoires (14,5 %) (Belo et al., 2019). Ces mêmes symptômes ont été rapportés par Almeida-Silva et al. (2014) qui ont observé parallèlement un taux élevé de PM₁₀ dans des maisons de retraite, toujours au Portugal.

L'exposition aux polluants de l'air a également été associée à des troubles cognitifs, à l'apparition de diabète et à des troubles de fertilité (Apte & Salvi, 2016). En outre, une augmentation de PM₁₀ domestiques de 10 µg/m³ d'air a été corrélée à une élévation du risque de décès de 23 à 67 % (Lu et al., 2015).

Après le logement, l'école est le lieu de vie le plus fréquenté par les enfants. Une étude nationale menée par l'OQAI, (2018) entre 2013 et 2017 dans 301 écoles maternelles et élémentaires a permis de fournir un état des lieux de la situation en France. Une pollution particulaire (PM_{2,5}) a été mise en avant dans la majorité des établissements (96 %) avec des concentrations moyennes (20,0 ± 1,0 µg/m³) supérieures à la valeur guide proposée par l'OMS (10 µg/m³ pour une exposition à long terme) pouvant avoir des répercussions sur la population qui fréquente ces lieux (Dassonville et al., 2019). A titre de comparaison, une concentration plus faible en PM_{2,5} a été retrouvée dans des bureaux (9,2 µg/m³ en été et 16 µg/m³ en hiver) dans le cadre du projet OFFICAIR (European Commission, 2020; Mandin et al., 2017).

Une enquête menée en Inde dans une école a permis de mesurer en temps réel les concentrations de particules (PM₁₀, PM_{2,5} et PM₁) (Chithra & Shiva, 2018). Les métaux susceptibles d'induire des effets cancérigènes (chrome (Cr), nickel (Ni) et Pb) et ceux induisant

des effets toxiques mais non cancérigènes (aluminium (Al), Cr, manganèse (Mn), nickel (Ni), vanadium (V)) ont également été analysés (un même métal pourrait provoquer des effets à la fois cancérigènes et non cancérigènes). Un questionnaire a été complété auprès des élèves afin d'établir une corrélation entre la QAI et les symptômes cliniques ressentis (allergies, difficultés de concentration, douleurs dorsales, problèmes d'audition, vertiges, irritations cutanées, brûlures d'estomac, congestion des sinus, éternuements, stress, irritations oculaires, maux de tête et fatigue). L'étude a montré que près de 50 % des élèves ont souffert de troubles de santé mineurs liés au bâtiment (éternuements et maux de tête), 17 % d'allergies et 14 % ont des difficultés de concentration. De plus, les résultats obtenus ont indiqué que l'excès de risque total de cancer calculé s'élève à $4,2 \times 10^{-6}$, soit quatre fois plus important que la valeur acceptable par l'Agence de Protection Environnementale (EPA). Les risques sanitaires dépendent toutefois fortement de la composition chimique des particules, d'où l'intérêt d'en effectuer une caractérisation chimique détaillée pour établir d'éventuels liens avec les effets sanitaires (Chithra & Shiva, 2018). D'une façon plus globale, la revue de Singh & Arora (2018) compilant des études menées dans des écoles en Inde rapporte de façon récurrente un lien entre détérioration de la qualité de l'air et pathologies respiratoires chez les enfants, telles que l'apparition et l'aggravation des infections, de la bronchite, de l'asthme et de la survenue d'une toux chronique.

L'inhalation de polluants aériens peut également intervenir en contexte professionnel. Une revue récente examine la QAI dans des bureaux et les effets des contaminants particuliers sur la santé (Nezis et al., 2019). La concentration moyenne de PM_{10} dans l'air intérieur était plus élevée que celle mesurée à l'extérieur, et augmentait pendant les heures de travail. De nombreux effets ont été rapportés par les employés (irritation des yeux, gorge sèche, écoulement nasal, éternuements, toux, fatigue, irritabilité, difficultés de concentration, maux de tête, vertiges et irritations cutanées) en association avec les polluants particuliers détectés dans les échantillons de poussières collectés.

Dans un autre contexte, l'impact de la QAI sur les travailleurs dans les EFS fait également l'objet de travaux. Dans cet environnement, les particules sont particulièrement riches en métaux et notamment en fer (Fe), connu pour contribuer à des mécanismes pro-oxydants. Les concentrations de PM_{10} et $PM_{2,5}$ mesurées sur les quais du RER étaient supérieures à celles trouvées dans l'air extérieur ou dans l'air intérieur des logements. La concentration moyenne de PM_{10} sur 24 h était comprise entre 70 et $120 \mu\text{g}/\text{m}^3$, mais ces concentrations sont très fluctuantes, pouvant atteindre $1000 \mu\text{g}/\text{m}^3$ sur une heure. D'autre part, le lieu de prélèvement est aussi source de variations, avec par exemple des taux de $330 \mu\text{g}/\text{m}^3$ de PM_{10} au niveau des quais et de $50 \mu\text{g}/\text{m}^3$ dans les couloirs. L'exposition quotidienne des travailleurs à ces particules pourrait être responsable du développement et de l'aggravation des pathologies respiratoires et cardiovasculaires (Ministère de l'intérieur et des outre-mer, 2019).

Une autre étude menée au Bangladesh sur 30 ouvriers du textile (exposés à l'environnement industriel) non-fumeurs a permis de collecter des données sur le taux de particules et de formaldéhyde (Rahman et al., 2020). Ce groupe a été comparé à un groupe témoin de 30 employés de bureau non-fumeurs en bonne santé. Il en ressort que la concentration moyenne journalière de PM₁₀ ($411,0 \pm 17,57 \mu\text{g}/\text{m}^3$) était significativement plus élevée dans l'air intérieur de la zone industrielle par rapport à celle mesurée dans les bureaux ($174,0 \pm 2,33 \mu\text{g}/\text{m}^3/\text{j}$). En outre, ces niveaux étaient plus élevés que la valeur fixée par les autorités bangladaises dans l'air ambiant ($150 \mu\text{g}/\text{m}^3/\text{j}$). Deux marqueurs du stress oxydant (malondialdéhyde plasmatique (MDA) et diène conjugué (CD) plasmatique), qui sont impliqués dans le déclenchement du processus de peroxydation lipidique, ont été mesurés dans le plasma. Les taux de MDA ($0,37 \pm 0,03 \text{ nmol}/\text{L}$) et de CD ($14,74 \pm 0,61 \text{ nmol}/\text{L}$) étaient significativement plus élevés chez les travailleurs du textile par rapport au groupe témoin ($0,18 \pm 0,01 \text{ nmol}/\text{L}$ et $0,04 \pm 0,44 \text{ nmol}/\text{L}$ respectivement). Cette augmentation a été attribuée à l'exposition à des polluants pouvant entraîner une production accrue de radicaux libres. Parallèlement, les niveaux d'acide ascorbique (AA) mesurés dans le plasma étaient nettement plus bas chez les travailleurs ($0,46 \pm 0,04 \text{ mg}/\text{dL}$) que chez les sujets témoins ($1,29 \pm 0,06 \text{ mg}/\text{dL}$). Selon les auteurs, les ouvriers du textile étaient continuellement soumis à des activités physiques, favorisant la diminution de l'AA. Cet épuisement du système de défense antioxydant pourrait entraîner un stress oxydatif, favorisant ainsi l'apparition des pathologies cardiovasculaires incluant l'infarctus du myocarde, l'hypertension artérielle, l'athérosclérose, l'altération de la fréquence cardiaque et des maladies coronariennes.

3.2. Mécanismes de toxicité des particules

Le choix de biomarqueurs caractéristiques des réponses cellulaires et moléculaires permet d'appréhender les mécanismes d'action impliqués dans la toxicité de particules et l'apparition des maladies respiratoires. Ces principaux mécanismes de toxicité sont évoqués dans cette partie.

3.2.1. Stress oxydant

Les espèces réactives de l'oxygène (ERO) désignent une variété d'espèces chimiques dont la réactivité, la longévité et les effets biologiques varient considérablement. On distingue les molécules radicalaires (anion superoxyde ($\text{O}_2^{\bullet-}$) et radical hydroxyle (OH^{\bullet})) et les espèces non radicalaires (peroxyde d'hydrogène H_2O_2).

Le stress oxydant résulte d'une augmentation accrue d'ERO et/ou d'une diminution des défenses anti-oxydantes induisant un déséquilibre (Marchetti et al., 2019). La production de ERO est inhérente à toutes les espèces aérobies. Elles sont produites majoritairement par la chaîne

mitochondriale respiratoire mais aussi par les monoamines oxydases (MAO), les cytochromes P450 (CYP 450), la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate hydrogène (NADPH) oxydase et les cellules immunitaires telles que les macrophages alvéolaires et les polynucléaires neutrophiles (Valavanidis et al., 2013). Des niveaux physiologiques faibles de ERO sont vitaux pour le fonctionnement et l'homéostasie des cellules où elles participent à la régulation des voies de signalisation impliquées dans la croissance, la prolifération, la différenciation et la survie des cellules. Elles contribuent également au déclenchement des systèmes de défenses redox et immunitaire. A l'inverse, des niveaux élevés de ERO sont nocifs et induisent des dommages cellulaires qui peuvent toucher les protéines, les lipides membranaires ou encore l'ADN, à l'origine de processus pathologiques (Leni et al., 2020a). Cependant, le paradigme simpliste selon lequel de faibles niveaux de ERO médient les processus physiologiques et des niveaux élevés induisent une toxicité a été progressivement remplacé par une compréhension plus fine des mécanismes d'oxydoréduction. En effet, ces molécules agissent à la fois comme des médiateurs spécifiques de la signalisation cellulaire et comme des régulateurs centraux de la réponse inflammatoire.

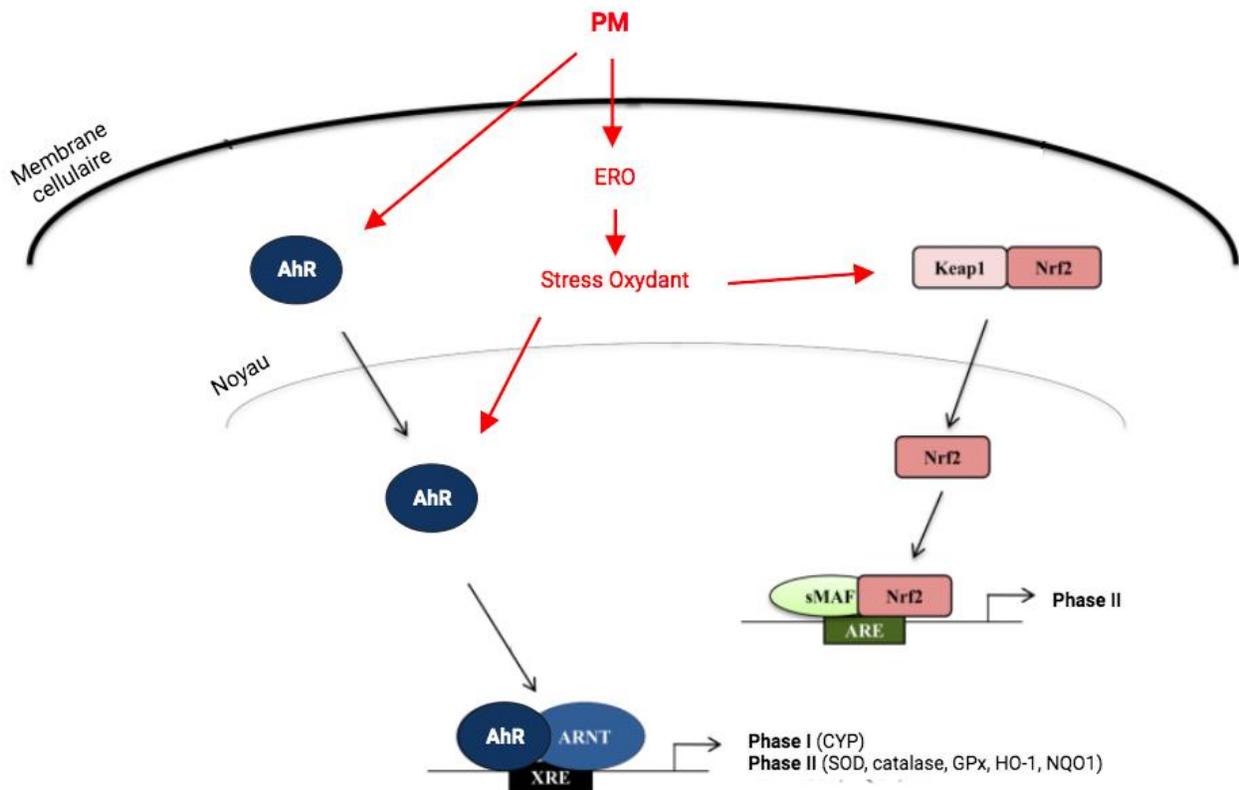


Figure 5. Voies de signalisation AhR et Nrf-2. Adapté de (Whitlock & Baek, 2012).

Le stress oxydatif induit dans l'arbre respiratoire par les particules est une résultante de leurs caractéristiques physico-chimiques, de leur distribution spatiale dans les voies respiratoires et de leur efficacité de dépôt, de la durée d'exposition et des mécanismes de détoxification mis en place selon la susceptibilité des personnes exposées (Crobeddu et al., 2017). Diverses études réalisées *in vitro* sur des polluants particulaires aériens d'origines variées rapportent l'induction d'effets pro-oxydants traduits par la production des ERO, par la modification des expressions géniques ou des activités d'enzymes anti-oxydantes (glutathion peroxydase (GPx), superoxyde dismutase (SOD), catalase (CAT)) ainsi que par l'altération des macromolécules cellulaires (adduits à l'ADN type 8-oxodGuo et protéines oxydées) (Ekstrand-Hammarström et al., 2013; Leclercq et al., 2016; Liu et al., 2016).

Ainsi, la production accrue d'ERO est susceptible d'induire l'activation de 2 voies de signalisation, la voie du facteur nucléaire à l'érythroïde-2-like-2 (Nrf-2) et celle du récepteur aryl hydrocarboné (AhR) (Figure 5). Il s'agit de mécanismes de défense jouant un rôle primordial dans la lutte contre le stress oxydatif au niveau pulmonaire (Niemann et al., 2017; Pardo et al., 2020). Les composants inorganiques adsorbés sur les particules, tels que les métaux (Fe, zinc (Zn) et cuivre (Cu)), peuvent traverser la membrane cellulaire par diffusion ou via des transporteurs membranaires et activer la voie Nrf2. Il en résulte l'expression des principales enzymes antioxydantes, notamment les glutathions peroxydases (GPx), la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT), l'hème-oxygénase-1 (HO-1) et la NAD(P)H quinone oxyréductase (NQO-1) (Niemann et al., 2017). Toute modification de l'homéostasie redox dans la cellule entraîne des changements de configuration qui conduisent à la séparation de Keap-1 du Nrf2 et à la translocation de ce dernier vers le noyau. L'activation de la voie Nrf2 est médiée par les éléments de réponse antioxydant (ARE) qui sont des séquences situées au niveau des gènes cibles. Les composants organiques lipophiles tels que les HAP sont pour leur part capables de traverser la membrane cellulaire et venir agir en tant que ligand de l'AhR (Pardo et al., 2020). L'AhR est directement activé par la fixation de son ligand entraînant la translocation de l'AhR vers le noyau, où il se lie aux éléments de réponses aux xénobiotiques (XRE) et active la transcription des gènes de phase I du métabolisme des xénobiotiques (CYP 450) et des gènes antioxydants (Pardo et al., 2020).

La présence de molécules aux propriétés réductrices dans le tissu pulmonaire, telles que le glutathion réduit (GSH) et des mucines riches en résidus cystéine dans le mucus, constitue les mécanismes non enzymatiques assurant le maintien de l'équilibre redox dans la cellule (Pardo et al., 2020).

3.2.2. Inflammation

Le stress oxydatif induit par les PM est à l'origine d'un processus inflammatoire au niveau du tissu pulmonaire et explique en partie les effets sur la santé (Crobeddu et al., 2017). L'inflammation est le mécanisme majeur impliqué dans la toxicité des particules au niveau des poumons (Falcon-Rodriguez et al., 2016). La réponse inflammatoire pulmonaire passe par la sécrétion de plusieurs médiateurs par les cellules immunitaires, les macrophages alvéolaires et par les cellules épithéliales. Plusieurs études menées *in vitro* sur des cellules épithéliales pulmonaires (telles que les cellules BEAS-2B et A549) pour évaluer l'effet inflammatoire des PM_{2,5} ont rapporté un large éventail de médiateurs inflammatoires sécrétés (interleukine 1 bêta (IL-1 β), interleukine 6 (IL-6), interleukine 8 (IL-8), interleukine 13 (IL-13), facteur de nécrose tumorale (TNF- α), interféron gamma (INF- γ), facteur de stimulation des colonies de granulocytes et de macrophages (GM-CSF), facteurs de croissance transformant alpha (TGF- α) et chimiokine des monocytes (MCP-1)) (Shamsollahi et al., 2021). Les chimiokines, comme l'IL-8, la MCP-1 et la chimiokine (C-C motif) ligand 5 (CCL5) ont pour rôle d'initier la migration des cellules inflammatoires vers le site d'inflammation. Elles sont synthétisées et libérées par les cellules épithéliales respiratoires. L'IL-8 présente en grande quantité est l'un des plus puissants activateurs et médiateurs des neutrophiles. D'autres cytokines multifonctionnelles ayant une activité pro-inflammatoire produites également par les cellules épithéliales, telles que l'IL-1 β , l'IL-6 et le TNF- α permettent l'activation des lymphocytes B et des monocytes impliqués dans la réponse inflammatoire. La production accrue de ces différents médiateurs a été régulièrement rapportée dans des cellules épithéliales bronchiques suite à l'exposition à différents types de particules comme celles issues de la combustion de biomasse en milieu intérieur ou extérieur (telles que PM₁₀, PM_{2,5} ou PM₁) (Bengalli et al., 2019; Dieme et al., 2012; Juarez Facio et al., 2022; Leclercq et al., 2016; Luo et al., 2021; Wu et al., 2018).

Les particules les plus fines peuvent rejoindre la circulation générale et induire l'activation du système redox et inflammatoire d'une manière systémique, aboutissant à un dysfonctionnement multi-viscéral, y compris au niveau du cerveau, du système cardiovasculaire, des reins et du foie (Gangwar et al., 2020).

3.2.3. Génotoxicité

Le stress oxydatif induit la formation de radicaux qui à leur tour peuvent interagir notamment avec l'ADN. Des effets génotoxiques (cassures de l'ADN, micronoyaux, phosphorylation de l'histone H2AX (γ -H2AX) et épigénétiques (modification du statut de méthylation ou de l'activité des télomérases) susceptibles de contribuer à des effets délétères différés sont également observés *in vitro* après exposition de cellules pulmonaires (BEAS-2B, A549 et NHBE) à des particules issues de différentes sources (particules atmosphériques

urbaines, particules issues de la combustion du bois, de sites de constructions de tunnels) (Borgie et al., 2015; Danielsen et al., 2009; Dominici et al., 2013; Leclercq et al., 2016, 2017).

Par exemple, Friesen et al. (2022) ont évalué la toxicité des particules de silice cristalline sur des modèles de monocultures (A549 et THP-1) et de co-cultures (A549 et THP-1 différenciées), cultivées submergées ou à l'IAL. Les réponses toxiques observées dépendaient considérablement du modèle de culture utilisé et du scénario d'exposition. Aucune modification significative n'a été observée au niveau des gènes impliqués dans la réponse aux dommages à l'ADN, que ce soit avec les monocultures ou avec les co-cultures, dans les conditions en immersion ou à l'IAL. Toutefois, il a été rapporté que le quartz induit un stress oxydatif et des dommages à l'ADN dans les cellules épithéliales pulmonaires A549 et RLE-6TN (lignée cellulaire alvéolaire (AEC2) de rat) ainsi qu'un stress oxydatif dans les cellules A549.

Il été mis en évidence qu'il existe un lien entre l'exposition aux $PM_{2,5}$, la mutagénicité et la génotoxicité. Des cellules BEAS-2B exposées aux $PM_{0,3-2,5}$ (3 et 15 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) ou aux extraits organiques préparés à partir des fractions $PM_{0,3-2,5}$ et $PM_{2,5}$ (15 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) issus de sites industriels à Dunkerque ont induit la formation d'adduits de l'ADN de type 8-OHdG. Ceux-ci augmentaient de manière dose-dépendante après 48 heures d'exposition, avec une réponse plus marquée lorsque les cellules étaient exposées à des particules de taille plus petite. Une diminution significative de l'activité de la télomérase a été observée après 72 h d'exposition des cellules BEAS-2B aux $PM_{0,3-2,5}$ et aux extraits organiques. La longueur des télomères était significativement diminuée après exposition aux extraits organiques de $PM_{2,5}$. Les auteurs ont associé ces effets à la présence de HAP associés aux particules. Certains d'entre eux sont des ligands du récepteur Ah, capables d'induire un stress oxydant (Billet et al., 2018a).

4. Règlementations

Il convient de souligner l'importance du coût économique associé à la pollution de l'air intérieur. Une étude menée par l'ANSES et l'OQAI en 2014 a fourni une première estimation du coût afférent à six polluants majeurs de l'air intérieur en France, à savoir le benzène, le trichloréthylène, le radon, la fumée de cigarette, les matières particulaires et le monoxyde de carbone. Ce coût s'élevait à 20 milliards d'euros par an, dont environ un milliard d'euros pour le remboursement de médicaments antiasthmatiques (Ministère de l'intérieur et des outre-mer, 2019).

Les impacts sanitaires et économiques de la pollution de l'air intérieur ont conduit à la mise en place de réglementations visant à améliorer la QAI et ainsi réduire l'exposition de la population aux polluants présents dans les environnements intérieurs afin de préserver leur santé. Elle s'articule principalement autour la sensibilisation de la population et la mise en œuvre de réglementations relatives à certains polluants et lieux. C'est le code de l'environnement qui

domine les règles à respecter en matière de QAI. La loi promulguée en 1997 sur l'air et l'utilisation rationnelle de l'énergie (loi LAURE) (article L. 220-1 du code de l'environnement), identifie le lien entre qualité de l'air et la santé, et attribue la même importance à l'air ambiant et à l'air intérieur. Elle est destinée à respecter « le droit reconnu à chacun à respirer un air qui ne nuise pas à sa santé ». La définition de la pollution atmosphérique (article L. 220-2 du code de l'environnement) englobe également les espaces clos (Legifrance, 2016). Le premier Plan National Santé Environnement (PNSE) réalisé entre 2004 et 2008 s'accompagne de la création de l'OQAI dont l'objectif principal est d'élaborer des valeurs guides de l'air intérieur. S'y ajoute l'étiquetage obligatoire de certains produits utilisés pour la construction et la surveillance du respect de la QAI dans les établissements destinés à recevoir du public.

- Élaboration de Valeurs Guides de l'Air Intérieur (VGAI)

Depuis 2004, l'ANSES mène une mission d'élaboration des VGAI. Elles sont définies comme étant « des concentrations dans l'air d'une substance chimique en dessous desquelles aucun effet sanitaire ou aucune nuisance ayant un retentissement sur la santé n'est attendu pour la population générale en l'état des connaissances actuelles » (Ministère de la Santé et de la Prévention, 2023). Ces valeurs sont caractéristiques d'une exposition de la population générale à une substance chimique donnée présente dans l'air intérieur des bâtiments. L'élaboration de VGAI repose principalement sur le profil toxicologique de la substance : son mécanisme d'action, les valeurs guides et les valeurs toxicologiques de référence (VTR) disponibles dans la littérature. Treize polluants d'intérêt de l'air intérieur ont fait l'objet d'une expertise de l'ANSES (ANSES, 2018). Les valeurs retenues pour ces polluants sont résumées dans le Tableau 1.

A l'état actuel des connaissances, l'ANSES n'a pas jugé pertinent de proposer des VGAI pour les particules. En effet, la démarche d'élaboration de VGAI n'est pas applicable *stricto sensu*, dans la mesure où celles-ci ne font pas l'objet de valeurs guides fondées strictement sur des données sanitaires fournies par des organismes nationaux ou internationaux, ni de valeur toxicologique de référence dans les bases de données. L'ANSES a donc préconisé d'adopter pour les particules les valeurs guides de l'OMS pour l'amélioration de la qualité de l'air intérieur (Tableau 1) (HCSP, 2013).

Dans ce contexte, le Haut Conseil de la Santé Publique (HCSP) a préconisé ensuite sur la base des valeurs définies par l'ANSES, des valeurs repères pour l'air intérieur (VRAI), fixées par échéances temporelles jusqu'à atteindre la VGAI, afin de prévenir les effets associés à une exposition chronique aux particules ; cette temporalité étant pertinente dans le cas de l'exposition dans les environnements clos (logement, locaux recevant du public ou les lieux de travail) (HCSP, 2013). Il s'agit d'une concentration au-dessus de laquelle des actions correctives

à long terme doivent être entreprises afin d'identifier les sources de pollution, de les neutraliser et de réduire leur impact (Ministère de la Santé et de la Prévention, 2023).

Tableau 1. Valeurs guides de qualité d'air intérieur (VGAI). Adapté de (ANSES, 2018).

Substances	Année	Temps d'exposition	VGAI
CO	2007	Court terme	
		8 h	10 mg/m ³
		1 h	30 mg/m ³
		30 min	60 mg/m ³
		15 min	100 mg/m ³
Benzène	2008	Court terme : de 1 à 14 j	30 µg/m ³
		Intermédiaire : de 14 j à 1 an	20 µg/m ³
		Long terme : > 1 an	10 µg/m ³
		Long terme : vie entière	0,2 à 2 µg/m ³
Naphtalène	2009	Long terme : > 1 an	10 µg/m ³
Trichloroéthyle	2009	Intermédiaire : de 14 j à 1 an	800 µg/m ³
		Long terme : vie entière	2 à 20 µg/m ³
Tétrachloroéthylène	2010	Court terme : de 1 à 14 j	1380 µg/m ³
		Long terme : > 1 an	250 µg/m ³
Particules : PM _{2,5} et PM ₁₀	2010	Court terme (selon OMS)	25 et 50 µg/m ³
Acide cyanhydrique (HCN)	2011	Long terme (selon OMS)	10 et 20 µg/m ³
Dioxyde d'azote (NO ₂)	2013	Court terme : 1 h	200 µg/m ³
		Long terme : > 1 an	20 µg/m ³
Acroléine	2013	Court terme : 1 h	6,9 µg/m ³
		Long terme : > 1 an	0,8 µg/m ³
Acétaldéhyde	2014	Court terme : 1 h	3 000 µg/m ³
		Long terme : > 1 an	160 µg/m ³
Ethylbenzène	2016	Court terme : 24 h	22 000 µg/m ³
		Long terme : > 1 an	1 500 µg/m ³
Formaldéhyde	Mise à jour en 2018	Court terme : A respecter de manière répétée et continue pour toute la journée	100 µg/m ³
		Long terme : > 1 an	30 µg/m ³
Toluène	2018	A respecter pour une mesure sur le court et le long terme	20 000 µg/m ³

A ce jour, le HCSP a publié des VRAI pour le formaldéhyde, le benzène, le naphtalène, le trichloroéthylène, le tétrachloroéthylène (perchloroéthylène) et les particules (12 et 18 µg/m³ pour les PM_{2,5} et PM₁₀ respectivement en 2023). Des valeurs d'action rapide (VAR) qui correspondent à un dépassement important du niveau de concentration de la VRAI nécessitant des interventions à court terme ont également été élaborées par le HCSP. L'objectif cible était

d'atteindre une moyenne annuelle de $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$ pour les $\text{PM}_{2,5}$ et de $15 \mu\text{g}/\text{m}^3$ pour les PM_{10} en 2025 (Ministère de la Santé et de la Prévention, 2023).

Le code de l'environnement prévoit sur la base des avis du HCSP la définition de valeurs guides de l'air intérieur « réglementaires » qui se caractérisent par « un niveau de concentration de polluants dans l'air fixé, à atteindre, dans la mesure du possible, dans un délai donné, pour un espace clos donné, dans le but d'éviter, de prévenir ou de réduire les effets nocifs sur la santé humaine ». Ces valeurs sont établies par les autorités politiques, précisément le ministère de la transition écologique, et sont associées à des mesures de gestion opposables. Seules deux substances parmi les treize identifiées par l'ANSES (Tableau 1) ont fait l'objet de valeurs guides à caractère réglementaire depuis 2011. Il s'agit du formaldéhyde et du benzène dont les valeurs réglementaires ont été fixées pour une exposition à long terme à $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$ en 2023 et à $2 \mu\text{g}/\text{m}^3$ en 2016 respectivement (Ministère de l'intérieur et des outre-mer, 2019).

- Étiquetage obligatoire des produits de construction

Depuis 2012, les emballages de certains produits de construction et de bricolage mis sur le marché doivent porter une étiquette indiquant leur niveau d'émission (quatre niveaux d'émission croissant de A+ à C). L'étiquetage des ameublements, bien que prévu, tarde pour sa part à entrer en vigueur.

- Surveillance du respect de la QAI

La Loi Grenelle 2 (article L. 221-8 du Code de l'environnement) du 12 juillet 2010 implique la surveillance obligatoire de la qualité de l'air dans certains établissements recevant du public. Cette surveillance implique l'évaluation obligatoire des dispositifs d'aération des bâtiments, la mesure des polluants (3 substances jugées prioritaires : formaldéhyde, benzène et CO_2) par des organismes accrédités ainsi que la mise en place d'actions préventives visant à éviter l'émission des polluants réglementés. L'évaluation de ces deux paramètres doit être renouvelée tous les sept ans (Ministère de l'intérieur et des outre-mer, 2019).

La qualité de l'air dans les locaux de travail où sont émis des polluants sont considérés comme locaux à pollution spécifique pour lesquelles s'appliquent des Valeurs Limites d'Exposition Professionnelles (VLEP) réglementaires élaboré par l'ANSES avec des mesures strictes attribuées au dépassement de ces valeurs limites. Elles sont fixées dans le code du travail (article L4121-1) (INRS, 2016).

Enfin, il n'existe actuellement aucune valeur de référence établie pour les poussières sédimentées et contaminées par des substances (ANSES, 2019).

5. Évaluation de la pneumotoxicité *in vitro*

Ce chapitre est consacré à l'analyse et à la comparaison de différentes approches couramment utilisées *in vitro* pour évaluer la pneumotoxicité. Cela inclut l'utilisation de différents modèles cellulaires, modes de culture et d'exposition. Dans ces différentes approches, nous avons également recensé les réponses biologiques observées, spécifiquement après expositions aux polluants particuliers de l'air intérieur.

5.1. Méthodes comparées

De nouveaux modèles cellulaires sont utilisés *in vitro* pour étudier les effets des polluants inhalés sur la santé respiratoire humaine. Ces modèles, qui se rapprochent de plus en plus de la physiologie humaine, permettent une analyse plus fine des mécanismes de toxicité cellulaire et moléculaire en s'affranchissant des limites éthiques et des coûts associés à l'expérimentation animale (Loret et al., 2018).

5.1.1. Modèles cellulaires pulmonaires

Lors de l'inhalation de polluants, les cellules épithéliales sont les premières cibles exposées car elles tapissent la totalité de la surface des voies respiratoires. De ce fait, elles représentent les principaux modèles cellulaires utilisés qui se déclinent sous forme de lignées cellulaires, de cellules primaires et d'organes-sur-puce.

5.1.1.1. Lignées cellulaires

Les lignées cellulaires sont issues de cellules cancéreuses prélevées chez un patient ou de cellules saines immortalisées. Globalement, les lignées ne possèdent pas toutes les propriétés physiologiques observées chez l'être humain, mais elles ont l'avantage de se multiplier sur de nombreuses générations sans dérives majeures de leurs caractéristiques de départ. Différents types de lignées cellulaires épithéliales pulmonaires sont disponibles. Les plus couramment utilisées en toxicologie, représentatives du niveau bronchique sont les cellules BEAS-2B, 16HBE14^o, Calu-3 et NCI-H292. Au niveau alvéolaire, le modèle A549 est de loin le plus répandu (Bhowmick & Gappa-Fahlenkamp, 2016).

La lignée BEAS-2B dérive de cellules épithéliales bronchiques immortalisées par l'introduction du gène du virus SV40 (Simian virus 40) (Bhowmick & Gappa-Fahlenkamp, 2016). Elles expriment un large éventail de cytokines et de substances anti-oxydantes. De ce fait, elles

sont largement utilisées comme modèle pour les études de toxicologie, les études sur les maladies respiratoires infectieuses, les lésions pulmonaires et le cancer (BéruBé et al., 2009). Il est important de souligner que lorsque les cellules BEAS-2B sont cultivées à l'IAL, elles sont incapables de se différencier et de former une barrière épithéliale fonctionnelle due à l'absence de jonctions serrées (Bhowmick & Gappa-Fahlenkamp, 2016). Elles n'expriment pas la protéine MUC5AC qui joue un rôle crucial dans la clairance muco-ciliaire (Rayner et al., 2019). L'absence de jonctions serrées, attestées par des valeurs de la résistance électrique trans-épithéliale (TEER) faibles ne permet pas d'obtenir une barrière épithéliale fonctionnelle (Braakhuis et al., 2020). Enfin, leur immunogénicité est également nettement différente comparée aux conditions de culture en immergé (Bhowmick & Gappa-Fahlenkamp, 2016).

La lignée 16HBE14o- est également obtenue à partir de cellules épithéliales bronchiques humaines immortalisées par le virus simien 40 (SV40). Lorsque les cellules sont cultivées à l'IAL, les cellules 16HBE14 présentent un niveau de différenciation plus avancé que les BEAS-2B (Hiemstra et al., 2018). Elles s'organisent en multicouches de cellules polarisées qui peuvent se différencier en cellules ciliées et forment des jonctions serrées fonctionnelles assurant le maintien de l'intégrité de la barrière épithéliale (BéruBé et al., 2009). Une étude récente a montré qu'elles pouvaient produire des quantités majorées de protéine MUC5AC en présence d'ERO (Xu et al., 2021). Elles ont également la capacité de sécréter des cytokines d'où leur usage dans les études des réponses inflammatoires associées aux maladies respiratoires comme la mucoviscidose.

Les cellules Calu-3 sont issues d'un adénocarcinome bronchique. Elles sont capables de se différencier en un épithélium muco-ciliaire en IAL (Bhowmick & Gappa-Fahlenkamp, 2016). Elles sont largement utilisées pour étudier les caractéristiques de la fonction barrière, les lésions bronchiques et les maladies respiratoires telles que la maladie induite par le virus respiratoire syncytial qui atteint plus spécifiquement les cellules épithéliales ciliées (Bhowmick & Gappa-Fahlenkamp, 2016).

Les cellules NCI-H292 proviennent d'un patient atteint d'un cancer pulmonaire à grandes cellules. Elles sont connues pour leur capacité à exprimer des marqueurs du développement tumoral, notamment des molécules d'adhésion (EpCAM) et les cytokératines 7 et 20. Cultivées à l'IAL, ces cellules sont capables de former des jonctions serrées et une couche étanche (Van Schilfgaarde et al., 1995). Elles miment étroitement les réponses cellulaires de l'épithélium pulmonaire *in vivo* suite à une infection au *S. pneumoniae* (Bhowmick & Gappa-Fahlenkamp, 2016). Ces cellules sont hautement immunogènes et ont été largement utilisées pour l'étude des interactions entre l'hôte et les pathogènes ainsi que pour des études sur les cancers pulmonaires (Bhowmick & Gappa-Fahlenkamp, 2016).

Il n'existe que peu de modèles alvéolaires. La lignée tumorale A549 est une des plus utilisées. Elle est issue d'un adénocarcinome pulmonaire et présente un phénotype de cellules

épithéliales alvéolaires de type II. Cultivées à l'IAL, elles ont la capacité de sécréter du surfactant (protéine SP-A et SP-C qui sont normalement sécrétées par les AEC2 *in vivo*) et de former des jonctions serrées. Cependant, contrairement aux cellules AEC2, les A549 ne présentent pas de jonctions serrées ni de TEER élevées (Bhowmick & Gappa-Fahlenkamp, 2016). Elles sont largement utilisées pour la transfection, les études de médicaments et de maladies infectieuses respiratoires à la fois en monoculture mais également en co-culture associées à un autre modèle cellulaire (Bhowmick & Gappa-Fahlenkamp, 2016).

La lignée NCI-H441 a été isolée à partir du liquide péricardique d'un patient atteint d'un adénocarcinome pulmonaire. Il s'agit de cellules alvéolaires qui se caractérisent par une morphologie similaire à celle observée *in vivo* avec présence de cellules Club. Lorsque les cellules sont cultivées à l'IAL, elles forment une monocouche polarisée étanche avec des valeurs de TEER élevées. Ce modèle exprime aussi des marqueurs typiques des cellules AEC2 humaines, tels que le facteur de transcription thyroïdien 1 et les protéines du surfactant (SP-A, SP-B, SP-C et SP-D) mais également des transporteurs clés comme la glycoprotéine P. Cette lignée est utilisée surtout pour étudier le transport cellulaire des xénobiotiques (Salomon et al., 2014).

Les cellules hTERT représente une lignée cellulaire alvéolaire humaine immortalisée de type I, générée à partir de cellules primaires de type II. Contrairement aux cellules AEC2, ces cellules n'expriment pas le facteur de transcription tissu-spécifique 1 (TTF-1) mais elles sont positives à la cavéoline-1 qui est impliquée dans le transport vésiculaire (endocytose, potocytose, transcytose) et dans l'homéostasie cellulaire du cholestérol, agissant comme modulateurs des cascades de transduction des signaux et comme suppresseur de tumeurs. Une dédifférenciation en culture peut être observée (BéruBé et al., 2009).

5.1.1.2. Cellules primaires

Les cellules primaires sont des cellules normales prélevées directement chez un donneur et conservent les mêmes caractéristiques physiologiques et d'organisation que des cellules *in vivo*. Cependant, elles perdent ces caractéristiques assez rapidement au cours des divisions, et ont une durée de vie limitée une fois mises en culture (Hiemstra et al., 2018).

Différents modèles sont commercialisés et sont de plus en plus utilisés en recherche : les cellules trachéo-bronchiques connues sous le nom de NHBE pour « Normal Human Bronchial Epithelial Cells », PBEC « Primary Bronhial Epithelial Cells » ou encore hBEC « human Bronchial Epithelial Cells ». Lorsqu'elles sont cultivées à l'IAL, elles présentent l'intérêt de pouvoir se différencier en un épithélium pseudo-stratifié constitué de cellules basales, de cellules caliciformes sécrétrices de mucus et de cellules ciliées étroitement connectées par des jonctions serrées dès le 14^{ème} jour de culture, se rapprochant d'un épithélium physiologique (Figure 6) (Rayner et al., 2019). La reconstitution d'un épithélium pseudo-stratifié pourvu d'un système muco-ciliaire opérationnel est primordial dans l'évaluation de la toxicité des particules. En effet,

le battement ciliaire et la présence de mucus limitent l'accès des particules au tapis cellulaire, mimant les conditions physiologiques. Le mucus possède également des propriétés anti-oxydantes qui limitent potentiellement les effets des ERO (Boublil et al., 2013). Selon Ekstrand-Hammarström et al. (2013), seules les NHBE présentent une sensibilité aux endotoxines bactériennes de type lipopolysaccharides (LPS), susceptibles de contribuer à la réponse pro-inflammatoire. Ce modèle est cependant dépourvu de cellules neuroendocrines et de cellules Club (Boei et al., 2017).

Les cellules NHBE possèdent un profil d'expression génique proche de celui correspondant aux conditions *in vivo*. Il convient de garder en tête que les capacités de différenciation peuvent toutefois varier d'un donneur à l'autre, induisant une variabilité de ce modèle.

Des travaux ont mis en évidence des différences significatives de réponses notamment au niveau des profils d'expression génique entre des lignées alvéolaires A549 et des cellules bronchiques, qu'il s'agisse de cultures primaires de NHBE ou d'une lignée immortalisée dérivée de cellules NHBE (Scheffler et al., 2015). Ekstrand-Hammarström et al. (2013) ont montré que la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires variait significativement entre des cellules BEAS-2B et des NHBE traitées par des poussières urbaines, alors que le niveau des ERO restait quasiment similaire.

Le modèle SAEC est également utilisé comme modèle d'épithélium broncho-alvéolaire. Cultivées à l'IAL, ces cellules sont capables de se différencier en épithélium muco-ciliaire avec sécrétion de mucus et de former une barrière fonctionnelle grâce à la présence de jonctions serrées (Lan et al., 2021). Contrairement aux cellules NHBE, ce modèle exprime la protéine spécifique des cellules Club (CCSP) et d'autres protéines comme les protéines SP-A et SP-D (Bhowmick & Gappa-Fahlenkamp, 2016).

Des modèles d'épithélium respiratoire reconstitué prêts à l'emploi sont commercialisés par les sociétés MatTek® et Epithelix®. Ils sont obtenus à partir de cellules primaires issues de donneurs sains ou atteints de pathologies respiratoires, cultivées à l'IAL. Les modèles MucilAir™ et EpiAirway™ sont d'origine trachéo-bronchique et nasale alors que les modèles AlveolAir™ et EpiAlveolar™ sont obtenus à partir de cellules alvéolaires (BéruBé et al., 2009; Huh et al., 2011). Les modèles trachéo-bronchiques tridimensionnels peuvent se différencier en cellules sécrétrices de mucus et cellules ciliés formant une multicouche cellulaire étanche (jonctions serrées). Grâce à un renouvellement continu des cellules, ces modèles ont l'avantage de pouvoir être maintenus en culture sur des périodes prolongées de 6 à 12 mois, ce qui permet d'étudier l'effet d'expositions répétées ou chroniques. Les modèles alvéolaires tridimensionnels sont eux aussi stables dans le temps et la différenciation spontanée *in vitro* des AEC2 en AEC1 est bien maîtrisée (Epithelix, n.d.). Bien que ces modèles soient proches des conditions physiologiques réelles, ils sont néanmoins coûteux et plus difficiles à manipuler.

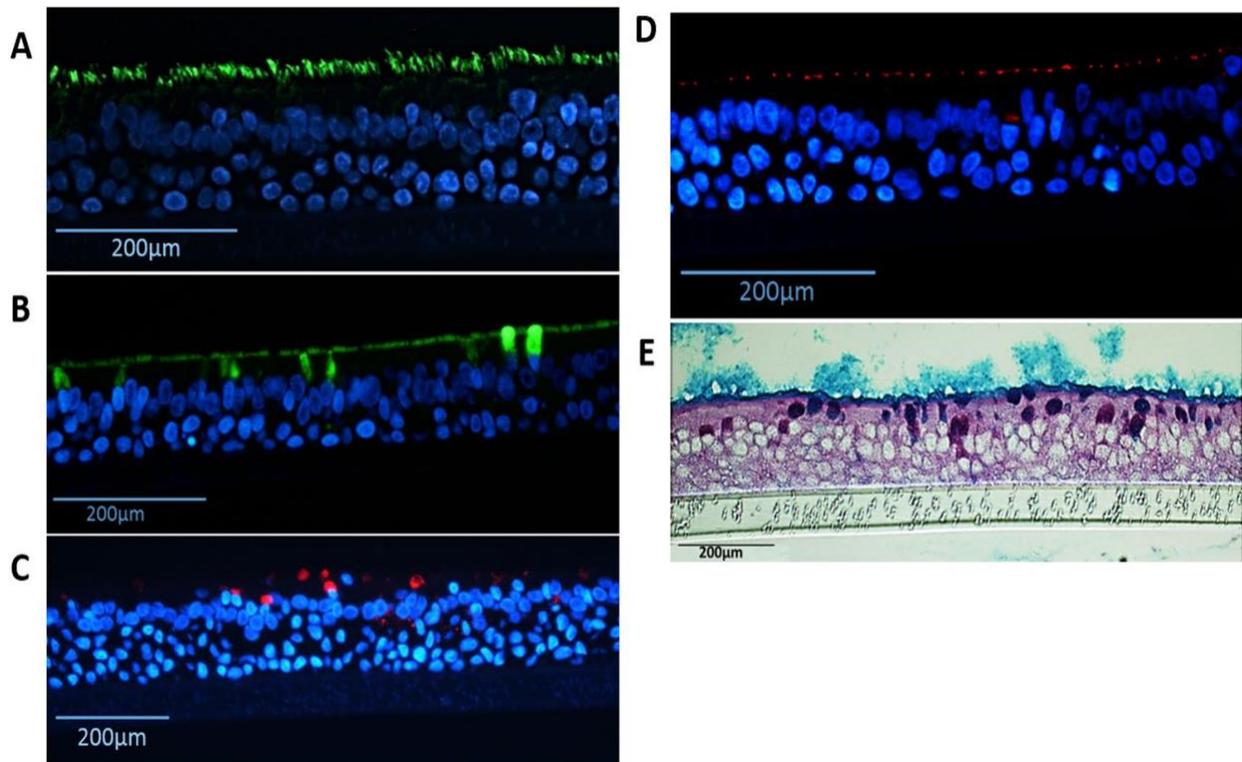


Figure 6. Epithélium pseudo-stratifié issu de cellules NHBE différenciées après 4 semaines de culture à l'IAL. Immunomarquage. A : l' α -tubuline identifie les cellules ciliaires (en vert). B : la mucine MUC5B marque les cellules sécrétrices de mucus (en vert). C : la mucine MUC5AC indique les cellules sécrétrices de mucus (en rouge). D : marquage des jonctions serrées (en rouge) et des noyaux cellulaires (DAPI en bleu). E : coloration à l'acide per-iodique-Schiff/bleu alcian des cellules goblet et du mucus sécrété à la surface de l'épithélium (en bleu). D'après (Rayner et al., 2019).

En conclusion, le modèle idéal n'existe pas et chaque modèle à ses avantages et ses inconvénients. Cependant, les avancées dans le domaine de la culture cellulaire ont permis aujourd'hui d'avoir recours à des modèles de plus en plus représentatifs de l'organisation cellulaire et des conditions spécifiques du tractus respiratoires *in vivo* afin de mieux prédire les réponses biologiques observées chez l'homme lors de son exposition à un toxique inhalé. Les lignées ne sont pas représentatives de la différenciation organisationnelle de l'épithélium respiratoire, ce qui peut induire des profils de réponses biaisés. Elles présentent néanmoins une plus grande facilité de manipulation et conduisent à des résultats plus reproductibles en raison de l'absence de variabilité entre les donneurs.

5.1.1.3. Organoïdes et organes-sur-puce

Les organoïdes sont des cultures composées de différents types cellulaires spécifiques à un organe, obtenus à partir de cellules souches ou progénitrices. Les organoïdes respectent

l'organisation tissulaire et présentent certaines fonctions similaires à celles de cet organe *in vivo* (Hiemstra et al., 2018). Jusqu'à présent, peu d'organoïdes pulmonaires ont été développés en raison de la difficulté de simuler les expositions par inhalation et aux défis techniques additionnels liés à la nature tridimensionnelle de la culture et des composants de sa matrice (Hiemstra et al., 2018).

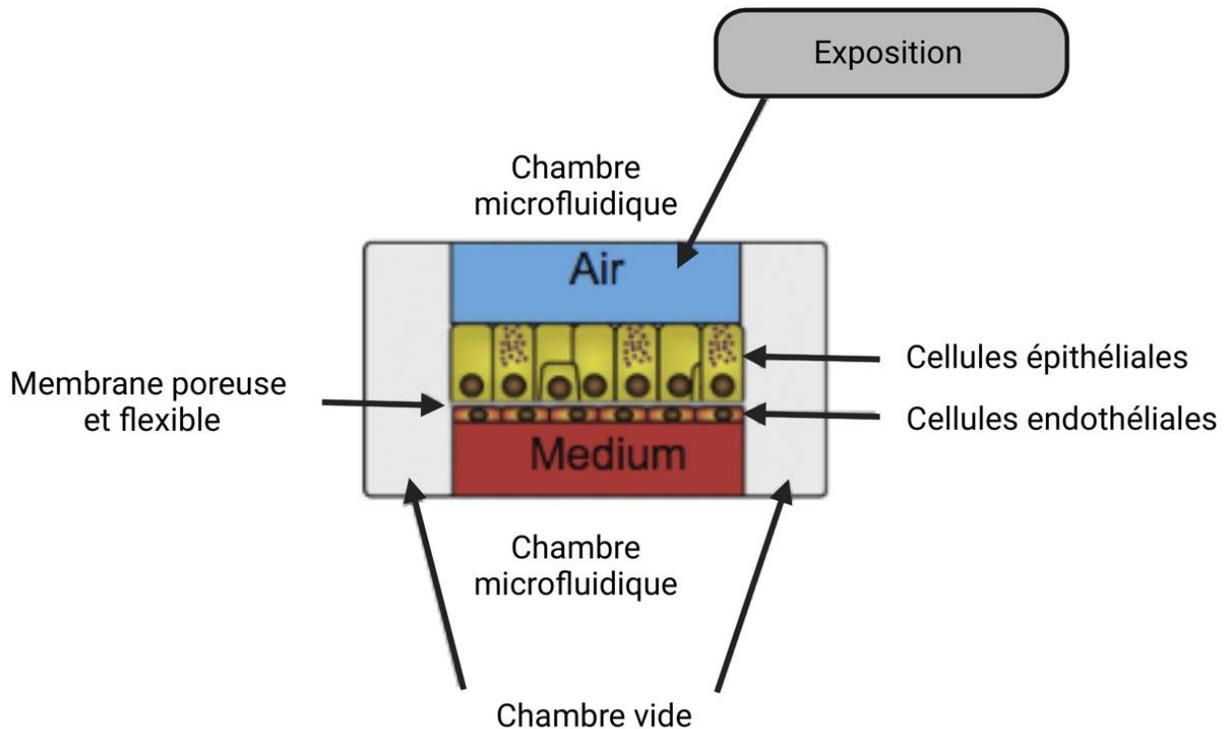


Figure 7. Structure poumon-sur-puce. Adapté de (Hiemstra et al., 2018).

Les organes sur puce sont des modèles d'organes issus de la micro-ingénierie, composés de plusieurs types de cellules associés à un dispositif micro-fluidique assurant l'apport continu de nutriments et l'élimination des déchets (Figure 7). Il est formé d'une co-culture de cellules épithéliales et endothéliales cultivées à l'IAL pouvant être soumises à des forces d'étirement mécanique afin de recréer les mouvements respiratoires physiologiques (Huh, 2010). Les modèles d'organes alvéolaires sur puce sont limités à l'utilisation de la lignée de cellules tumorales alvéolaires A549. Le développement d'un modèle bronchio-alvéolaire basé sur l'utilisation de cellules épithéliales bronchiolaires primaires différenciées (muco-ciliaires) et de cellules endothéliales primaires (micro-vasculaires) permet l'analyse de la physiopathologie pulmonaire (Benam et al., 2016). Il permet d'étudier les effets synergiques de l'endothélium et de l'épithélium pulmonaire sur la sécrétion de cytokines, d'identifier de nouveaux biomarqueurs d'exacerbation de la maladie ainsi que d'évaluer les réponses thérapeutiques des anti-inflammatoires. L'utilisation de cellules épithéliales de patients atteints de BPCO cultivées

dans ce modèle tridimensionnel a permis de retrouver des caractéristiques spécifiques de la maladie, telles qu'une inflammation accrue en réponse à des expositions virales et bactériennes (Benam et al., 2016). D'autres études confirment l'intérêt de l'étirement mécanique, de la co-culture et de la micro-fluidique qu'offrent ces systèmes (Hiemstra et al., 2018). Bien que mimant la fonction respiratoire en mode « dynamique », le coût, la complexité et la fragilité de ces modèles restreignent encore leur utilisation.

5.1.2. Conditions de culture et d'exposition

5.1.2.1. Culture en immergé

Les cellules cultivées sur des supports en plastique dans des conditions immergées correspondent à un mode de culture classique en deux dimensions. Bien que largement utilisé, ce mode d'exposition apparaît peu pertinent pour étudier la toxicité de polluants inhalés car il est éloigné des conditions physiologiques spécifiques du tissu pulmonaire (Hiemstra et al., 2018). En particulier, ces cultures ne modélisent pas l'épithélium pseudo-stratifié avec ses différents types cellulaires qui se trouve à l'IAL dans le tractus respiratoire, ni la couche de mucus au niveau trachéo-bronchique ou de surfactant au niveau alvéolaire.

5.1.2.2. Culture à l'interface air-liquide (IAL) et Vitrocell®

Afin de reproduire des conditions plus physiologiques, des modèles de cultures tridimensionnelles ont été développées. Ils consistent àensemencer les cellules sur des membranes microporeuses qui garantissent les échanges avec le milieu de culture placé en partie basale de l'insert tandis qu'en partie apicale, le tapis cellulaire se trouve à l'air libre d'où le terme d'interface air-liquide. Les cellules sont tout d'abordensemencées sur les inserts et cultivées en immergé jusqu'à confluence. Le milieu en apical est ensuite retiré et la composition du milieu en basal est modifiée afin d'apporter les facteurs qui permettront la différenciation en plusieurs types cellulaires. Ce type de culture peut être conservé pendant plusieurs semaines et aboutit à un pseudo-épithélium plus ou moins différencié. Par exemple, la différenciation des cultures 3D de cellules NHBE est achevée au bout de 4 semaines à l'IAL (Rayner et al., 2019), tandis que Juarez Facio et al. (2022) ne maintenaient la lignée BEAS-2B en culture IAL que sur une dizaine de jours seulement.

En outre, le terme « IAL » peut désigner aussi le mode d'exposition des cellules aux polluants. Les cultures sur insert permettent d'exposer directement les cellules à des contaminants inhalables à l'aide de dispositifs d'aérosolisation tels que ceux proposés par Vitrocell®, Cultex® ou encore expoCUBE®. Ces dispositifs constituent une approche pertinente qui se rapproche des conditions physiologiques. Le système VITROCELL® Cloud MAX choisi pour

mener le projet « ToxiALMix » est conçu pour de petits volumes de nébulisation, ce qui le rend utilisable dans les cas où le matériel n'est disponible qu'en petite quantité ou si les substances à tester sont particulièrement coûteuses. La nébulisation est effectuée directement dans des chambres d'exposition de faible volume, adaptées à la surface des inserts. La zone non cellulaire (pourtour de l'insert) est considérablement réduite, ce qui, associée à une bonne efficacité de dépôt, limite les pertes de matériel. Ce système, muni d'une microbalance, permet de contrôler la dose réellement déposée sur la surface du tapis cellulaire (Figure 10) (Vitrocell, n.d.).

La comparaison entre les cultures conventionnelles immergées et les cultures à l'IAL montrent des différences en termes de réponses biologique. Lacroix et al. (2018) ont par exemple montré qu'après exposition à l'Aerosil 200 et au dioxyde de silicium (SiO_2), la libération d'IL-8 par les cellules A549 est significativement plus élevée lorsque les cellules sont immergées comparé à l'IAL. Le profil d'expression protéique est lui aussi modifié entre ces deux conditions, notamment en ce qui concerne la production de mucines MUC1 et MUC5AC (Bhowmick & Gappa-Fahlenkamp, 2016).

Une diminution des effets inflammatoires a été observée après exposition des cellules NHBE cultivées à l'IAL à des PM_{10} et $\text{PM}_{2,5}$ par rapport aux cultures en immergé (Ghio et al., 2013). Boei et al. (2017) ont pour leur part démontré que dans le cas de cellules primaires bronchiques humaines normales, les processus de métabolisation impliquant des CYP 450 ne se mettent en place que lorsqu'elles sont complètement différenciées à l'IAL. Dans ces conditions, les cellules NHBE conservent leur capacité à fabriquer du mucus, présentent des activités métaboliques similaires à celles décrites dans le tissu pulmonaire et peuvent être utilisées pour des expositions répétées et pour l'étude d'effets différés (BéruBé et al., 2009 ; Boubilil et al., 2013 ; Hawley et al., 2014 ; Möckel et al., 2022).

Des différences morphologiques ont aussi été observées. Les cellules Calu-3 cultivées 3 semaines à l'IAL forment un épithélium pseudo-stratifié dense et épais ressemblant à un épithélium bronchique humain, alors que ces mêmes cellules cultivées en conditions immergées s'organisent sous forme d'un épithélium cubique simple. La différenciation cellulaire à l'IAL a été observée par l'abondance des vésicules sécrétrices de mucus colorées au bleu Alcian (Lechanteur et al., 2018) et le développement de cils, ce qui n'est pas le cas en conditions immergées (Bhowmick & Gappa-Fahlenkamp, 2016).

Des comparaisons directes entre les cultures à l'IAL et en submergé ont été effectuées. Lenz et al. (2013) ont observé une augmentation de l'expression génique de marqueurs pro-inflammatoires à des doses plus faibles à l'IAL par rapport à la condition en submergé après exposition de cellules A549 à des nanoparticules d'oxyde de zinc (ZnO). Selon Wang et al. (2020), l'exposition des cellules A549, à des aérosols d'oxyde de titane (TiO_2) et de cérium (CeO_2) a généré des réponses biologiques (cytotoxique, inflammatoire et oxydante) différentes par rapport à des expositions en immergé à des suspensions. Ces effets étaient généralement

observés à des doses plus faibles lorsque les cellules étaient cultivées à l'IAL comparés à ceux obtenus en immersion (Loret et al., 2016). D'autres études ont toutefois abouti à des conclusions différentes. Friesen et al. (2022) ont observé des modifications d'expression génique plus importante en conditions immergées par rapport à l'IAL dans le cas des monocultures de A549 après exposition à des particules de quartz. A partir d'une co-culture de cellules A549 et THP-1, Wang et al. (2020) ont comparé les réponses obtenues en conditions immergées *versus* à l'IAL, après 24 h d'exposition à des PM_{2,5} atmosphériques. Les résultats ont montré une augmentation de la production d'ERO et de l'expression des marqueurs pro-inflammatoires (IL-1 β , IL-6, IL-8 et TNF α). Toutefois, ces marqueurs étaient plus modérés avec le modèle à l'IAL. Ces résultats suggèrent que les conditions de culture (IAL ou en immergé) ont une influence sur les réponses biologiques observées.

5.1.2.3. Co-culture

La culture à l'IAL a également permis le développement de modèles de co-culture combinant plusieurs modèles cellulaires, comme les cellules épithéliales, les macrophages, les cellules endothéliales ou encore les cellules dendritiques afin de mimer *in vitro* la complexité du tissu pulmonaire. Des cellules primaires ainsi que des lignées cellulaires peuvent être utilisées pour élaborer ces modèles (Hiemstra et al., 2018 ; Lacroix et al., 2018 ; Zavala et al., 2020).

Chortarea et al. (2015) ont utilisé un modèle composé de la lignée A549, de cellules dendritiques et de macrophages lors d'expositions répétées à des aérosols à base de nanotubes de carbone. Klein et al. (2013) ont à leur tour élaboré un modèle composé de quatre lignées cellulaires : AEC2 (cellules A549), macrophages (cellules THP-1), mastocytes (cellules HMC-1) et cellules endothéliales (cellules EA.hy 926) pour des expositions à des particules de SiO₂.

Loret et al. (2016) ont comparé les effets biologiques observés après expositions de monocultures et de co-cultures à des nanomatériaux (TiO₂ et CeO₂). Des réponses pro-inflammatoires significatives ont été mesurées uniquement après exposition des co-cultures (A549 et THP-1). Alfaro-Moreno et al. (2008) ont effectué la même démarche à partir de cultures de complexité croissante : monocultures, bicultures (A549 + HMC-1 ou THP-1 + HMC-1), tricultures (A549 + THP-1 + HMC-1) et quadri-cultures (A549 + THP-1 + HMC-1 + EAHY926), exposées à des PM₁₀ d'origine urbaine. Les différents marqueurs de la réponse inflammatoire (cytokines, G-CSF ou MIP-1b et MIP-1a) sont produits de façon plus importante dans les co-cultures comparées aux monocultures.

En conclusion, bien que ces modèles de co-cultures soient plus difficiles à mettre en place, ils permettent néanmoins d'aborder les interactions qui existent physiologiquement entre les différents types cellulaires présents qui contribuent à la réponse tissulaire pulmonaire globale.

5.1.2.4. Expositions répétées

Grâce aux avancées décrites précédemment, il est désormais possible de reproduire des scénarios d'expositions répétées *in vitro*, dans des conditions réalistes simulant l'exposition physiologique par inhalation de particules et intervenant généralement à faibles concentrations. Cette approche permet de mieux comprendre les effets cumulatifs des polluants de l'air intérieur sur la santé respiratoire, ainsi que leurs éventuelles conséquences à long terme.

Une étude réalisée sur les cellules 16HBE cultivées à l'IAL a permis de comparer les conséquences d'une exposition unique (24 h) et d'expositions répétées (4 jours consécutifs) à des particules de diesel (12,5 à 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Une augmentation significative de la production CXCL-8 a été observée uniquement après expositions répétées, accompagnée d'une diminution du TEER dès la plus faible concentration de DEP (Janbazacyabar et al., 2022).

Plusieurs études ont montré que les $\text{PM}_{2,5}$ provoquent de façon concentration-dépendante un stress oxydatif et une toxicité vis à vis de cellules épithéliales bronchiques, ainsi que des modifications de l'expression de gènes impliqués dans ce processus, mais aussi dans la réponse inflammatoire et la génotoxicité (Dergham et al., 2015; Ding et al., 2014; Zhou et al., 2015). Toutefois, ces études utilisent principalement de fortes concentrations de $\text{PM}_{2,5}$ (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ et 25 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) en exposition unique. Huang et al. (2021) ont comparé les réponses cellulaires de la lignée BEAS-2B entre une exposition unique de 24 h à 1 et 30 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de $\text{PM}_{2,5}$ atmosphériques et des expositions répétées (7 jours consécutifs) à une plus faible concentration (1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{j}$). Après exposition aigue, un changement significatif et concentration-dépendante des niveaux d'expression de gènes impliqués dans la sécrétion d'IL-6 et des voies de signalisation MAP Kinases, PI3K-Akt et P53 a été observé. Les expositions répétées à ces mêmes $\text{PM}_{2,5}$ a entraîné une majoration significative de l'hypo-méthylation sur l'ensemble du génome comparé aux cellules exposées 24 h à une dose unique. Les variations de concentrations et de durées de l'exposition peuvent donc induire des différences dans le profil transcriptomique et méthylomique de l'ADN des cellules épithéliales bronchiques.

Leclercq et al. (2018) ont montré qu'une exposition répétée (4 h / j, jours consécutifs) de cellules BEAS-2B, NHBE et COPD-DHBE à des $\text{PM}_{2,5}$ (2 à 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) diminue la production d'ATP et induit une réaction inflammatoire. De manière intéressante, d'autres chercheurs ont observé qu'à 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, les $\text{PM}_{2,5}$ (6 h/j, 3 jours consécutifs) engendraient un stress mitochondrial (diminution du potentiel de membrane et production de radicaux libres) mais sans altération de la concentration d'ATP intracellulaire (Sotty et al., 2019).

Inversement, l'exposition de cellules NHBE cultivées à l'IAL à des fumigènes de signalisation conduit à des réponses plus prononcées et plus prolongées après une exposition aiguë, comparée à 4 expositions répétées (De Lagarde et al., 2022). Ces réponses incluaient des réponses pro-oxydantes (augmentation de la production d'ERO, de l'expression d'enzymes anti-oxydantes et du taux de glutathion) et pro-inflammatoires (augmentation de l'expression de

l'IL-8) ainsi qu'une internalisation des particules et des changements morphologiques de l'épithélium. Après expositions répétées, seule une augmentation significative de l'expression de NQO-1 est observée, ainsi qu'un remodelage de l'épithélium, qui reste cependant similaire à celui observé après exposition aiguë. Ces mêmes auteurs justifient l'absence de stress oxydant par une augmentation de la clairance mucociliaire objectivée en microscopie par une hypersécrétion de mucus et un battement ciliaire plus rapide.

5.2. Toxicité *in vitro* des polluants particulaires de l'air intérieur

Plusieurs études ont été effectuées à partir de poussières domestiques issues de la combustion de biomasse et ont rapporté des effets pro-oxydants, une génotoxicité et une cytotoxicité *in vitro*. Muala et al. (2015) ont évalué la toxicité des PM₁ générées par la combustion incomplète de bois (cheminée) sur des macrophages (cellules RAW 264.7) après une exposition de 24 h. Ils ont ainsi observé une perte significative de la viabilité cellulaire et une augmentation des dommages à l'ADN, corrélées à la teneur en composés organiques des échantillons.

Marchetti et al. (2019) ont, sur des cellules A549, comparé les effets de PM₁₀ provenant de la combustion de différentes sources de biomasse : charbon de bois, bois ou granulés. Seules les PM₁₀ issues de granulés ont induit une diminution de la viabilité cellulaire. La forte teneur en HAP mesurée dans les particules de bois et de charbon de bois serait à l'origine de l'effet pro-oxydant observé et de l'apoptose, via l'induction de CYP 450. Des lésions de l'ADN et des perturbations du cycle cellulaire ont été observées avec les granulés, probablement en lien avec la teneur plus élevée en métaux de ces échantillons (Marchetti et al., 2019; Yang et al., 2016).

D'autres études menées sur des particules de combustion l'air intérieur ont montré une faible induction des marqueurs de l'inflammation (Kasurinen et al., 2017; Muala et al., 2015) après exposition de cellules macrophagiques, tandis que d'autres ont mis en évidence une augmentation de la réponse (sécrétion d'interleukines comme IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α ou GM-CSF) (Corsini et al., 2017). Des échantillons de poussières prélevés dans 6 écoles pendant les heures d'enseignement renferment des taux de PM₁₀ 6 fois plus élevés dans l'air intérieur comparé à l'air ambiant (Oeder et al., 2012). L'exposition de cellules BEAS-2B à ces PM₁₀ de l'air intérieur induit l'expression de gènes proinflammatoires (CXCL6, CXCL1, IL-6 et IL-8). Ces auteurs ont attribué ces réponses à la présence plus élevée d'endotoxines dans les PM₁₀ en milieu intérieur ($128,5 \pm 42,2$ EU/mg) qu'en milieu extérieur ($13,4 \pm 21,5$ EU/mg). En utilisant des NHBE différenciées à l'IAL, Zhang et al. (2020) ont observé une augmentation de la sécrétion de l'INF- γ , de l'IL-6, de l'IL-1, du TNF- α et du GM-CSF après 4 jours d'exposition à des PM₁₀ prélevées dans des maisons à Delhi. Sur ce même modèle cellulaire, Nordberg et al. (2020) n'ont pour leur part pas observé d'effet vis-à-vis de la production d'IL-8) après 24 h d'exposition à des PM collectés dans logements en Finlande.

Ces études illustrent la difficulté d'établir un consensus quant à la toxicité *in vitro* des particules de l'air intérieur. La nature, la taille, la composition des polluants, le mode d'exposition (en immergé ou à l'IAL), le modèle cellulaire (lignées ou cultures primaires) vont conditionner les réponses observées.

6. Objectifs et apports innovants du projet

Après avoir présenté les méthodes d'évaluation *in vitro* de la pneumotoxicité et passé en revue les principaux mécanismes de toxicité sous-jacents, nous allons détailler les spécificités de ce travail qui se distingue par la sélection de protocoles et de matériels (particulaires et cellulaires) qui permettent de s'approcher des conditions réelles d'exposition quotidienne des individus aux polluants particuliers dans les environnements intérieurs.

6.1. Matériel Standard de Référence (SRM® 2585)

Nous avons choisi de travailler à partir d'un échantillon de poussières domestiques sédimentées, représentatif de la pollution de l'air intérieur. Le Matériel Standard de Référence « Organic Contaminants in House Dust » (SRM® 2585) présente l'avantage d'être disponible commercialement donc en quantité suffisante pour réaliser le projet dans sa globalité. De plus, sa composition chimique est déjà largement documentée et actualisée (NIST, 2018), et rend bien compte de la problématique des mélanges complexes. Enfin, d'autres SRM ont déjà fait l'objet d'études toxicologiques sur des lignées cellulaires ou des cultures primaires d'origine pulmonaire, mais il s'agissait principalement de polluants atmosphériques d'origine urbaine (SRM® 1649) (Ekstrand-Hammarström et al., 2013), de particules fines (SRM® 2786) (Leclercq et al., 2016) ou encore de particules issues de moteurs diesel (SRM® 2975 et SRM® 1650b) (Bengalli et al., 2019; Deering-Rice et al., 2019). En revanche, seules deux études se sont intéressées à ce jour aux effets toxiques d'extraits organiques du SRM® 2585, dont une seule concerne les effets sur des modèles de cellules épithéliales pulmonaires (Marques dos Santos et al., 2022; Zhang et al., 2016). Notre travail permettra donc d'apporter de nouvelles données à celles disponibles dans la littérature et détaillées ci-après (cf. chapitre 6.1.1 et chapitre 6.1.3).

6.1.1. Définition

Le SRM® 2585 "Organic Contaminants in House Dust" est commercialisé par le National Institute of Standards and Technology (NIST) (Gaithersburg, USA). Ce matériau est

essentiellement utilisé pour calibrer les méthodes d'analyses instrumentales employées pour la caractérisation physico-chimique d'échantillons environnementaux. Il est issu de poussières récoltées entre 1993 et 1994 dans des lieux d'habitation (maisons, bureaux et hôtels) dans plusieurs états des États-Unis. Après avoir été tamisées, les particules le constituant ont globalement une taille inférieure à 100 μm . Elles présentent l'avantage d'intégrer des périodes de pollution plus ou moins longues et sont représentatives de la diversité de sources de polluants. De ce fait, elles peuvent être utilisées comme un substitut aux bioaérosols qui sont collectés sur des périodes brèves, donc en faible quantité, et dont la composition sera largement influencée par les conditions ambiantes. Ces poussières constituent également un réservoir de polluants aériens inhalables *via* une possible remise en suspension.

Dans le contexte du projet global « ToxIAlMix », nous avons préalablement séparé le SRM[®] 2585 en 2 fractions inhalables distinctes basées sur leur granulométrie : une fraction PM₁₀ et une fraction PM_{2,5}. Puis, chacune de ces fractions a été utilisée vis-à-vis d'un modèle cellulaire représentatif de l'étage susceptible d'être atteint dans le tractus respiratoire. Ainsi, les effets biologiques de la fraction PM_{2,5} ont été évalués sur un modèle de monocytes humains primaires différenciés en macrophages (MDM), représentatif de l'étage alvéolaire. Cette partie du travail a été réalisée à l'IRSET à Rennes (Inserm UMR S 1085), sous la direction du Pr Valérie Lecureur. La fraction PM₁₀ a été utilisée avec le modèle de NHBE différencié, représentatif de l'étage trachéo-bronchique. **Dans le cadre de la présente thèse, seule cette association PM₁₀/NHBE a été investiguée.** La dernière partie du travail concernant l'étude des interactions entre différents types cellulaires a toutefois fait appel aux surnageants « conditionnés » obtenus après expositions répétées des MDM à la fraction PM_{2,5}.

6.1.2. Composition chimique

Le NIST a identifié et quantifié au moins 167 molécules appartenant à 7 familles chimiques susceptibles de présenter des effets toxiques (Tableau 2) et couvrant différents mécanismes d'action (NIST, 2018 ; Poster et al., 2007). Pour chaque famille chimique, une valeur certifiée et une valeur de référence ont été établies. La valeur certifiée correspond à une valeur pour laquelle toutes les sources de biais connues ou suspectées ont été étudiées ou prises en compte, amenant le NIST à un haut niveau de confiance dans son exactitude. Les valeurs certifiées pour les HAP, les polychlorobiphényles (PCB) et les pesticides chlorés sont basées sur la concordance des résultats obtenus au NIST à partir d'au moins deux techniques d'analyse chimiquement indépendantes. Les valeurs certifiées pour les retardateurs de flamme polybromés (PBDE) sont basées sur la concordance des résultats obtenus au NIST à partir d'au moins deux techniques d'analyse chimiquement indépendantes et des résultats d'un laboratoire collaborateur. Les valeurs de référence sont des valeurs non certifiées qui constituent une meilleure estimation de

la valeur réelle ; toutefois, elles ne répondent pas aux critères de certification du NIST et sont associées à des incertitudes (NIST, 2018). Les HAP sont les composés prédominants dans le SRM® 2585. Soixante-six HAP sont présents dans cet échantillon et leurs concentrations varient de 14 µg/kg de poussières pour le dibenzo[a,k]-fluoroanthène à 4400 µg/kg de poussières pour le fluoranthène. Cette fourchette de concentrations est similaire à celle rapportée dans la littérature pour les poussières domestiques (NIST, 2018 ; Poster et al., 2007). Dans une étude portant sur 119 foyers du Massachusetts, des concentrations maximales de 15,7 ; 16,5 et 35,3 mg/kg de poussières ont été observées respectivement pour les PCB 52, 105 et 153 présents dans les poussières domestiques. Ces concentrations sont environ 1000 fois supérieures à celles des mêmes congénères de PCB présents dans le SRM® 2585 (Rudel et al., 2003). Le 4,4' dichlorodiphényldichloroéthylène (26 ± 2 µg/kg de poussières) et le trans-chlordane (277 ± 96 µg/kg de poussières) sont présents à des concentrations élevées, tandis que le gamma-hexachlorocyclohexane présente la plus faible concentration parmi les pesticides identifiés (Poster et al., 2007).

Tableau 2. Familles chimiques et nombre de substances constituant le SRM® 2585 en fonction du niveau de confiance des concentrations rapportées. D'après (NIST, 2018).

Familles de substances	Valeurs certifiées	Valeurs de référence	Total
Hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP)	33	33	66
Polychlorobiphényles (PCB)	30	12	42
Pesticides organochlorés	4	10	14
Retardateurs de flamme polybromés (PBDE)	15	3	18
Retardateurs de flamme phosphorés		5	5
Acides perfluoroalkyles (PFAA)		8	8
Muscs polycycliques		5	5

6.1.3. Toxicité du SRM 2585®

Ce matériau est essentiellement utilisé pour évaluer les techniques d'échantillonnage et qualifier les méthodes d'analyses instrumentales servant à la caractérisation physico-chimique d'échantillons environnementaux. Dans cette étude, le choix du SRM® 2585 permet de se focaliser sur la question de la QAI et de son impact toxicologique dans un contexte de mélanges complexes.

Une première étude a évalué la viabilité et l'intégrité de cellules hépatiques exposées à un extrait organique de ce SRM® 2585. Ces deux paramètres étaient peu modifiés après exposition à des concentrations considérées selon les auteurs comme « compatibles avec des conditions réelles ». Seuls des changements dans l'expression des gènes associés au métabolisme des xénobiotiques (CYP1A1, CYP1A2, CYP2B6) ont pu être identifiés (J. Zhang et al., 2016).

Une seule étude de toxicité pulmonaire, récente, a été réalisée à partir de ce matériau de référence. Marques dos Santos et al. (2022) ont examiné les effets d'une exposition courte (40 min) ou plus longue (24 h) de lignées cellulaires pulmonaires (16HBE14o-, NuLi-1, A549 et THP-1) et d'une lignée hépatique (HepG2) aux contaminants organiques (SRM® 2585) en utilisant des modèles en immergé et à l'IAL. Ils ont observé des dysfonctionnements mitochondriaux dose-dépendants (production d'ATP et respiration) après 40 min et 24 h d'exposition aux extraits de poussières, mais l'impact sur la viabilité n'a pas été rapporté. Les cellules hépatiques HepG2 étaient plus résistantes à ces perturbations. Une augmentation significative des ERO a été observée même à de faibles concentrations (0,06 µg/mL) après exposition des cellules NuLi-1 et 16HBE14o- extraits de poussières, la lignée NuLi-1 (cellules épithéliales bronchiques) semblant être plus sensibles. Une diminution significative du TEER a été mis en évidence dans ces 2 modèles à partir d'une concentration d'exposition de 0,26 mg/mL d'extraits de poussières. De plus, l'utilisation de modèles de culture en immergé a eu un impact sur le profil et l'intensité de la réponse inflammatoire observée. L'expression de l'IL-6, l'IL-8 et le GM-CSF est favorisée en particulier pour les cellules 16HBE14o- dans le modèle à l'IAL. En revanche, la protéine 10 (IP-10), induite par l'INF gamma, n'a été exprimée de manière significative que dans les cultures immergées. Les différences de niveaux d'expression des cytokines entre les modèles 16HBE14o- et NuLi-1 cultivés en ALI, en particulier pour l'IL-6 et le TNF α , pourraient être liées à la plus faible capacité des cellules NuLi-1 à former une barrière épithéliale avec des jonctions serrées. Ce qui se reflète également dans les valeurs de TEER plus faibles observées dans cette étude.

6.2. Choix du modèle cellulaire, du mode d'exposition et des concentrations

L'application de conditions expérimentales d'exposition les plus proches possible de celles rencontrées physiologiquement constitue un objectif majeur du travail. L'utilisation de cellules normales isolées de prélèvements pulmonaires humains constitue donc un choix plus pertinent que les lignées cellulaires (Hiemstra et al., 2018). Le modèle NHBE différencié à l'IAL a été retenu car il permet de reconstituer un pseudo-épithélium associant des cellules basales, des cellules ciliées et de cellules à mucus fonctionnelles. Son activité biologique est également représentative de celle d'un épithélium trachéo-bronchique humain. Le mode de culture à l'IAL permet d'autre part de conserver le pseudo-épithélium sur des durées prolongées et offre la possibilité de réaliser des expositions répétées et cumulées : dans notre cas il s'agit d'expositions répétées aux poussières nébulisées pendant 4 jours consécutifs. Nous avons aussi intégré une étude cinétique de la réponse cellulaire allant jusqu'à sept jours post-exposition afin de caractériser les effets précoces ou différés ainsi que les effets pérennes ou transitoires. Nous avons pour cela sélectionné un ensemble de biomarqueurs permettant d'analyser différents mécanismes de toxicité : viabilité, intégrité du tapis cellulaire, production d'ERO, induction

d'effets pro-inflammatoires, production de mucus, efficacité du battement ciliaire et génotoxicité.

Par ailleurs, le système d'exposition Cloud MAX (Vitrocell®) retenu permet d'assurer la dispersion homogène des particules étudiées sur le tapis cellulaire sans l'immerger (cf. chapitre 2). L'utilisation d'une microbalance associée à ce dispositif a également permis de contrôler la dosimétrie réelle des dépôts.

Le choix des doses d'expositions se base sur les modélisations des quantités de particules déposées aux différents niveaux de l'arbre respiratoire, en milieu intérieur. Cette déposition est majoritairement dépendante des types d'activités menées dans les locaux, influençant la nature, la concentration et la taille des particules émises, des caractéristiques du bâtiment (surface, ventilation, etc.) et également du sujet exposé lui-même. Les valeurs rapportées se répartissent entre 51 $\mu\text{g}/\text{j}$ pour des particules fines et ultrafines (Hussein et al., 2015) à 482 $\mu\text{g}/8\text{h}$ pour des particules de diamètre compris entre 0,3 et 10 μm (Maragkidou et al., 2018). La surface de l'épithélium trachéo-bronchique étant de l'ordre de 300 cm^2 , les concentrations surfaciques sont donc comprises entre 0,1 et 1,7 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Nous avons donc choisi une **dose cible d'exposition de 1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$** , et nous avons associé deux autres concentrations de part et d'autre (0,1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ et 6 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) afin de tenter de mettre en évidence des relations dose-effet. La concentration haute est de valeur plus fluctuante pour des raisons inhérentes aux nébuliseurs utilisés sur le système Cloud MAX.

Dans un dernier temps, nous avons également abordé la question des interactions entre différents types cellulaires en utilisant un protocole de co-exposition. La mise en œuvre de système de co-cultures primaires est délicate en raison des différences inter-donneurs et de l'utilisation de milieux de culture de composition différente. Un modèle alternatif de co-exposition a été élaboré afin d'étudier l'interaction entre les cellules NHBE et les macrophages. Ce modèle est détaillé dans la partie « Matériels et Méthodes » (cf. chapitre 4). Brièvement, les cellules NHBE différenciées ont été exposées d'une part aux PM_{10} (en apical) durant 4 jours consécutifs et, durant les 2 derniers jours, simultanément (en basal des inserts) à des milieux conditionnés issus des MDM exposés à la fraction fine ($\text{PM}_{2,5}$) des poussières domestiques étudiées. Cette dernière partie du travail est principalement centrée sur l'évaluation de la réponse inflammatoire et la production de mucus.

Matériels et Méthodes

1. Caractérisation des propriétés intrinsèques des poussières en conditions acellulaires

La première partie de ce travail s'est focalisée d'abord sur la caractérisation des propriétés physico-chimiques intrinsèques du SRM® 2585 total et de ses deux sous-fractions inhalables PM₁₀ et PM_{2,5} obtenues après séparation granulométrique. A l'aide de méthodes acellulaires nous avons dosé les endotoxines adsorbées, puis évalué le potentiel oxydant et la production d'ERO. Nous avons ensuite évalué la toxicité aiguë de ces particules (cytotoxicité et réponse inflammatoire) par une approche *in vitro* en conditions immergées utilisant le modèle de cellules NHBE non différenciées. L'effet mutagène des particules a été estimé également par le test d'Ames.

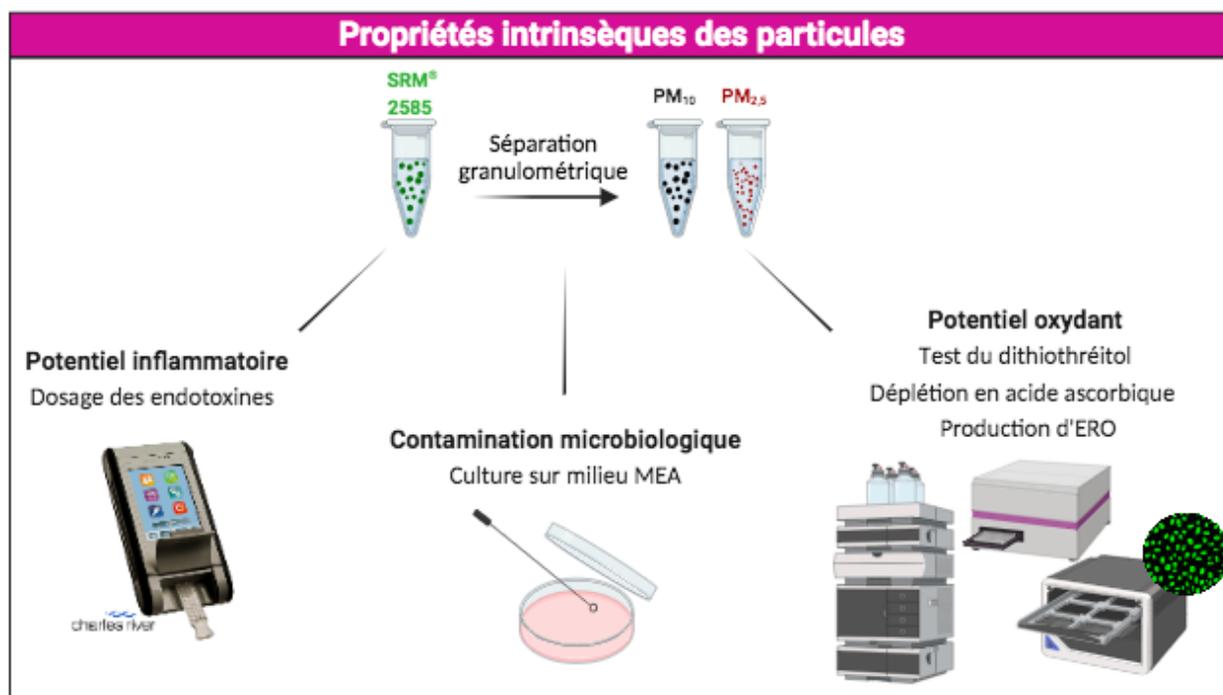


Figure 8. Propriétés intrinsèques du SRM® 2585 total et de ses deux sous-fractions inhalables PM₁₀ et PM_{2,5}.

Les effets intrinsèques des particules ainsi que les réponses biologiques induites ont été évalués à l'aide de différents tests résumés dans la Figure 8 et la Figure 9. Les matériels et méthodes déployés figurent dans le premier article publié dans le cadre de ce projet de thèse (El Hajjar et al., 2022) qui est en Annexe 1.

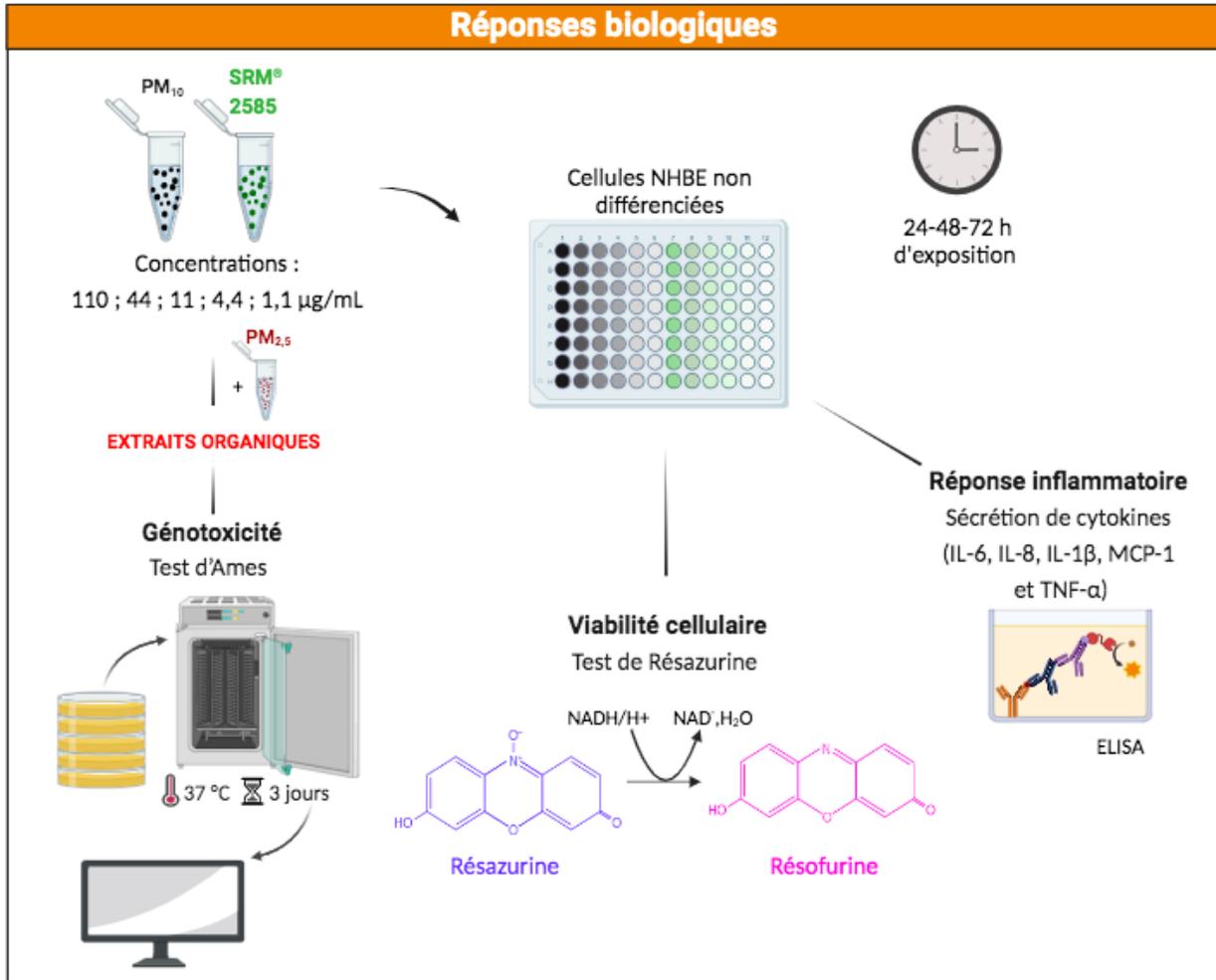


Figure 9. Réponses biologiques analysées après exposition en immergé des cellules NHBE non différenciées aux particules (SRM[®] 2585, PM₁₀ et PM_{2,5}).

2. Système VITROCELL[®] Cloud MAX

2.1. Dispositif

Parmi les différents dispositifs d'exposition présent sur le marché, notre choix s'est porté sur le système Vitrocell[®] Cloud MAX qui est conçu pour de faibles volumes de nébulisation (de 10 à 40 µL) et une efficacité de dépôt élevée (de 25 à 50 %) par rapport aux autres systèmes d'exposition à l'IAL.

Il est constitué d'une partie amovible composée de trois chambres d'exposition cylindriques coiffées chacune d'un nébuliseur à maille vibrante de type Aeroneb 10 µm (Aerogen, Ireland) et d'un socle fixe thermostaté renfermant cinq puits permettant de recevoir un insert chacun (avec des adaptateurs selon la taille des inserts). Une microbalance à cristal de quartz

(QCM) est intégrée sur la dernière position du socle, permettant d'évaluer la masse de particules réellement déposée (Figure 10). La membrane des nébuliseurs renferme plus de 1000 pores de diamètre $\sim 10 \mu\text{m}$, au travers desquels un faible volume d'une solution aqueuse ionisée ou d'une suspension de particules peut les traverser, assurant la génération d'un aérosol qui va se déposer par sédimentation sur le tapis cellulaire. Ce système permet de garantir une distribution spatiale uniforme de l'aérosol.

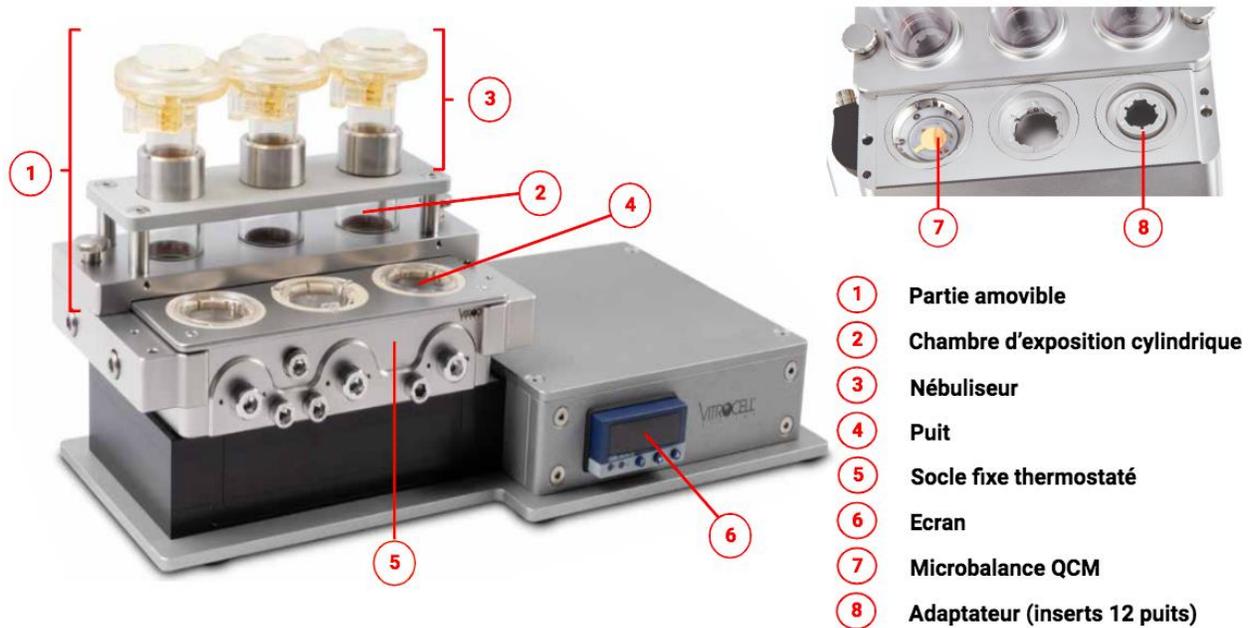


Figure 10. Présentation du système Vitrocell® Cloud MAX.

Le jeu de trois nébuliseurs a permis de tester simultanément différentes conditions. Dans notre cas, il s'agissait de tester une solution saline de PBS 1/80 (qui correspond à du PBS dilué au 1/80^{ème} dans de l'eau ultra pure supplémenté en antibiotiques (100 unités/ml de pénicilline et 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de streptomycine) et en antifongique (0,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ d'amphotéricine B)) et de la suspension de PM_{10} préparée dans du PBS 1/80 à différentes concentrations (0,1 ; 1 et 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$). La température du système maintenue à 37 °C durant toute les phases d'exposition des cellules.

2.2. Mesures préalables des masses de particules déposées

La QCM est utilisée en amont des expositions cellulaires afin de déterminer la masse de poussières effectivement déposées sur le cristal de quartz utilisé comme substitut du tapis cellulaire. Lorsque les aérosols sédimentent sur la surface de la microbalance, un changement de fréquence de vibration du cristal de quartz est détecté et le signal électrique généré est suivi en

temps réel à l'aide du logiciel « Vitrocell® Monitor ». Le principe de mesure se base sur celui du « diapason » dont la fréquence propre diminue avec l'augmentation de sa masse.

Les suspensions de particules à tester doivent être préparées dans une solution saline de PBS dilué pour un fonctionnement optimal du dispositif. Trente microlitres ont été nébulisés et la déposition a été suivie en temps réel sur un enregistrement type présenté ci-dessous (Figure 11).



Figure 11. Signal QCM typique observé après nébulisation de 30 µL d'une suspension de particules sur la microbalance du système Vitrocell® Cloud MAX (logiciel Vitrocell® Monitor).

Phase 1 : dépôt de l'aérosols (chambre d'exposition fermée) ;

Phase 2 : stabilisation de la QCM (3 min, chambre d'exposition fermée) ;

Phase 3 : séchage de l'échantillon (environ 10 min, chambre d'exposition ouverte) ;

Phase 4 : séchage complet indiquant la masse surfacique de particules déposées.

On peut distinguer 4 phases à l'issue de la nébulisation :

- La phase 1 correspond au dépôt de l'aérosols après nébulisation, la chambre d'exposition étant maintenue fermée ;
- La phase 2 correspond à la stabilisation de la QCM indiquant que tout l'aérosol est déposé (3 min) ;
- Dans la phase 3, la chambre cylindrique est ouverte afin de permettre le séchage de l'échantillon (10 min environ) ;
- Enfin, la phase 4 montre une stabilisation d'un signal correspondant à un séchage complet de l'aérosol. Seules les particules restent à la surface du quartz et leur masse est exprimée en µg/cm².

Après chaque mesure, la surface du quartz a été délicatement essuyée puis séchée afin d'éliminer entièrement les résidus et initier une nouvelle mesure. Six mesures indépendantes ont été réalisées pour chaque suspension de particules.

2.3. Efficacité du dépôt

La cohérence entre les doses déposées sur la QCM et celles délivrées sur les inserts doit être démontrée. Pour cette raison, le test à la fluorescéine a été effectué parallèlement sur la microbalance et sur les inserts, pour chaque nébuliseur mis en service.

Tout d'abord, 20 μL ($V_{\text{fluo.néb}}$) de fluorescéine (Ref. 410620010, Thermo Scientific Chemicals) à 15 $\mu\text{g/mL}$ dans du PBS 1X ($C_{\text{fluo.néb.}}$) ont été nébulisés dans une chambre d'une surface de 4,71 cm^2 (S_{chambre}) puis sédimentés à la surface de la microbalance ($S_{\text{QCM}} = 3,8 \text{ cm}^2$). Après séchage total (stabilisation du signal enregistré), la fluorescéine a été récupérée par solubilisation dans 4 mL de PBS 1X (V_{QCM}). La fluorescence de cette solution a été mesurée dans des plaques 96 puits ($\lambda_{\text{excitation}} = 485 \text{ nm}$ et $\lambda_{\text{émission}} = 520 \text{ nm}$; lecteur de microplaque Synergy H1 (BioTek Instruments, Inc.). La concentration de fluorescéine dans l'échantillon a été calculée à l'aide d'une gamme étalon (1,5 $\mu\text{g/mL}$ à 0,0234 $\mu\text{g/mL}$ dans PBS 1X). La même procédure a été suivie pour mesurer la fluorescéine déposée à la surface des inserts ($S_{\text{insert}} = 0,336 \text{ cm}^2$) placés dans le socle du Vitrocell® Cloud MAX. La récupération s'est effectuée dans 0,15 mL de PBS 1X (V_{insert}) ajouté en apical des inserts. Ce protocole a été répété 3 fois pour chaque nébuliseur et chaque type de support (QCM ou insert) lors de 2 expériences indépendantes.

Pour chaque nébuliseur, les efficacités de dépôt ($F_{\text{dépôt.QCM}}$ et $F_{\text{dépôt.insert}}$) sur chacun des supports choisis (microbalance et insert) ont été déterminées à partir de la concentration théorique déposée et celle réellement déposée (concentration mesurée) d'après les équations suivantes :

$$C_{\text{fluo.théorique.QCM}} (\mu\text{g/mL}) = \frac{C_{\text{fluo.néb}} (\mu\text{g/mL}) \times V_{\text{fluo.néb}} (\text{mL}) \times S_{\text{QCM}} (\text{cm}^2)}{V_{\text{QCM}} (\text{mL}) \times S_{\text{chambre}} (\text{cm}^2)} \quad (1)$$

$$F_{\text{dépôt.QCM}} (\mu\text{g/mL}) = 100 \times \frac{C_{\text{fluo.mesurée.QCM}} (\mu\text{g/mL})}{C_{\text{fluo.théorique.QCM}} (\mu\text{g/mL})} \quad (2)$$

$$C_{\text{fluo.théorique.insert}} (\mu\text{g/mL}) = \frac{C_{\text{fluo.néb}} (\mu\text{g/mL}) \times V_{\text{fluo.néb}} (\text{mL}) \times S_{\text{insert}} (\text{cm}^2)}{V_{\text{insert}} (\text{mL}) \times S_{\text{chambre}} (\text{cm}^2)} \quad (3)$$

$$F_{\text{dépôt.insert}} (\mu\text{g/mL}) = 100 \times \frac{C_{\text{fluo.mesurée.insert}} (\mu\text{g/mL})}{C_{\text{fluo.théorique.insert}} (\mu\text{g/mL})} \quad (4)$$

Les équations (1) et (2) ont été utilisées pour les analyses effectuées sur la microbalance, alors que les équations (3) et (4) pour les analyses sur insert. Des valeurs comprises entre 26 et 51 % ont été calculées et résumées dans l'Annexe 2. Ces valeurs sont conformes à ce qui est annoncé par le fabricant (entre 25 et 50 % d'efficacité de dépôt).

2.4. Préparation et calibration des échantillons de poussières

La concentration de la suspension mère de PM₁₀ a été calculée à partir de l'efficacité du dépôt du système, estimée en moyenne à 40 % ($F_{dépôt}$). Elle correspond à la plus forte dose d'exposition, soit une dose déposée attendue de 10 µg/cm². Elle a été préparée à 4 mg/mL (dans du PBS 1/80 additionné de Tween 20 à 0,04 % pour faciliter la dispersion des particules avec un mélange d'antibiotiques à base de Pénicilline à 10 000 U/mL et Streptomycine à 10 000 µg/mL associé à un antifongique, la Fungizone™ à 25 µg/mL (Réf. 15240062, Gibco™, Fisher Scientific, France)) selon l'équation ci-dessous :

$$C_{néb.} (\mu\text{g/mL}) = \frac{Dépôt_{théorique} (\mu\text{g/cm}^2) \times S_{chambre} (\text{cm}^2)}{V_{néb.} (\text{mL}) \times F_{dépôt} (\%)}$$

Cette suspension a été soniquée pendant 35 min avant nébulisation de 30 µL. Trois à 6 analyses ont été réalisées sur la QCM. La valeur moyenne obtenue se situait aux alentours de 6 µg/cm², en deçà de celle visée. Nous n'avons cependant pas voulu augmenter la concentration de la suspension mère afin de limiter les risques de colmatage du nébuliseur. Nous n'avons pas non plus multiplié les nébulisations pour ne pas induire de stress supplémentaire du tapis cellulaire. Nous avons donc par la suite gardé pour la concentration la plus élevée, la valeur moyenne réellement déposée de 6 µg/cm².

A partir de cette suspension mère, deux autres suspensions ont été préparées en ajustant le facteur de dilution afin d'obtenir des dépôts moyennes de 1 et de 0,1 µg/cm² respectivement. Ces nouvelles suspensions ont également été soniquées pendant 35 min puis testées de façon répétée sur la microbalance (3 à 6 nébulisations/condition). Ensuite, les 3 suspensions particulières ont été aliquotées et congelées à -20°C.

Ce travail de calibration des échantillons doit être effectuée pour toute nouvelle préparation de suspension particulière et/ou chaque fois qu'un nouveau nébuliseur est mis en service. Par la suite, pour chaque série d'exposition, un aliquot de chaque dose a été décongelé, soniqué 35 min avant d'être nébulisé à la surface du tapis cellulaire.

Afin d'éviter le colmatage rapide des nébuliseurs, ces derniers ont été rincés toutes les 2 à 4 nébulisations de particules avec de l'éthanol pure (3 x 1 mL) suivi d'un rinçage par nébulisation d'eau ultra pure (3 x 1 mL) selon les recommandations du fournisseur.

Après chaque rinçage, un contrôle de qualité a été effectué en mesurant le temps nécessaire à la nébulisation de 200 µL de PBS 1/80 et en le comparant à la valeur initiale obtenue lors de sa mise en service. Si l'écart est supérieur à 10 % le nébuliseur a été remplacé. Ces valeurs ont été compilées afin d'avoir une traçabilité (Annexe 3). Les résultats obtenus pour les différentes suspensions de PM₁₀ préparées et les différents nébuliseurs ont été résumés dans l'Annexe 4.

3. Effets biologiques et moléculaires de l'exposition des NHBE différenciées aux PM₁₀

3.1. Modèle cellulaire : cellules NHBE

Les cellules NHBE ont été isolées d'un individu mâle latino-hispanique de 14 ans, sain et non-fumeur. Ces cellules sont commercialisées par l'ATCC® (Réf. PCS-300-010™, lot 70002486, LGC Standards). A la réception, les cellules ont été cultivées dans du milieu de prolifération (sans sérum) reconstitué à partir de l'« Airway Epithelial Cell Basal Medium » (ATCC® PCS-300-080, LGC Standards, Molsheim, France) complété du kit « Bronchial/tracheal Epithelial Cell Growth Kit » (ATCC® PCS-300-040, LGC Standards) et supplémenté avec 0,1 % d'un mélange d'antibiotiques à base de Pénicilline à 10 000 U/mL et Streptomycine à 10 000 µg/mL associé à un antifongique, la Fungizone™ à 25 µg/mL (Réf. 15240062, Gibco™, Fisher Scientific). Lorsque le tapis a atteint 80 % de confluence, les cellules ont été trypsinées et aliquotées à raison de 10⁶ cellules/1 mL dans du milieu de culture additionné de 10% de diméthylsulfoxyde (DMSO, Réf. 102385184, Sigma-Aldrich) et cryoconservées au passage 3 (P3) dans des vapeurs d'azote liquide. Un aliquot a été ensuite décongelé pour chaque série d'exposition.

3.1.1. Protocole de mise en prolifération : Culture en immergée

Un aliquot de NHBE (P3) a été décongelé dans le creux de la main et les cellules ont été transférées dans un flacon de culture de 75cm² (Réf. Falcon® 353136) puis placées dans des conditions de culture classique dans une étuve thermostatée à 37 °C en atmosphère humide (95 %) et 5 % de CO₂. Lorsque les cellules ont adhéré au support, le milieu de culture a été remplacé par un milieu frais afin d'éliminer le DMSO et les cellules mortes ou non adhérentes. A 80 % de confluence (soit 3 à 4 jours), les cellules ont été décollées par l'action du TryPLE™ (Réf. 12563011, Gibco™), dénombrées (compteur automatique Fascope™ B ; Curiosis Inc.) et réensemencées sur les différents supports à la densité désirée.

Pour les expositions réalisées en immergée sur cellules non différenciées, les NHBE ont été ensemencées en plaques 96 puits (Réf. Falcon® 353072,) à différentes concentrations selon le

temps de traitement : 12000 cellules/puit pour 24 h d'exposition ; 10000 cellules/puit pour 48 h d'exposition et 7500 cellules/puit pour 72 h d'exposition. Préalablement, les puits ont été coatés par une solution de collagène (Réf. 354236, Corning®) à 30 µg/mL dans de l'acide acétique à 0,02 M (Réf. 11374717, Thermo Fisher Scientific) (150 µL/puit) pendant 30 minutes à 37 °C. Les expositions sont réalisées 24 h après l'ensemencement.

Pour les expositions réalisées à l'IAL, les étapes permettant d'obtenir les cultures différenciées sont décrites dans le chapitre suivant.

3.1.2. Protocole de différenciation cellulaire à l'IAL sur inserts

Les inserts (Transwell® 6,5 mm ; pores 0,4 µm ; Costar® 3470) ont été coatés par 150µL/insert de la solution de collagène (30 µg/mL dans l'acide acétique 0,02 M) durant 30 minutes à 37 °C. Les cellules NHBE non différenciées ont été ensuite ensemencées en apical des inserts (placés dans des plaques 24 puits) à une densité de 30 000 cellules/150 µL de milieu de prolifération/insert. Soixante à 72 inserts pouvaient être préparés à partir d'un aliquot décongelé. Le milieu de prolifération a été également aussi rajouté en basal des inserts (550 µL/puit) pendant 3 jours jusqu'à obtenir une culture confluente.

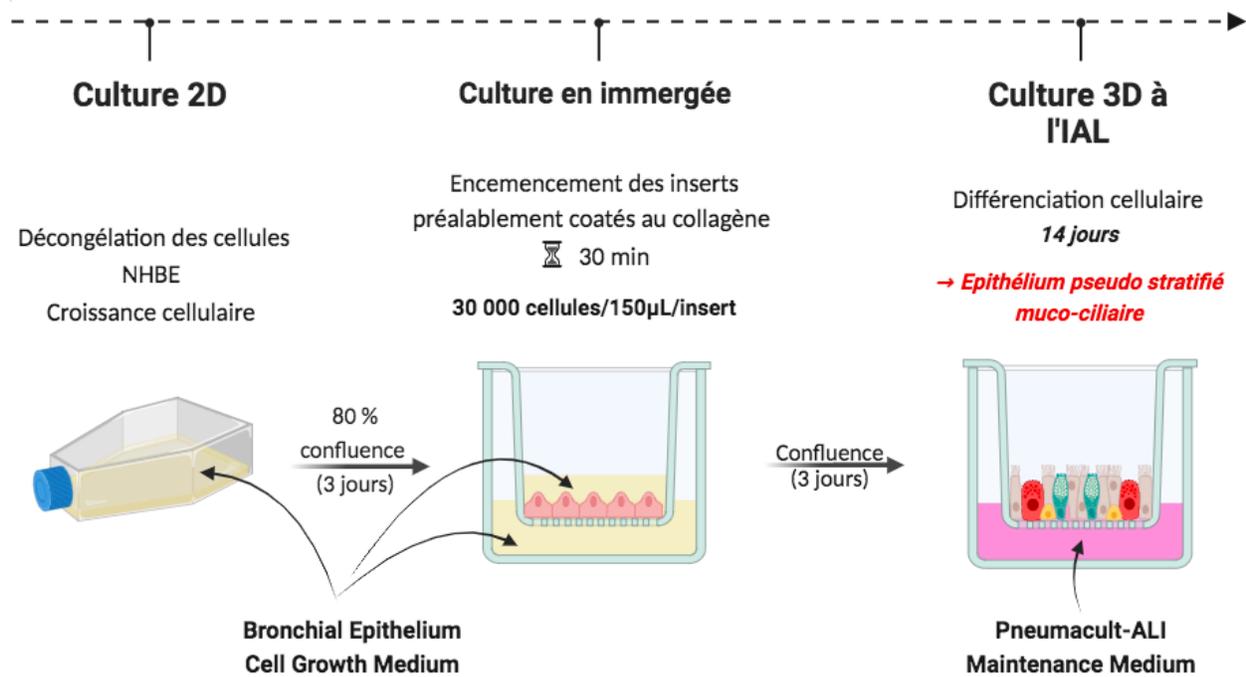


Figure 12. Protocole de mise en culture et de différenciation des cellules NHBE pour les expositions à l'IAL.

Le passage à l'IAL est essentiel pour assurer le processus de différenciation cellulaire. Pour cela, le milieu de prolifération en apical des inserts a été totalement retiré et le milieu en basal a

été remplacé par un milieu de différenciation « PneumaCult-ALI complet » reconstitué à partir de « PneumaCult-ALI base medium » (Réf. 05002, StemCell™ Technologies) supplémenté par du « PneumaCult-ALI 10X supp. » (Réf. 05003, StemCell™ Technologies), du « PneumaCult-ALI Maintenance supp. 100X » (Réf. 05006, StemCell™ Technologies) et de l'hydrocortisone (Réf. 07925, StemCell™ Technologies). Ce milieu est stable uniquement pendant 2 semaines à 4 °C. Le milieu en basal des inserts a été changé tous les 2 jours pendant 14 jours pour obtenir la différenciation (Figure 12).

3.1.3. Protocoles d'exposition des cellules

3.1.3.1. Exposition des NHBE non différenciés en immergé

Les NHBE non différenciés ont été exposés en immergé à des suspensions de SRM® 2585 et de PM₁₀ à différentes concentrations pendant 24 h, 48 h ou 72 h. Les solutions mères (1 mg/mL pour le SRM® 2585 et 4 mg/mL pour la fraction PM₁₀) ont été soniquées pendant 30 minutes, puis diluées dans le milieu de prolifération afin d'atteindre les concentrations d'exposition souhaitées : 440 ; 110 ; 44 ; 11 ; 4,4 et 1,1 µg/mL.

3.1.3.2. Exposition des NHBE différenciés sur inserts aux PM₁₀

Le protocole d'exposition a été basé sur 4 séquences cumulées sur 4 jours consécutifs. Il est décrit dans la Figure 13. Avant la première exposition (J0), le mucus produit à la surface du pseudo-épithélium a été retiré afin de rendre le tapis cellulaire plus accessible aux particules.

La nébulisation de 30µL des suspensions de PM₁₀ (ou de PBS 1/80 pour les conditions « Témoin PBS ») a ensuite été réalisée durant 4 jours consécutifs (J0 à J3, Figure 13), à l'aide du Vitrocell® Cloud MAX. Les dépôts correspondent à des concentrations de 0,1 ; 1 et 6 µg/cm²/j, soit des doses cumulées de 0,4 ; 4 et 24 µg/cm² respectivement.

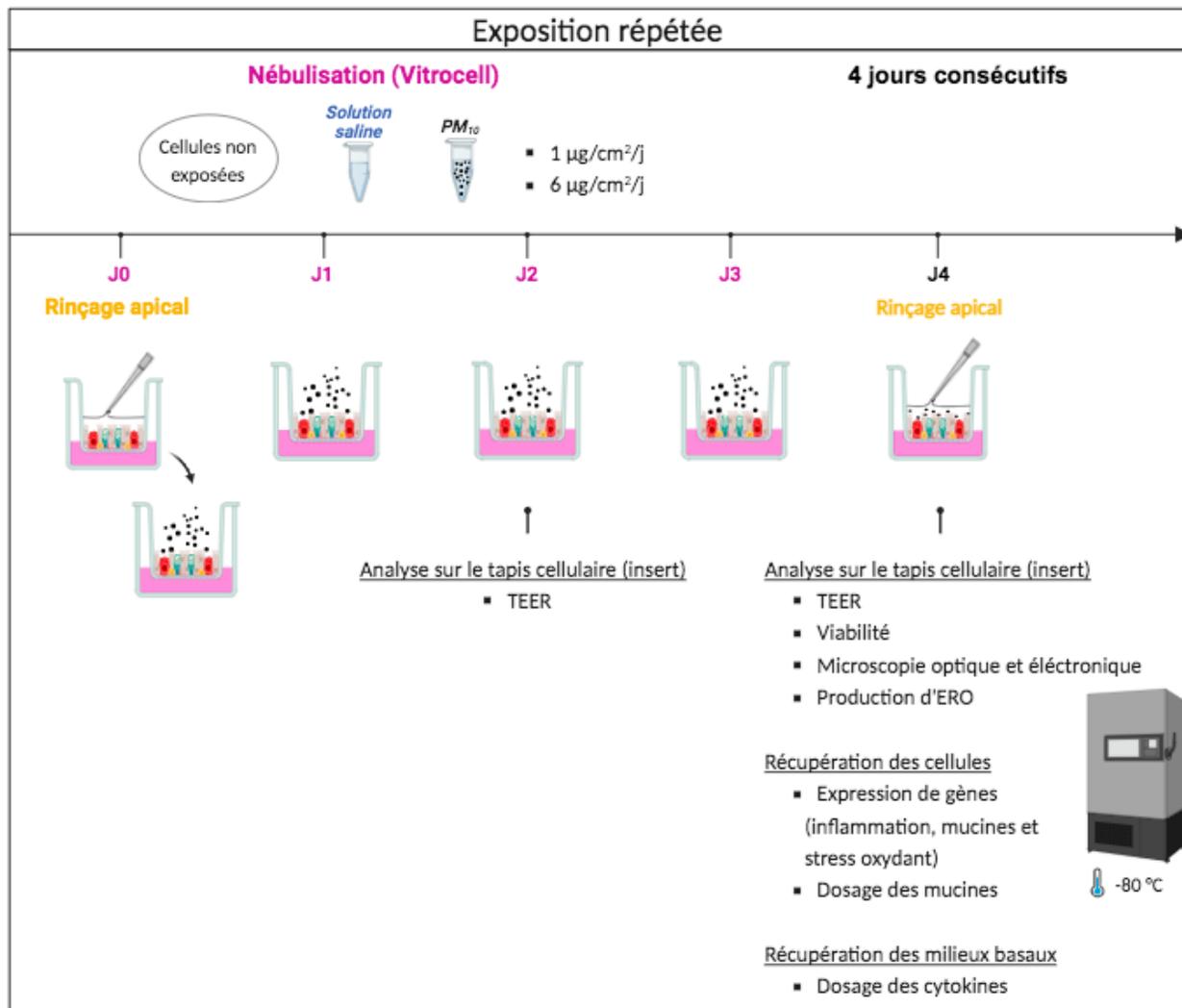


Figure 13. Protocole d'exposition répétée des cellules NHBE différenciées aux PM₁₀ à l'IAL.

Afin d'évaluer les éventuels effets transitoires ou tardifs, des inserts ont été gardés jusqu'à 7 jours post-exposition (Figure 14). Pour ces inserts, le mucus sécrété a été retiré de nouveau par des lavages apicaux réalisée à l'aide du milieu « Airway Epithelial Cell Medium complet » à J4 et J8. Les milieux en basal ont été collectés à J4, J8 et J11 puis stockés à -80 °C pour des analyses ultérieures. Les tapis cellulaires ont été ensuite utilisés pour effectuer les analyses décrites ci-après à J4, J8 ou J11.

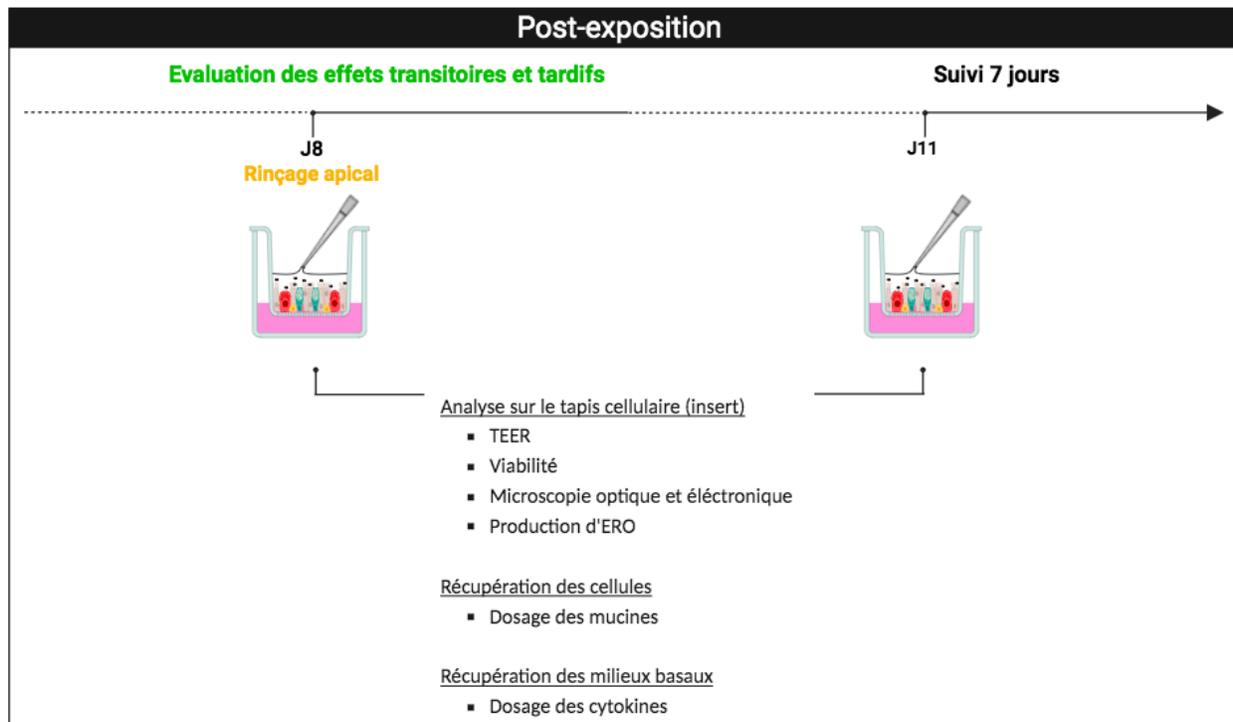


Figure 14. Suivi cinétique des paramètres étudiés (J8 et J11) après exposition des cellules NHBE différenciées aux PM_{10} .

3.2. Microscopie

3.2.1. Coloration des différents types cellulaires

Les pseudo-épithéliums ont été fixés par ajout de paraformaldéhyde 3 % (PFA) (200 et 500 μ L en apical et basal des inserts respectivement) puis conservées à 4 °C. La préparation et les colorations ont été réalisées par le département d'anatomopathologie du Centre François Baclesse. Les membranes ont été découpées, incluses en paraffine, avant de réaliser des coupes de 5 à 10 microns d'épaisseur à l'aide d'un microtome. Les colorations ont été réalisées à J4, J8 et J11. Des colorations à l'Hématoxyline-Eosine (H&E) couplées au bleu alcian ont été effectuées sur un automate (Leica ST 5020 couplé à la monteuse de lamelles Leica CV 5030 (BioSystems, États-Unis)).

3.2.2. Microscopie Électronique

Les analyses ont été effectuées par le Centre de Microscopie Appliquée à la Biologie CMABio3 (EMerode, UNICAEN, France).

Les cellules ont été fixées dans du glutaraldéhyde à 2,5 % préparé dans du tampon cacodylate de sodium 0,1 M à pH 7,2 puis rincées dans le même tampon (200 µL et 500 µL respectivement en apical et basal des inserts).

Pour les échantillons destinés à être observés en MET, les cellules ont ensuite été fixées une deuxième fois par 1 % de tétroxyde d'osmium préparé dans le tampon cacodylate de sodium pendant 1 heure avant d'être rincées une nouvelle fois. Puis, les échantillons ont été déshydratés par un gradient croissant d'éthanol de 30 à 100 % et inclus en résine Embed 812. Des coupes ultrafines de 100 nm d'épaisseur ont été obtenues à l'aide de l'ultramicrotome Leica Ultracut R (Leica Microsystems, Allemagne) puis ces coupes ont été colorées à l'acétate d'uranyle et au citrate de plomb. Les observations ont été réalisées à 80 kV à l'aide du microscope électronique à transmission JEOL 1011 (JEOL, Japon) équipé d'une caméra Orius 200 (GATAN, États-Unis) et d'une micrographie digitale (GATAN, États-Unis). Les analyses ont été effectuées à J4, J8 et J11.

Pour les échantillons destinés à être observés en MEB, les cellules ont été déshydratées par un gradient croissant d'éthanol de 30 à 100 % puis séchées dans des chambres de séchage (Leica EM CPD030, Leica Microsystems, Allemagne). Elles ont ensuite été enrobées par des revêtements métalliques à l'aide du dispositif JFC 1300 (JEOL, États-Unis). Les observations ont été réalisées à l'aide du microscope électronique à balayage MEB Supra 55 (ZEISS, Allemagne).

3.3. Paramètres biologiques analysés

A partir des inserts obtenus pour chaque séquence d'exposition, plusieurs paramètres ont été analysés, soit à partir du tapis cellulaire, soit à partir des milieux récupérés en basal des inserts. Pour chaque paramètre, au moins 6 conditions ont été comparées : « Témoin IAL » (cellules non exposées), « Témoin PBS » (nébulisation de 30 µL de PBS 1/80 sur les cellules), témoin positif (induisant une variation significative du paramètre mesuré) ; PM₁₀ à 0,1 µg/cm²/j ; PM₁₀ à 1 µg/cm²/j et PM₁₀ à 6 µg/cm²/j.

3.3.1. Mesure du TEER

Les analyses ont été effectuées à l'aide du volt-ohmmètre EVOM3 (World Precision Instruments) muni d'une électrode de type STX2-PLUS adapté pour la mesure du TEER à partir de plaques à 24 puits.

L'électrode STX2-PLUS est composée d'une double paire d'électrodes Ag/AgCl de longueurs inégales, permettant à l'électrode la plus longue (externe) de toucher le fond du puit contenant 700 µL de milieu de culture de prolifération et en empêchant l'électrode la plus courte (interne) d'atteindre la membrane de l'insert de culture rempli par 250 µL de milieu de culture de prolifération. Cela permet de garantir le bon emplacement de l'électrode, ce qui est

indispensable pour effectuer des mesures précises et reproductibles. Lorsqu'un voltage (U) est appliqué aux deux électrodes, l'intensité (I) du courant mesuré est converti en résistance (R) selon la loi d'Ohm ($R=U/I$). L'enregistrement de la résistance est réalisé lorsque la lecture devient stable. La valeur du « blanc » (R_{Blanc} , correspondant à un insert sans cellules soumis aux mêmes conditions de mesure), doit être soustraite de la valeur de la résistance mesurée ($R_{\text{mesurée}}$) pour chaque insert. Pour chaque mesure, la valeur de TEER a été calculée en fonction de la surface de culture (S) selon la formule suivante :

$$\text{TEER } (\Omega.\text{cm}^2) = (R_{\text{mesurée}} - R_{\text{blanc}}) \times S$$

Des cellules exposées pendant 30 min à une solution de Triton à 1% (100 µL en apical), servent de témoin positif. Les mesures du TEER ont été réalisées à J0 avant exposition, durant l'exposition à J2 et J4 et post-exposition à J8 et J11 pour évaluer l'intégrité du pseudo-épithélium.

3.3.2. Activité métabolique : test au Bleu Alamar

La solution PrestoBlue™ (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific) contient de la résazurine de couleur bleue qui est convertie enzymatiquement par la NADH déshydrogénase en résorufine de couleur rose fluorescente par les cellules vivantes. La fluorescence obtenue est proportionnelle à l'activité métabolique de la cellule et assimilée à la viabilité cellulaire.

Pour les cultures de NHBE différenciées (sur inserts), la solution PrestoBlue a été diluée à 10 % dans du milieu de différenciation « Pneumacult-ALI complet » puis ajoutée en apical et en basal des inserts (200 µL et 500 µL respectivement). Les cellules ont été ensuite incubées pendant 2 h à 37 °C. Ensuite, pour chaque insert, les milieux ont été récupérés dans les 2 compartiments et poolés. La fluorescence a été mesurée ($\lambda_{\text{excitation}} = 540 \text{ nm}$ et $\lambda_{\text{émission}} = 600 \text{ nm}$; 150 µL/puit) à l'aide du lecteur de microplaque Synergy H1 (BioTek Instruments, Agilent, États-Unis).

Les résultats de viabilité ont été exprimés en pourcentage par rapport à la condition « Témoin PBS » selon l'équation suivante :

$$\text{Viabilité cellulaire } (\%) = \frac{\text{Fluo}_{\text{éch.traité}} - \text{Fluo}_{\text{blanc}}}{\text{Fluo}_{\text{témoin négatif}} - \text{Fluo}_{\text{blanc}}} \times 100$$

Un blanc a été obtenu à partir d'un insert sans cellules. Des cellules exposées aux Triton 1 % pendant 1 h. (Réf. 458139, Sigma-Aldrich) (100 µL en apical) ont servi de témoins positifs. Les analyses sont réalisées à J4, J8 et J11.

Pour les cellules NHBE non différenciées (plaques 96 puits), les cellules ont été rincées avec 150 µL de PBS 1X (Réf. 34024200900, Sigma-Aldrich) puis incubées 2 h dans 100 µL/puit de PrestoBlue dilué au 1/10^{ème} à 37 °C. La lecture de la fluorescence et l'analyse des résultats ont

été effectuées comme décrit précédemment après 24h, 48h et 72h d'exposition. Des cellules exposées au tert-butyl hydroperoxide (TBHP) à 350 µM pendant 24 h ont servi de témoin positif.

3.3.3. Dosage des mucines : méthode « Sandwich Enzyme Linked Lectin Assay » (ELLA)

Le dosage des mucines a été effectué sur un lysat cellulaire afin de mesurer à la fois le mucus sécrété et excrété. Pour faciliter le détachement du tapis cellulaire, le TrypLE™ Express (Réf. 12604013, Gibco™) a été rajouté (500 µL/insert) dans le compartiment basal pendant 15 minutes. Puis, le tampon de lyse cellulaire (Lysis Buffer 3 : Nucleus Protein, Réf. IS007, Cloud-Clone Corp.) a été mis en contact avec le tapis cellulaire (2 x 175 µL/apical de l'insert). Ensuite, les échantillons ont été récupérés dans des tubes Eppendorf de 1,5ml et conservés à -20 °C pour le dosage ultérieur selon le protocole détaillé dans l'Annexe 5.

Le dosage a été effectué par la méthode ELLA (Epithelix, 2021 ; Annexe 5) dans des plaques 96 puits à fond plat coatés pendant 1 h à 37 °C (60 µL/puit) avec une solution de lectine de *Triticum vulgare* (Réf. L0636, Sigma), préparée dans du PBS 1X à 6 µg/mL à un pH de 6,8. La plaque a été rincée 3 fois avec une solution de rinçage (PBS 1X sans Ca²⁺/ Mg²⁺ à pH 7,4 additionné de NaCl à 0.5 M et de Tween 20 à 0.1 %). Les lysats cellulaires ont été décongelés et centrifugés puis introduits dans les puits (50 µL/puit, en duplicat). Après 30 minutes d'incubation à 37 °C, la plaque a été rincée 3 fois et la solution de lectine *Ulex europaeus* conjuguée à la peroxydase à 1 mg/mL (Réf. L8146, Sigma Aldrich) diluée au 10^{ème} dans du PBS 1X à 0.1 % de BSA (50 µL/puit à 0,1 mg/mL) a été appliquée pendant 30 minutes à 37 °C. Un rinçage final a été effectué puis la solution de détection (TMB, Réf. N301, Thermo Scientific™) a été rajoutée (75 µL/puit) pendant 15 minutes à température ambiante à l'abri de la lumière. Cent microlitre d'acide sulfurique à 0.2 M par puit ont permis de bloquer la réaction. Une gamme étalon d'une solution standard de mucine de porc (Réf. 2378, Sigma), allant de 10000 nM à 78,1 nM, a été préparée dans une solution saline (NaCl 0,9 % + CaCl₂ 25 mM + HEPES 10 mM). L'absorbance a été mesurée à 450 nm. Les analyses sont réalisées à J4, J8 et J11 pour chacune des conditions d'exposition. Des cellules exposées aux LPS à 100 µg/mL pendant 24 h ont servi de témoin positif.

Parallèlement, le dosage des protéines présentes dans chaque échantillon a été réalisé pour pouvoir rapporter les quantités de mucines dosées à la quantité de protéines, donc de cellules sur l'insert. Le dosage des protéines a été effectué en duplica sur les lysats cellulaires à l'aide du kit « Protein Quantification Kit-Rapid » (Réf 51254-1KT, Sigma-Aldrich) à partir de 6 µL/échantillon dans une plaque à 96 puit à fond plat. La lecture de l'absorbance est réalisée à 570 nm.

3.3.4. Dosage des cytokines : méthode « Enzyme-linked immunosorbent assay » (ELISA)

La réponse inflammatoire a été évaluée par dosage de cinq cytokines/chimiokines : IL-1 β , TNF- α , MCP-1 (CCL2), IL-6 et IL-8 (CXCL8) dans les surnageants de culture par la méthode ELISA (kits « ELISA MAXTM Deluxe Set », BioLegend). L'intensité de fluorescence mesurée est proportionnelle à la quantité de cytokines présente dans l'échantillon.

Les surnageant récupérés ont été décongelés et dilués si nécessaire dans le milieu de culture « Pnemocult-ALI complet ». Un jour avant l'analyse, une plaque à 96 puits (NuncTM Microplate Immuno Maxisorp, Réf. 442404, Thermo ScientificTM) a été coatée (100 μ L/puit) avec la solution d'anticorps de capture puis scellée et incubée pendant la nuit à 4 °C. Le lendemain, la plaque a été rincée 3 fois avec 300 μ L/puit de tampon de rinçage (PBS 1X + Tween 20 à 0,05%). Les liaisons non spécifiques ont été bloquées par 200 μ L/puit de Diluent Assay 1X pendant 1 h à température ambiante sous agitation à 500 rpm/min (VMR[®] Incubating mini Shaker, Thermo Fisher). Toutes les incubations ultérieures ont été effectuées dans ces mêmes conditions. Une gamme d'étalonnage a été préparée à partir de la solution standard fournie dans le kit (allant de 1000 à 15,6 pg/mL pour IL-8 ; 500 à 7,8 pg/mL pour TNF- α , MCP-1 et IL-6 ; et 125 à 2 pg/mL pour IL-1 β). Après une incubation de 2 h, 4 lavages ont été réalisés, puis 100 μ L par puits de standards ou d'échantillons ont été ajoutés. La plaque a ensuite été incubée pendant 2 h avec agitation. Après 4 lavages, la solution d'anticorps de détection a été ajoutée et la plaque a été agitée pendant 1 h. Un rinçage a été nécessaire avant l'ajout de la solution d'Avidine-HRP dans les puits (30 min avec agitation). Un dernier rinçage (effectué cinq fois) était requis avant d'ajouter la solution TMB (100 μ L/puit) préparée extemporanément. La plaque a été gardée à l'obscurité pendant 15 à 20 min, sans agitation. La réaction a été arrêtée par une solution d'acide sulfurique 2 N (100 μ L / puit), ce qui a entraîné un virage de la couleur du bleu au jaune. L'absorbance est mesurée à 450 nm et 570 nm (lecteur de microplaque Synergy H1). La valeur de l'absorbance obtenue à 570nm est ensuite soustraite de celle à 450nm.

Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport à la condition « Témoin PBS ». Les analyses sont réalisées à J4, J8 et J11 pour les expositions répétées à l'IAL sur NHBE différenciées et 24 h, 48 h et 72 h après expositions pour les conditions immergées sur NHBE non différenciées.

3.3.5. Production d'ERO

L'effet pro-oxydant cellulaire a été estimée en évaluant la production des ERO à l'aide d'une sonde fluorescente. Le tapis cellulaire a été incubé avec une solution de DCFDA (10 μ M) (Réf. 287810, Sigma-Aldrich) dans du PBS (200 μ L/insert) pendant 35 min à 37 °C. Les cellules ont été ensuite rincées avec du PBS 1X et incubées pendant 5 minutes dans du DMSO dilué à 90 %

dans du PBS (200 µL/insert). Le tapis cellulaire a été récupéré dans des microtubes par grattage des inserts. Les microtubes ont été centrifugés à 10 000 g, à 4 °C, pendant 5 min. La mesure de la fluorescence des surnageants (150 µL/puit) a été effectuée dans des plaques 96 puits noires à fond plat transparent (Réf. 655076, Greiner Bio-one) à l'aide du lecteur de microplaque Synergy H1 ($\lambda_{\text{excitation}} = 488 \text{ nm}$ et $\lambda_{\text{émission}} = 530 \text{ nm}$). Les analyses ont été réalisées à J4, J8 et J11 et les valeurs obtenues ont été exprimées en pourcentage de la production d'ERO par rapport au « Témoin PBS ». Des cellules exposées à la pyocyanine à 400 µM pendant 30 min ont servi de témoin positif.

3.3.6. Expression de gènes d'intérêt par RT-qPCR

3.3.6.1. *Extraction et purification d'ARN des cellules NHBE*

A J4, J8 et J11, les tapis cellulaires ont été récupérés par grattage dans 350 µL d'une solution de dithiothreitol (DTT) à 1 M (Réf. 10708984001, Sigma-Aldrich) qui a été ensuite diluée dans du tampon « Buffer RLT » au 1000^{ème}. Puis, les cellules ont été transférées dans des microtubes en poolant directement 2 tapis cellulaire de la même condition dans le même tube (soit 700 µL/tube). Les échantillons ont été conservés à -80 °C.

L'extraction et la purification de l'ARN ont été réalisées à l'aide du kit « RNeasy® Mini Kit » (Réf. 74104, Qiagen) selon les recommandations du fournisseur. Chaque échantillon a été dilué au ½ dans l'éthanol 70 % puis transféré sur une colonne RNeasy Mini spin placée dans un tube de 2 mL et centrifugée pendant 15 sec à 10 000 rpm. Le filtrat collecté dans le tube a été éliminé et les colonnes ont été rincées par 350 µL de tampon puis centrifugées. Dix microlitres de la solution de DNase I (« RNase-Free DNase Set », Réf. 79254, Qiagen) dilués dans 70 µL de la solution « RDD » fournie dans le kit ont été rajoutés sur chaque colonne. Ensuite, les colonnes ont été maintenues pendant 15 min à température ambiante. Un rinçage avec le tampon « Buffer RW1 » a été finalement réalisé pour éliminer toute trace d'ADN dans les échantillons.

La purification de l'ARN a été réalisée par l'ajout de 500 µL de tampon « Buffer RPE » suivi d'une centrifugation de 2 min. Cette étape a été répétée 2 fois pour bien rincer la colonne. Finalement, l'ARN a été élué par centrifugation pendant 1 min après avoir ajouté 50 µL d'eau dépourvue de RNase (Réf. 129112, Qiagen). Cet éluat a été remis sur la colonne et centrifugé une seconde fois pour augmenter l'efficacité de récupération de l'ARN. Pour chaque condition, 3 échantillons ont été recueillis (2 tapis cellulaire par échantillon) et extraits indépendamment. Une fraction de ces 3 échantillons a été ensuite poolée, l'autre étant conservée non poolée. Toutes les solutions d'ARN ont été conservées à -80 °C.

Le dosage et la pureté des solutions d'ARN ont été évalués en mesurant le rapport des absorbances $A_{260}:A_{230}$ (> à 1,7) et $A_{260}:A_{280}$ (entre 1,8 et 2) à l'aide du Nanodrop 2000

(Thermo Scientific). La qualité des ARN est estimée par la mesure des « RNA Integrity Number » (RIN) mesuré à l'aide d'un système automatisé d'électrophorèse sur gel (TapeStation 2200, Agilent). Les valeurs des RIN supérieures à 7 attestent d'un ARN non dégradé et de bonne qualité. Les concentrations d'ARN sont résumées dans l'Annexe 7.

3.3.6.2. Niveaux d'expression d'un panel de gènes impliqués dans le stress oxydant et la génotoxicité

Les modulations des niveaux d'expression de gènes impliqués dans le stress oxydant et la réponse génotoxique ont été évaluées à l'aide des kits « RT² Profiler PCR Array » (Qiagen), précisé dans le chapitre 3.3.6.2.2. Ces tests permettent la quantification simultanée de 84 gènes impliqués dans un même processus ou une pathologie. Ce test repose sur le principe de la RT-PCR en temps réel et la capacité des microarrays à détecter l'expression de nombreux gènes simultanément à l'aide du SYBR® Green. Les ADN complémentaires (ADN_c) ont été distribués dans la plaque 96 puits fournie comportant les oligonucléotides correspondant aux 84 gènes d'intérêt. L'expression relative de chaque gène a été déterminée à l'aide des données du thermocycleur en temps réel, en se basant sur la méthode $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

3.3.6.2.1. Transcription Inverse

Pour chaque échantillon, l'ADN_c a été préparé à partir 0,5 µg d'ARN à l'aide du kit « RT² First Strand » (Réf. 330404, Qiagen) selon les préconisations du fournisseur. La qualité et la concentration de l'ADN_c synthétisé ont été évaluées par spectrophotométrie comme cité précédemment (cf. chapitre 3.3.6.2).

3.3.6.2.2. qPCR : Kit Qiagen

L'expression d'un panel de gènes impliqués dans le stress oxydant et la génotoxicité a été évalué à l'aide des kits « Human Oxidative Stress Plus PCR Array PAHS-065YA » et « Human DNA Damage Signaling Pathway PAHS-029ZA » respectivement (Qiagen). Les gènes étudiés ont été présentés en annexe (Annexe 6). La normalisation des données a été basée sur 5 gènes de ménage, exprimés de manière constante : ACTB, B2M, GAPDH, HPRT1 et RPLP0. En outre, un témoin de contamination d'ADN génomique (HGDC), un témoin évaluant l'efficacité de la transcription inverse (RTC) et un témoin permettant de tester l'efficacité de la PCR (PPC) ont été inclus dans la matrice.

L'ADN_c résultant de l'étape de la transcription inverse (aux alentours de 200 ng d'ADN_c) a été amplifié en utilisant le kit « RT² First SYBR® Green Mastermix » (Réf. 208052, Qiagen)

contenant un mélange de nucléotides, de tampon de PCR, de l'enzyme d'amplification inactive (HotStart DNA *Taq*Polymérase) et le SYBR® Green à l'aide du thermocycleur QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System (Applied Biosystems™ model 7500, ThermoFisher Scientific) selon les recommandations du fournisseur : 1 min à 95 °C pour activer l'enzyme ; 40 cycles de 15 sec à 95 °C, 1 min à 60 °C). Afin de vérifier la spécificité des échantillons amplifiés, cette étape d'amplification a été suivie par une étape d'analyse par courbe de fusion suivant les conditions suivantes : 15 sec à 95 °C, 1 min à 65 °C et 95 °C par 0,15 °C/s.

Les valeurs de C_t récoltées ont été analysées avec le logiciel « QIAGEN'S GeneGlobe Data Analysis Center » (www.qiagen.com/shop/genes-and-pathways/data-analysis-center-overview-page). Pour chaque échantillon, les analyses d'expression génique ont été réalisées sur deux réplicats indépendants.

3.3.6.3. Expression de gènes codant pour des cytokines et des mucines

3.3.6.3.1. Préparation des banques d'ADN_c

Les banques d'ADN_c ont été synthétisées à partir de 25 ng d'ARN purifié à l'aide du kit « QuantiTect® Whole Transcriptome » (Réf. 207043, Qiagen). Les concentrations d'ADN_c synthétisés sont résumées dans l'Annexe 7.

Tableau 3. Protocole de synthèse de l'ADN_c à partir de 25 ng d'ARN purifié (kit « QuantiTect® Whole Transcriptome », Qiagen).

Etape	Température	Temps
Transcription inverse	37 °C	30 min
	95 °C	5 min
Hybridation	22 °C	2 h
Amplification de la totalité du génome	30 °C	8 h
	95 °C	5 min
	4 °C	Infini

La réaction a été effectuée en plusieurs étapes (Tableau 3) :

- 5 µL d'ARN ont été mélangés avec du tampon « T-Script Buffer » (4 µL) et « T-Script Enzyme » (1 µL) contenant les enzymes nécessaires pour la transcription inverse. Ce mix a subi une première incubation de 30 min à 37 °C suivi de 5 min à 95 °C ;
- le mix d'hybridation (constitué du tampon « Ligation Buffer » (6 µL), du réactif « Ligation Reagent » (2 µL) et des enzymes « Ligation Enzyme 1 » (1 µL) et « Ligation Enzyme 2 » (1 µL)) a été rajouté, suivi d'une incubation de 2 h ;
- le mix d'amplification (formé d'un mélange de « REPLI-g Midi Reaction Buffer » (29 µL) et « REPLI-g Midi DNS Polymerase » (1 µL)) a été rajouté et les échantillons ont été incubés pendant 8 h à 30 °C pour obtenir un rendement élevé, suivi d'un chauffage de 5 min à

- 95 °C pour arrêter la réaction ;
- les ADN_c ont été laissés dans le thermocycleur et refroidis à 4 °C. Puis, ils ont été aliquotés (1 µL/tube) sans dilution et stockés à -80 °C en vue des analyses en PCR et qPCR.

3.3.6.3.2. Choix des amorces et validation

Le choix des amorces utilisées pour mesurer l'expression des mucines et des cytokines a été basé sur la littérature.

Tableau 4. Caractéristiques des amorces utilisées en qPCR : nom de l'amorce, séquence de nucléotides, longueur de l'amplicon (en paires de bases (pb)) et température de fusion (T_m).

Nom de l'amorce	Séquence 5' → 3'	Longueur de l'amplicon (pb)	T_m (°C)
GAPDH_F SAEC	GAGTCAACGGATTTGGTCGT	145	57,3
GAPDH_B SAEC	GACAAGCTTCCCGTCTCAG		59,4
MUC5B_F Nasal	CACATCCACCTTCCAAC	245	56
MUC5B_B Nasal	GGCTCATTGTCGTCTCTG		56
MUC5AC_F NHBE1	TACTCCACAGACTGCACCAACTG	129	62,4
MUC5AC_B NHBE1	CGTGTATTGCTTCCCGTCAA		57,3
IL-6_F SAEC	ACCCCTGACCCAACCACAAAT	97	59,8
IL-6_B SAEC	AGCTGCGCAGAATGAGATGAGTT		60,7
HA16380381 FH2-IL8	TACTCCAAACCTTCCAC	173	59
HA16380382 BH2-IL8	CTCAGCCCTCTTCAAAAAC		59
HA16380385 FH1-IL1B	CTAAACAGATGAAGTGCTCC	182	56,5
HA16380386 BH1-IL1B	GGTCATTCTCCTGGAAGG		59,6
HA16380391 FH1-CCL2	AGACTAACCAGAAACATCC	142	57,1
HA16380392 BH1-CCL2	ATTGATTGCATCTGGCTG		59,8

Les oligonucléotides à façon ont été commandés auprès d'Eurofins Genomics (GAPDH, MUC5B, MUC5AC et IL-6). Pour les gènes codant pour l'IL-8, l'IL-1 β et CCL2, les amorces proposées par Sigma Aldrich ont été utilisées.

A la réception, les amorces lyophilisées ont été reconstituées à 100 pmol/µL dans du tampon Tris-EDTA, 1X à pH 8 (Réf. BP2473, Fisher Bioreagents), aliquotées et stockées à -20 °C. Les caractéristiques des amorces utilisées sont résumées dans le Tableau 4.

i. PCR classique

Les PCR classiques ont été réalisées à partir des différentes banques d'ADN_c synthétisés (Annexe 7) et pour les diverses amorces testées afin d'identifier la présence de différents gènes de mucines et de marqueurs inflammatoires.

Pour chaque analyse, les banques d'ADN_c ont été décongelées et diluées au 250^{ème} dans de l'eau dépourvue de RNase. La préparation du mix réactionnel pour l'amplification d'un échantillon d'ADN_c en système SYBR[®] Green (« Invitrogen[™] Platinum[™] II Hot-Start PCR Master Mix », Invitrogen) est détaillée dans le Tableau 5. L'ajout du « Platinum[™] GC Enhacer » fournis dans le même kit est optionnel. Il dépend de la richesse des amorces en GC et de l'aspect des bandes en électrophorèse.

Tableau 5. Composition du mélange réactionnel pour l'amplification en PCR classique.

Réactif	Volume (µL)	Concentration finale
ADN _c	x	100 ng
Amorce Sens	1 µL	100 pmol
Amorce Antisens	1 µL	100 pmol
Invitrogen [™] Platinum [™] II Hot-Start PCR Master Mix	25 µL	
Eau dépourvue de RNase	y	
Platinum [™] GC Enhacer *	10 µL	
Volume totale	50 µL	

* optionnel

Les échantillons ont été amplifiés sur le thermocycleur Mastercycler gradient (Eppendorf) dans des tubes de 0,2 mL (« 8-Strip PCR Tubes, Single Caps (Domed) Attached, Tube One », Star Lab) selon le programme suivant (Tableau 6) :

Tableau 6. Programme utilisé pour la PCR classique.

Etape	Température	Temps
Dénaturation initiale	95 °C	5 min
30 cycles de PCR	Dénaturation	95 °C 30 sec
	Hybridation	T _m la plus faible de la paire d'amorces 30 sec
	Elongation	68 °C 1 min
Elongation finale	68 °C	5 min

La performance de la PCR est liée à la température de fusion des amorces, notée T_m. Leur détermination est un prérequis indispensable pour une optimisation : la température d'hybridation adoptée doit correspondre à la T_m la plus faible entre les deux amorces d'une même paire. L'idéal est d'avoir des T_m équivalents pour une même paire des amorces.

ii. *Electrophorèse*

Afin d'évaluer la spécificité des amorces utilisées en PCR, les produits d'amplification ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose à 2 % (2 tablettes de « Midori Green Advance

Agarose Tablets » (Réf. AG11, Genetics) dans 50 mL de tampon TAE (tris-acétate-EDTA) 1X (« AccuGENE® 50X TAE Buffer, 2M Tris-Acetate, 0,05 EDTA (disodium salt), pH 8,3 », (Réf. BE51216, Lonza)). Dix microlitres des produits de PCR ont été mélangés avec 2 µL de tampon de charge (« 6X MassRuler™ DNA Loading Dye » (Réf. SM0403, ThermoFischer Scientific)) et déposés dans les puits ainsi que 5 µL de marqueur de taille (« MassRuler™ DNA Ladder Mix, ready to use » (Réf. SM0403, ThermoScientific)). La migration a été effectuée sous 60 V pendant 1 h dans du tampon de migration TAE 1X préparé dans de l'eau ultra pure. La révélation des bandes a été obtenue sur banc UV.

3.3.6.3.3. PCR quantitative en temps réel

Les analyses par qPCR ont été effectuées à partir de 28 ng des banques d'ADNc préparées (cf. chapitre 3.3.6.3.1) (kit « QuantiNova™ SYBR® Green PCR » ; Réf. 208054, Qiagen) (solution à 14 ng/µL) afin de quantifier l'expression de gènes impliqués dans la production du mucus et l'inflammation.

La composition du mix réactionnel pour une amplification d'un échantillon d'ADNc en système SYBR® Green est détaillée dans le Tableau 7.

Tableau 7. Composition du mix réactionnel pour l'amplification en qPCR (kit « QuantiNova™ SYBR® Green PCR », Qiagen).

Réactif	Volume (µL)	Concentration finale
2x QuantiNova SYBR Green PCR Master Mix	10 µL	1 x
QN ROX Reference Dye ^Δ	0,1 µL	1 x
Amorce sens	1 µL	0,7 M
Amorce antisens	1 µL	0,7 M
ADNc	2 µL	28 ng
Eau dépourvue de RNase	x	
Volume total	20 µL	

^Δ Ajout du colorant de référence ROX uniquement avec les instruments Applied Biosystems for low-ROX.

Les solutions mères d'amorces (100 pmol) sont diluées au 7^{ème} dans du tampon TE.

Les ADNc sont en solutions à 14 ng/µL.

Les échantillons ont été amplifiés sur le thermocycleur QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System (Applied Biosystems™ model 7500, ThermoFisher Scientific) dans des plaques 96 puits (« MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate », Réf. N8010560, Applied Biosystems) selon le programme suivant avec une vitesse de rampe maximale de 2,5 °C/sec (Tableau 8) :

Tableau 8. Programme de qPCR (kit « QuantiNova™ SYBR® Green PCR », Qiagen).

Etape		Température	Temps
Activation de la polymérase par chauffage		95 °C	2 min
40 cycles	Dénaturation	95 °C	15 sec
	Hybridation et Elongation	60 °C [#]	15 sec
Analyse par courbe de fusion		95 °C à 65 °C	

[#] Les amorces ayant une Tm inférieure à 60 °C.

4. Co-exposition des NHBE différenciées aux PM₁₀ à l'IAL et aux milieux « conditionnés » des cellules MDM exposées aux PM_{2,5}

4.1. Protocole d'exposition des MDM aux PM_{2,5} en immergé

Toutes les manipulations sur les macrophages différenciés ont été réalisées sous la direction du Pr Valérie Lecureur (IRSET, Rennes). Le protocole de culture des cellules, le protocole d'exposition des monocytes différenciés en macrophages (MDM) aux PM_{2,5} en immergé ainsi que les paramètres étudiés sont résumés dans la Figure 15. Brièvement, les cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) sont isolées du sang de donneurs sains, récupéré auprès de l'EFS. Ils ont été cultivés pendant 7 jours dans du milieu RPMI complété par 5% de sérum de veau foetal et par 50 ng/mL de facteur de croissance macrophagique (M-CSF) afin d'aboutir à la différenciation des monocytes en macrophages. A ce stade, le milieu de culture a été remplacé par du RPMI supplémenté à 10 ng/mL de M-CSF pendant 2 jour. Les MDM ont été exposés aux PM_{2,5} en immergé pendant 4 jours consécutifs (de J0 à J3) à différentes concentrations (0,1 ; 1 et 10 µg/cm²/j) pendant 16 h/j. Les témoins positifs ont été exposés aux à 10 ng/mL pendant 24 h. Par comparaison, l'effet des PM_{2,5} sur la réponse inflammatoire a été testé en exposant des MDM aux PM_{2,5} à 10 µg/cm²/j pendant 4 jours consécutifs et, simultanément à J3, au LPS à 10 ng/mL pendant 24 h. Les surnageants de culture ont été récupérés à J4 et stockés à -80 °C pour la co-exposition. La viabilité cellulaire a été évaluée à J4, J7 et J11 par le test colorimétrique « Water-soluble tetrazolium salt » (WST1) et le dosage du lactate déshydrogénase (LDH). Les marqueurs d'inflammation et les marqueurs de polarisation des macrophages ont été analysés à J4 et à J11.

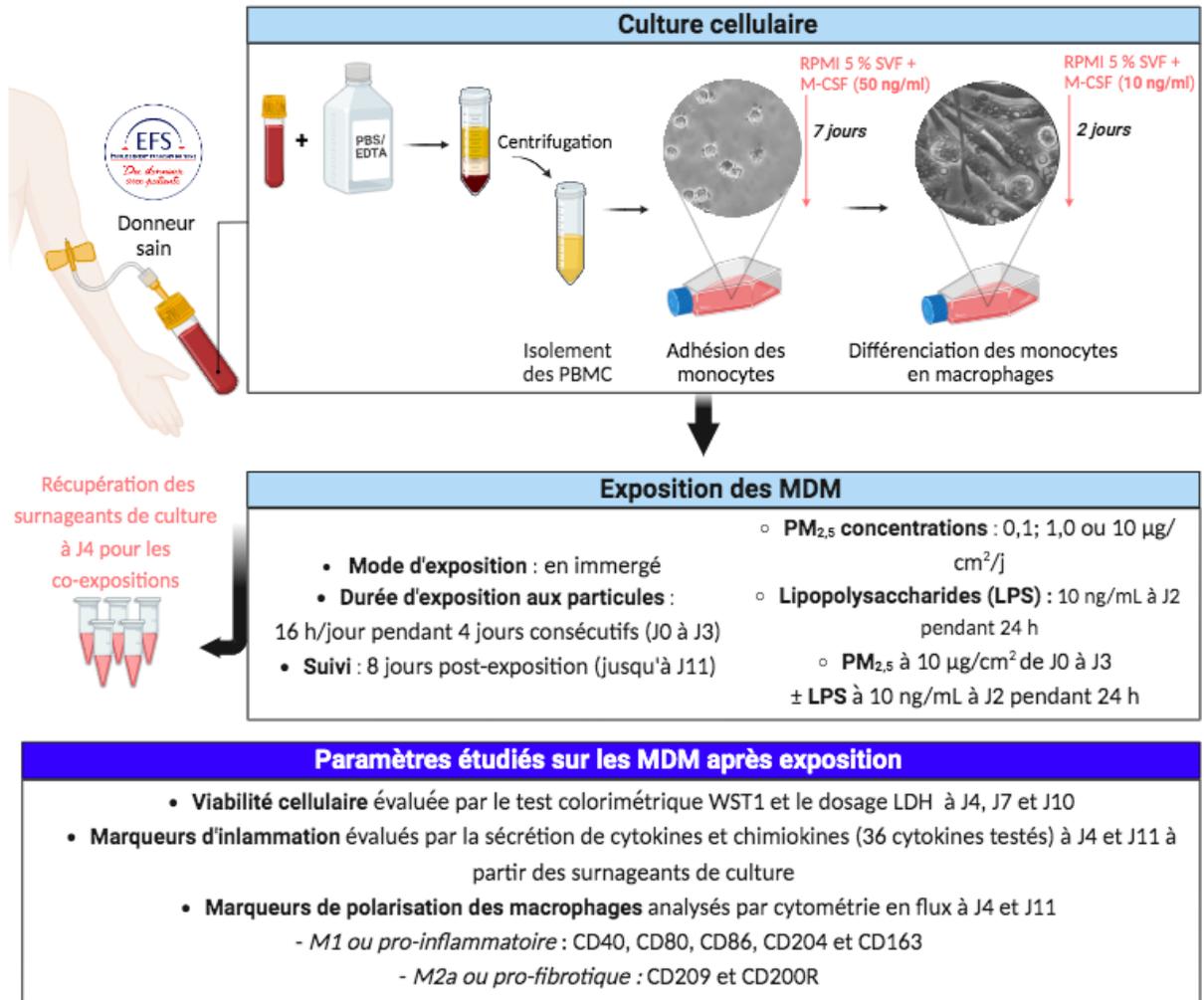


Figure 15. Récapitulatif des travaux effectués sur les cellules MDM par Pr Valérie Lecureur et son équipe à l'IRSET à Rennes.

4.2. Protocole de la co-exposition

Le protocole utilisé pour la co-exposition est résumé dans la Figure 16. Brièvement, les cellules NHBE différenciées à l'IAL ont été exposées aux PM₁₀ en apical à l'aide du Vitrocell® pendant 4 jours consécutifs à 1 ou 6 µg/cm²/j. A J2, le milieu de différenciation en basal a été remplacé par les « milieux conditionnés » des MDM exposées aux PM_{2,5} à 1 ou 10 µg/cm²/j respectivement (550 µL de surnageants/puit). La phase de co-exposition s'est étalée donc de J2 à J4. Des inserts « Témoins IAL/RPMI » (pas d'exposition en apical et rajout de milieu RPMI vierge en basal de J2 à J4) et « Témoins PBS/M0 » (nébulisation de PBS 1/80 en apical et rajout de surnageant de MDM non exposées aux particules en basal de J2 à J4) ont été préparés dans les mêmes conditions.

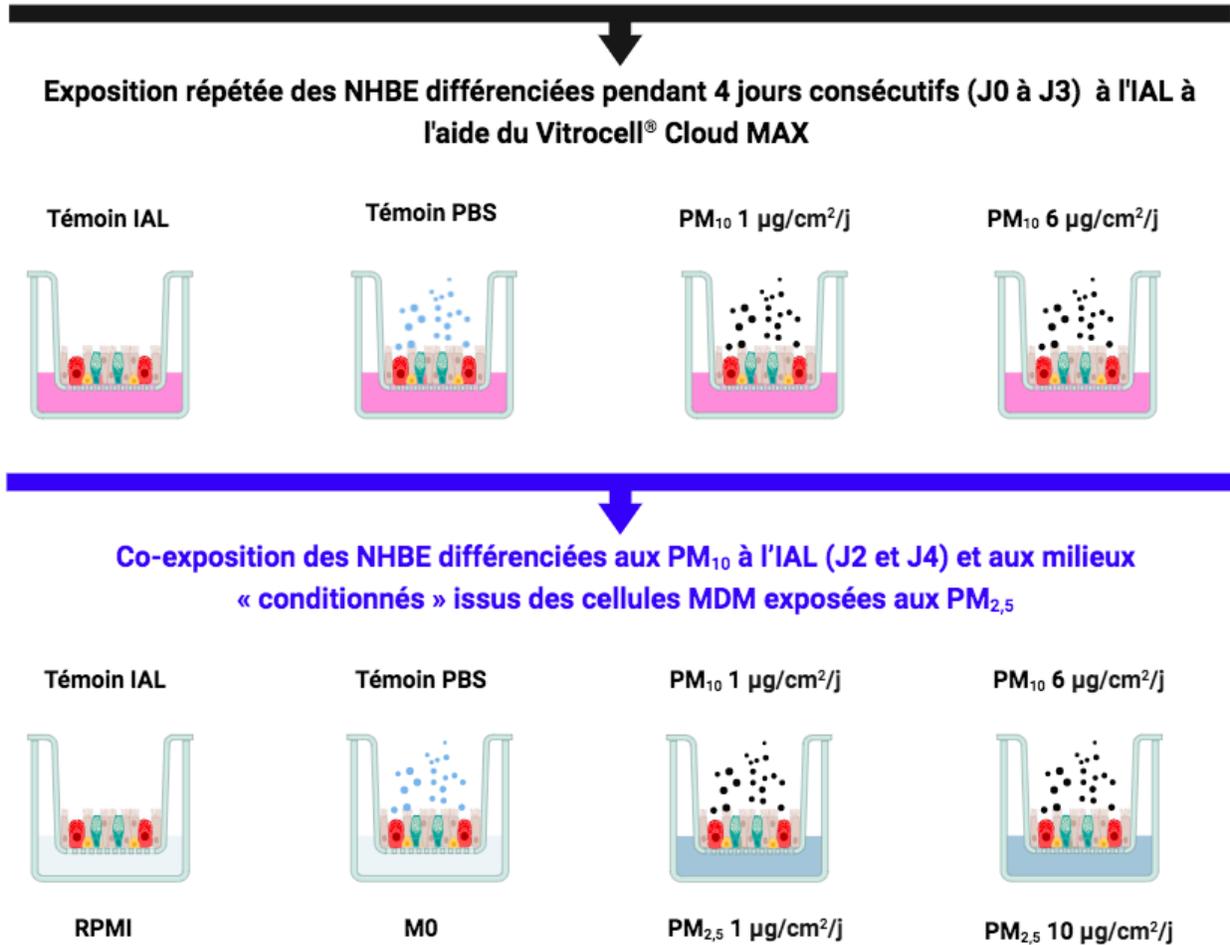


Figure 16. Protocole de la co-exposition des cellules NHBE différenciées simultanément aux PM₁₀ en apical (IAL) à l'aide du Vitrocell® et en basal aux milieux « conditionnés » des cellules MDM exposées aux PM_{2,5}.

4.3. Paramètres étudiés après la co-exposition

L'expression de différents gènes impliqués dans la réponse inflammatoire et pro-oxydante ont été analysés à J4. Trois séries d'exposition indépendantes ont été réalisées et les ARN ont été extraits et poolés par condition d'exposition. L'expression des gènes impliqués dans le stress oxydant a été quantifiée par RT-qPCR à l'aide du kit « RT² Profiler PCR Array Human Oxidative Stress Plus PCR Array » (PAHS-065YA, Qiagen) (cf. chapitre 3.3.6.2). L'expression des gènes codant pour la synthèse des mucines et pour la synthèse des cytokines ont été quantifiés directement par RT-qPCR en temps réel après validation des amorces par électrophorèse (cf. chapitre 3.3.6.3).

5. Analyses statistiques

En condition acellulaire, les résultats ont été exprimés en pourcentage moyen \pm écart type ($n = 3$ expériences indépendantes). Le test de Student a été effectué sur les valeurs brutes.

Pour le modèle NHBE non différencié, les résultats ont été présentés en pourcentage moyen par rapport aux témoins \pm écart type. Le test ANOVA unidirectionnel a été effectué sur les données brutes, suivi par le test de Dunnett pour comparer les groupes exposés aux groupes témoins ($n = 3$ à 6 échantillons par condition issus de 2 ou 3 expériences indépendantes).

Pour le test de viabilité et la production d'ERO réalisés sur les NHBE différenciées, les résultats ont été exprimés en % moyen par rapport au groupe « Témoins PBS » \pm écart type. Le test ANOVA bidirectionnel et le test de Tukey ont été utilisés pour comparer les différents groupes testés entre eux et au fil du temps (J4, J8 et J11).

Les valeurs brutes de TEER ont été comparées entre les groupes exposés aux PM₁₀ et le groupe « Témoin PBS » à J2, J4, J8 et J11 mais également entre les différents jours d'analyse pour la condition « Témoin IAL », grâce au test de Student.

Les résultats du dosage du mucus ont été exprimés en % moyen par rapport au « Témoin PBS » \pm écart type. Le test non paramétrique Wilcoxon-Mann-Whitney a été effectué sur les données brutes (μg de mucines/mg de protéines) afin d'effectuer une comparaison entre la production de mucus dans les échantillons traités et le groupe « Témoin PBS » à J4, J8 et J11.

Les valeurs brutes de production des cytokines dans les cellules exposées et non exposées (« Témoin PBS ») ont été analysées en cinétique par le test ANOVA unidirectionnel suivi du test de Tukey pour les comparaisons multiples.

Pour l'expression génique des cytokines et mucines (expositions des NHBE aux PM₁₀ et co-expositions), les résultats ont été exprimés sous forme d'expression relative par rapport aux conditions témoins (« Témoins PBS » pour l'exposition des NHBE aux PM₁₀ à l'IAL et « Témoin PBS/MO » pour la co-exposition) (méthode $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$). Deux à 3 analyses indépendantes ont été réalisées en triplicats sur un même échantillon représentatif de 6 inserts. Le test ANOVA unidirectionnel a été effectué sur les données brutes, suivi par le test de Newman-Keuls pour les comparaisons multiples.

Pour tous les paramètres étudiés, les p -values $< 0,05$ ont été considérées comme significatives. Toutes les analyses statistiques ont été effectuées avec le logiciel Graphpad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc).

Résultats et Discussions

1. Caractérisation des propriétés intrinsèques des différentes fractions de poussières en condition acellulaire

1.1. Objectifs

Après séparation granulométrique du SRM® 2585 en deux sous-fractions inhalables PM₁₀ et PM_{2,5}, nous avons caractérisé les propriétés physico-chimiques intrinsèques de ces 3 échantillons, en conditions acellulaires : vérification de la taille des particules dans chacune des fractions, dosage des endotoxines et évaluation du potentiel oxydant. Ces données ont fait l'objet d'une première publication (El Hajjar et al., 2022) figurant en annexe de ce manuscrit (Annexe 1), dont les principaux éléments seront repris ci-après.

1.2. Principaux résultats

La microscopie électronique à transmission a permis d'évaluer la granulométrie des particules constituant le SRM® 2585 total et de vérifier celle des deux sous-fractions PM₁₀ et PM_{2,5}. Les niveaux d'endotoxines mesurés variaient entre 24,3 à 36,20 EU/mg. La plus petite fraction (PM_{2,5}) présentait le niveau d'endotoxine le plus élevé (+ 49 % comparé au SRM® 2585 total).

Le stress oxydant est l'un des mécanismes primordiaux de toxicité engendré par les particules. Afin d'étudier la relation entre le potentiel oxydant intrinsèque des particules et les réponses cellulaires obtenues par la suite dans l'approche *in vitro*, trois méthodes complémentaires ont été déployées : la déplétion en acide ascorbique (AA) ou en dithiotréitol (DTT) et la production d'ERO quantifiée à l'aide d'une sonde fluorescente, la DCFDA. Des particules Diesel (DEP) connues pour leur capacité à produire des ERO et induire un stress oxydant ont été utilisées à titre de comparaison.

Les résultats obtenus ont mis en évidence une variation dose-dépendante du PO pour les trois types de poussières avec le test au DTT qui présente donc la meilleure sensibilité (Figure 17A). En effet, avec le test à l'AA, ces effets ne sont visibles qu'aux deux doses les plus élevées (44 et 110 µg/mL) (Figure 17B). L'effet de la granulométrie n'est pas toujours significatif, mais une tendance globale se dégage pour la fraction PM_{2,5} qui semble induire une réponse plus importante, notamment vis-à-vis de l'AA aux doses intermédiaires. Ces réponses restent toutefois nettement inférieures à celles observées, à doses équivalentes, avec les particules DEP.

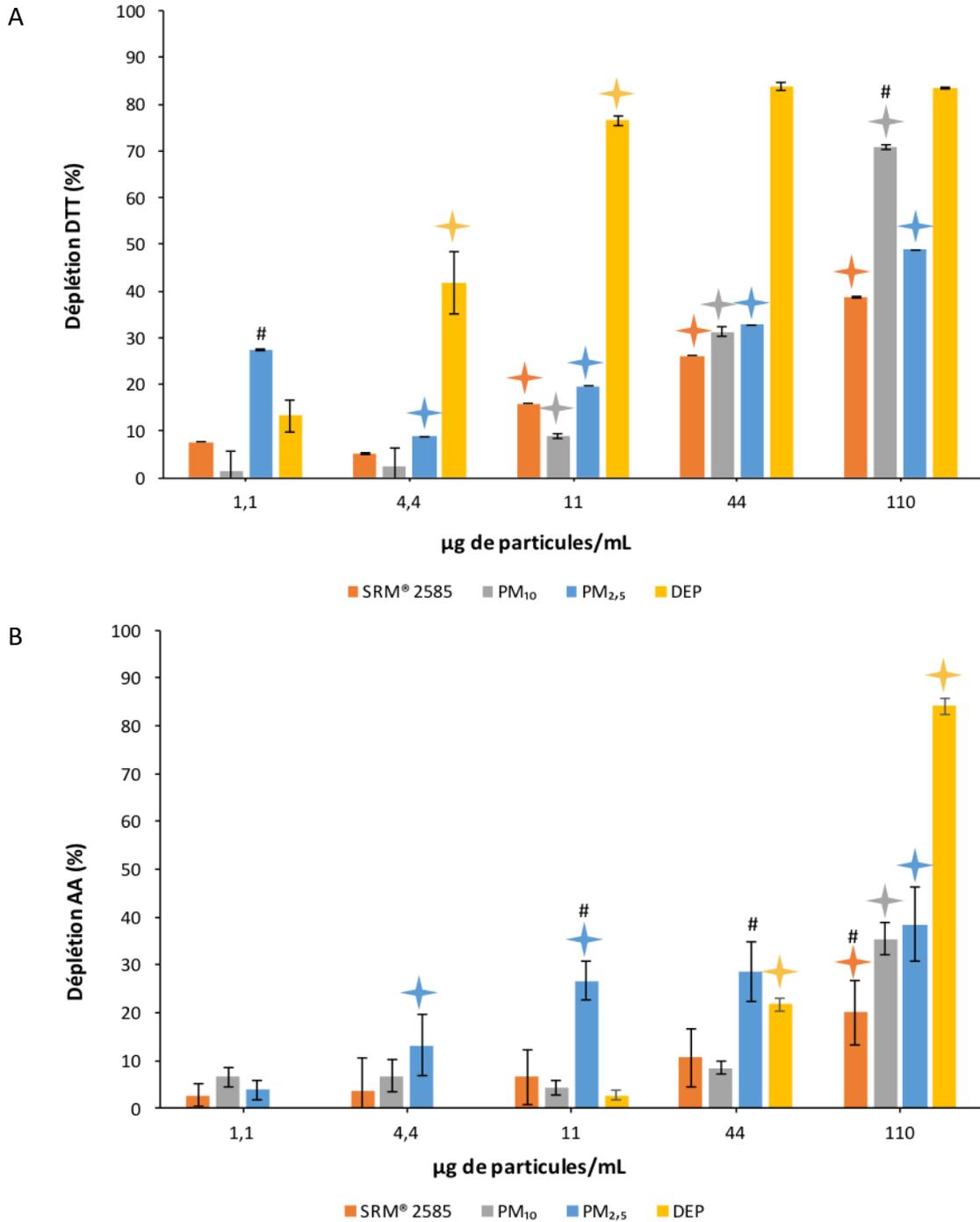


Figure 17. Potentiel oxydant intrinsèque du SRM® 2585, des PM₁₀ et des PM_{2,5} évalué par la déplétion du DTT (A) et de l'AA (B). Les particules DEP ont servi de témoin positif.

Les résultats sont exprimés en pourcentage ± écart type. n = 3 expériences indépendantes.

Le test de Student a été effectué sur les valeurs brutes. ◆ : différence significative entre 2 doses consécutives (relation dose-effet), p ≤ 0,05 ; # : pour une dose donnée, modification significative entre cet échantillon et les deux autres (effet de la granulométrie), p ≤ 0.05.

Adapté de El Hajjar et al., 2022.

Pour la production des ERO, une relation dose-effet modérée mais significative n'est observable que pour le SRM[®] 2585 et la fraction PM₁₀ aux doses les plus élevées (Figure 18). La granulométrie des particules aurait un effet inverse de celui décrit pour le PO puisque l'induction d'ERO est significativement plus faible pour les PM_{2,5}. En fonction de la dose testée, les particules DEP ont induit des niveaux d'ERO entre 1,5 et 7,7 fois plus élevés par rapport aux échantillons de poussières.

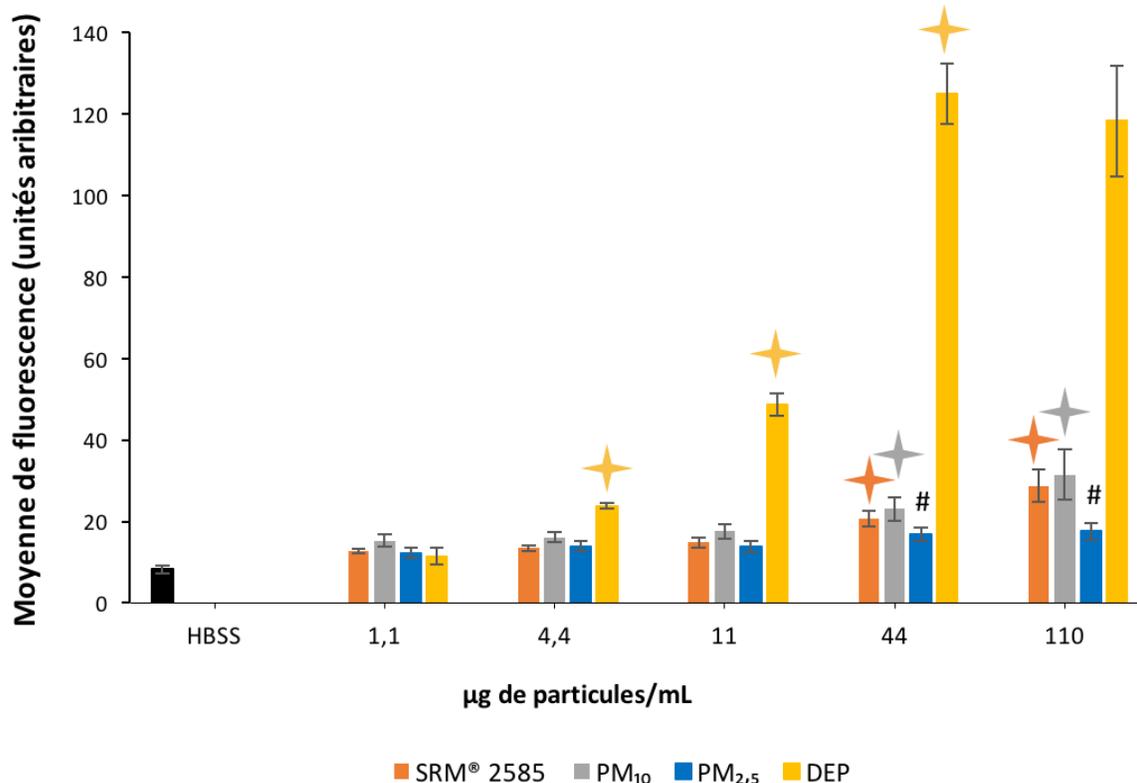


Figure 18. Production intrinsèque d'ERO par le SRM[®] 2585, les PM₁₀ et les PM_{2,5} mesurée à partir de la fluorescence émise par la sonde DCFDA. Les particules DEP ont servi de témoin positif et le HBSS a été utilisé comme témoin négatif.

Les résultats sont exprimés en moyenne de fluorescence \pm écart type. $n = 3$ expériences indépendantes.

Le test de Student a été effectué sur les valeurs brutes. \blacklozenge : différence significative entre 2 doses consécutives (relation dose-effet), $p \leq 0,05$; # : pour une dose donnée, modification significative entre cet échantillon et les deux autres (effet de la granulométrie), $p \leq 0.05$.

Adapté de El Hajjar et al., 2022.

1.3. Discussion partielle

Afin de mettre en relation les propriétés physico-chimiques intrinsèques et leur toxicité potentielle après inhalation, nous avons dosé les endotoxines et évalué le potentiel oxydant du SRM[®] 2585 et de ses deux sous-fractions inhalables PM₁₀ et PM_{2,5}.

En effet, lors de la lyse de la membrane externe des bactéries gram-négatives, le lipopolysaccharide (LPS) est libéré. Ce dernier, agissant comme une endotoxine, est connu pour déclencher des mécanismes inflammatoires dans les tissus, pouvant contribuer au développement de maladies respiratoires telles que l'asthme, la BPCO ou la fibrose. Dans une récente revue de littérature, les quantités moyennes d'endotoxines mesurées à partir de poussières domestiques sédimentées sur les sols, varient de 9,24 et 79,6 UE/mg de poussières, avec des niveaux extrêmes allant de 0,041 à 1698 EU/mg de poussières, selon les études (Shamsollahi et al., 2019). Aucune différence nette n'a été observée entre les études menées en milieu rural ou urbain. Ainsi, par comparaison, le SRM® 2585 et ses sous-fractions présentaient des niveaux d'endotoxines intermédiaires, comparables à ceux rapportés par Leung et al. (2010), Thorne et al. (2005) Saraf et al. (1999), ou encore Tischer et al. (2011), mais inférieurs à ceux mesurés par Bose et al. (2016), Horick et al. (2006), Lawson et al. (2011) et Litonjua et al. (2002). Selon Sun et al. (2022), des variations des niveaux d'endotoxines, allant de 7,6 à 258 EU/g de poussière, dans les 290 résidences urbaines examinées, a été observée, ces échantillons étant exclusivement prélevés sur le sol de la salle de séjour. La présence de tapis, d'animaux domestiques, mais également la faible fréquence de nettoyage des sols, l'âge de la maison et l'humidité relative intérieure étaient les principaux déterminants de la biocontamination intérieure. D'importantes disparités régionales ont également été notées. D'un point de vue analytique, la sensibilité des endotoxines au test LAL peut varier selon l'origine bactérienne de l'endotoxine ainsi que son association éventuelle à la membrane cellulaire (Duquenne et al., 2011). Ces éléments peuvent contribuer aux variations des niveaux d'endotoxines observées dans les différentes maisons échantillonnées. Pour sa part, le SRM résulte du mélange de nombreux prélèvements qui intègrent ces facteurs de variabilité.

La concentration des substances chimiques adsorbées sur la surface des poussières peut varier en fonction de leur granulométrie. Cette observation pourrait être due à l'augmentation de la surface des particules plus fines, qui entraîne, à masse équivalente, une accumulation des substances adsorbées (Cao et al., 2019). Toutefois, cet effet semble dépendre du type de poussières, puisque pour les poussières prélevées en milieu agricole, le niveau d'endotoxines des PM₁₀ était 14,5 fois supérieur à celui des PM_{>10} (Hawley et al., 2015). Dans le cas du SRM® 2585, nous avons observé une tendance à l'augmentation du niveau d'endotoxines parallèlement à la diminution de la granulométrie, atteignant un facteur 1,5 pour les PM_{2,5}.

Les effets sanitaires des particules sont essentiellement liés à leur potentiel inflammatoire via la production d'espèces oxydantes en lien avec la présence de métaux et molécules organiques (Hellack et al., 2014). Trois tests ont été réalisés, montrant des sensibilités distinctes à diverses familles de composés pro-oxydants. Vu leur spécificité à certains types de ERO ou à certains constituants des PM, aucun consensus n'est accepté jusqu'à présent sur le test le plus représentatif des effets sanitaires observés, et la communauté scientifique s'oriente vers la combinaison de différentes méthodes considérées comme complémentaires pour obtenir les

résultats les plus pertinents (Fang et al., 2016). Le DTT est sensible aux composés organiques, essentiellement les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) et les quinones (Chung et al., 2006 ; McWhinney et al., 2013), ainsi qu'aux métaux de transition solubles (Charrier & Anastasio, 2012 ; Visentin et al., 2016), alors que l'AA est notamment sensible au Cu et au Mn (Stoeger et al., 2009). Enfin, la sonde DCFH détecte à la fois les ERO et les espèces réactives de l'azote (RNS) et réagit également avec le H₂O₂ et les métaux de transition (King & Weber, 2013; Sauvain et al., 2013). Ces éléments sont cohérents avec les résultats obtenus. Les DEP, riches en HAP et métaux issus de la combustion et de l'usure du moteur respectivement, ont réduit le DTT dans une plus grande mesure que les échantillons de poussières (El Hajjar et al., 2022). La déplétion en DTT par les particules de poussières serait due à la présence de divers HAP dans le SRM[®] 2585, identifiés et quantifiés par le NIST. Bien que les métaux n'aient pas été inclus dans cette analyse détaillée, notre échantillon contiendrait des traces métalliques puisqu'il est issu de l'assemblage du SRM[®] 2583 (« Trace Elements in Indoor Dust, Nominal 90 mg/kg Lead ») et du SRM[®] 2584 (« Trace Elements in Indoor Dust, Nominal 1 % Lead) au sein desquels divers métaux ont été mesurés. Sur la base des données analytiques figurant dans leurs certificats d'analyse respectifs (NIST, 2016a, 2016b) et de leurs proportions respectives (70 % et 30 %) dans le SRM[®] 2585, on peut donc estimer grossièrement que la concentration minimale de fer (Fe), magnésium (Mg) et aluminium (Al) est d'environ 5-7 mg/g dans le SRM[®] 2585, celle de zinc (Zn) d'environ 0,8 mg/g, tandis que celle de cuivre (Cu) et nickel (Ni) est proche de 0,1 mg/g de poussière. La déplétion en AA mesurée à partir de nos échantillons reste toutefois limitée, indiquant une faible contribution de la fraction métallique au potentiel oxydant des poussières. Enfin, la production des ERO, détectée par le DCFDA, s'est avérée limitée, notamment par comparaison aux niveaux induits par les DEP.

Considérées globalement, ces données indiquent que les propriétés pro-oxydantes intrinsèques de SRM[®] 2585, principalement observées pour le DTT, pourraient donc être principalement attribuées à la fraction de HAP. Sur la base de l'analyse du NIST, 66 HAP ont été identifiés, correspondant à une concentration massique totale de 37,9 µg/g (NIST, 2018). En revanche, les métaux ne semblent contribuer que marginalement au PO intrinsèque des poussières.

2. Evaluation de la toxicité sur le modèle NHBE non différencié : viabilité et réponse inflammatoire

Dans le cadre de la publication figurant en annexe de ce manuscrit (El Hajjar et al., 2022), nous avons réalisé une première estimation comparative des effets toxiques (cytotoxicité et réponse inflammatoire) du SRM[®] 2585 complet et la fraction PM₁₀ vis-à-vis d'un modèle de cellules NHBE non différenciées. Les quantités de PM_{2,5} obtenues après séparation granulométrique étaient faibles, aussi les avons-nous priorisées pour l'étude principale menée

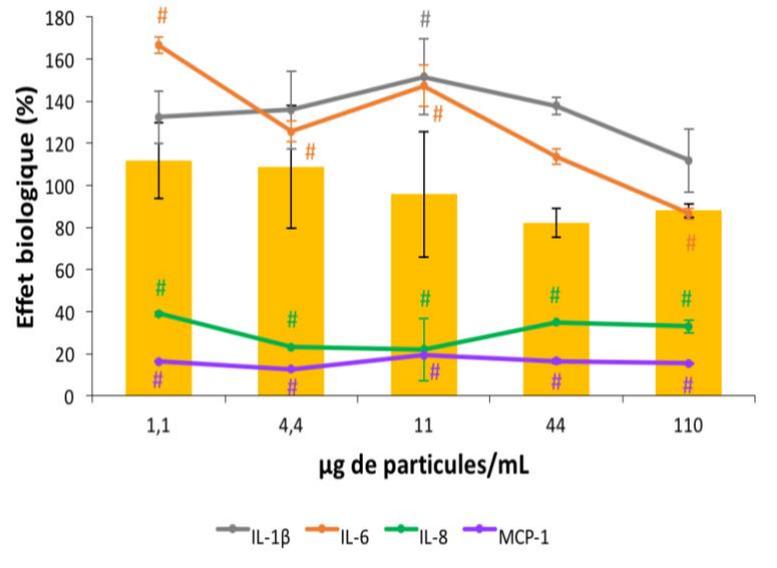
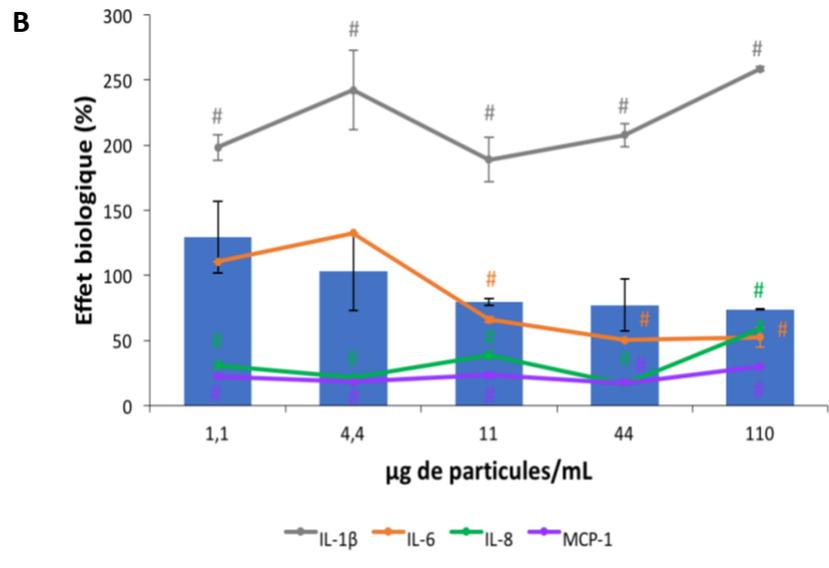
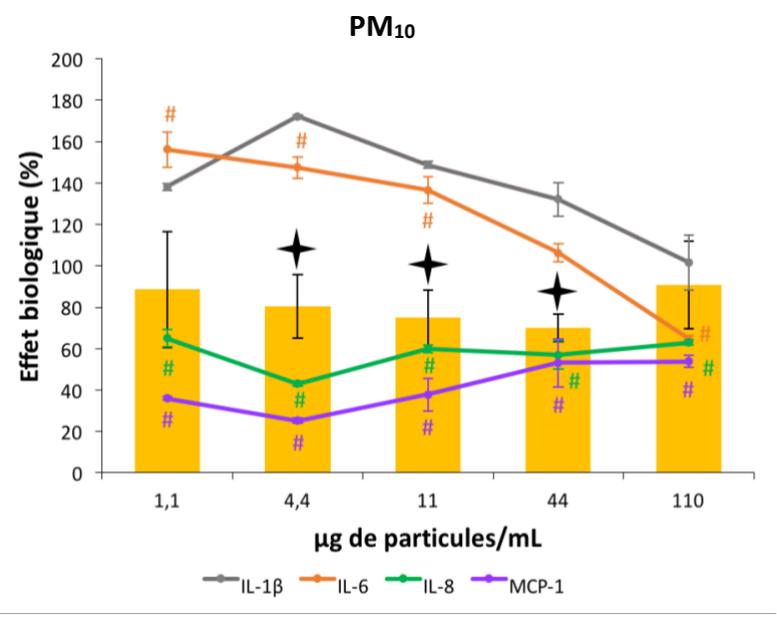
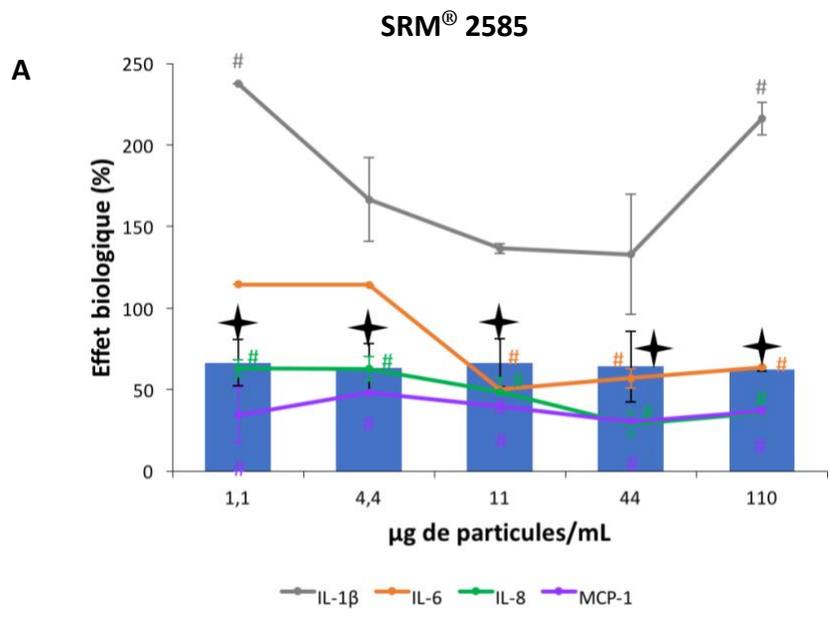
par la suite sur les cellules différenciées. Les données obtenues avec les PM₁₀ pourront ensuite être comparées avec celles obtenues sur le modèle différencié, afin d'évaluer l'impact de la différenciation et du mode d'exposition sur le profil toxique de cette fraction de poussières.

Les réponses cellulaires ont été déterminées après 24 h (Figure 19A), 48 h (Figure 19B) et 72 h (Figure 19C) d'exposition selon un protocole classique en immergé. La gamme de concentrations utilisée va de 1,1 à 110 µg/mL, ce qui correspond aux concentrations surfaciques qui seront utilisées par la suite sur le modèle différencié. Les résultats de cytotoxicité et de dosage des cytokines présentés dans l'article publié (Annexe 1) obtenus après 72 h d'exposition ont été complétés par l'inclusion de nouvelles données correspondant à 24 h et 48 h d'exposition. De plus, la production d'IL-8 et de MCP-1 après 72 h d'exposition ont été mesurées ultérieurement dans les milieux de culture. Les résultats complétés de ces expérimentations sont présentés dans cette partie du manuscrit.

Le SRM[®] 2585 induit une cytotoxicité sur les cellules NHBE non différenciées après 24 h d'exposition pour toutes les concentrations, mais l'effet semble transitoire puisque qu'il n'apparaît plus que sous forme de tendance non significative aux plus fortes concentrations après 48 h et disparaît totalement après 72 h d'exposition. La fraction PM₁₀ exerce un effet cytotoxique d'amplitude plus modérée et uniquement après 24 h et 72 h d'exposition.

Les profils et les cinétiques des réponses inflammatoires varient selon les cytokines considérées. Le TNF-α n'a jamais été détecté dans les milieux de culture, quelles que soient les conditions envisagées. La production d'IL-1β est significativement augmentée après 24 h et 48 h d'exposition au SRM[®] 2585, puis apparaît au contraire significativement diminuée à 72 h. Le même effet temporel est observé avec les PM₁₀, mais les augmentations initiales sont d'amplitudes plus limitées et n'apparaissent plus que comme des tendances. L'IL-6 ne subit aucune augmentation de sa production sous l'effet du SRM[®] 2585. Aux plus fortes concentrations, l'IL-6 est au contraire diminuée, quelle que soit la durée de l'exposition. Les PM₁₀ induisent à l'inverse une augmentation significative d'IL-6 après 24 h et 48 h d'expositions aux 3 plus faibles doses, mais une inhibition à la plus forte dose, observée également après 72 h d'exposition. Enfin, une forte diminution de la production d'IL-8 et de MCP-1 est observée pour les deux échantillons et dans toutes les conditions de durée et de concentration.

Deux publications ont utilisé des extraits organiques préparés à partir du SRM[®] 2585 et ont évalué la viabilité de différents modèles cellulaires après expositions en immergé. Zhang et al. (2016) ont montré que des cellules hépatiques (HepG2) étaient peu affectés après 24 h et 72 h d'exposition à des concentrations « compatibles avec des conditions physiologiques ». Sur des cellules pulmonaires (16-HBE14o-, NuLi-1 et A549) et des cellules monocytaires (THP-1), Marques dos Santos et al. (2022) ont observé un dysfonctionnement mitochondrial (production d'ATP et respiration) dose-dépendant après 24 h d'exposition, mais sans conséquence sur la viabilité. Les cellules HepG2 sont apparues plus résistantes à ces perturbations mitochondriales.



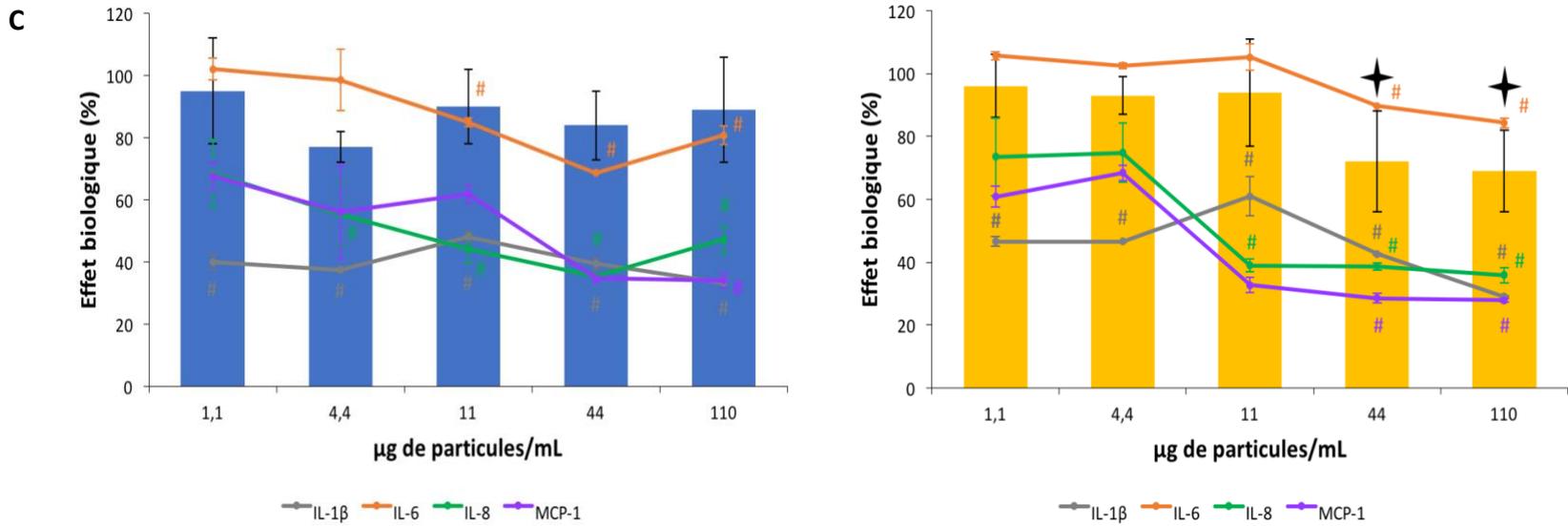


Figure 19. Effets biologiques mesurés sur les cellules NHBE non différenciées après 24 h (A) ; 48 h (B) et 72 h (C) d'exposition au SRM® 2585 ou à la fraction PM₁₀. La viabilité cellulaire (histogrammes) et la production de cytokines (IL-1β, IL-6, IL-8 et MCP-1 ; lignes colorées) ont été évaluées. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport au « Témoin non exposé ». n = 3 à 6 échantillons par condition issus de 2 ou 3 expérimentations indépendantes.

Le test ANOVA unidirectionnel a été effectué sur les données brutes, suivi par le test de Dunnett pour les comparaisons multiples. ♦ : modification significative de la viabilité des cellules NHBE, $p \leq 0,05$; # : modification significative de la production de cytokines, $p \leq 0,05$.

Adapté et complété de El Hajjar et al. (2022).

En utilisant des cellules NHBE différenciées, Hawley et al. (2015) n'ont pas observé de variation significative de la viabilité après 2 h d'exposition à des poussières d'origine agricole.

Une induction de la sécrétion d'IL-6, IL-8, GM-CSF, MCP-1 et MIP-3 α par les cellules NHBE cultivées en immergé a été observé après 24 h d'exposition à 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ d'allergènes d'acariens (Österlund et al., 2009). Mais de manière surprenante, l'exposition au SRM[®] 2585 et aux PM₁₀ conduit globalement à une diminution de la sécrétion des cytokines testées, à l'exception de l'IL-1 β . Marques dos Santos et al. (2022) ont également rapporté une diminution des niveaux d'IL-6 et d'IL-8 après 24 h d'exposition des cellules 16HBE14o- aux extraits organiques du SRM[®] 2585 dans des conditions immergées, tandis qu'aucune variation n'a été notée vis-à-vis de la lignée NuLi-1. Kang et al. (2010) ont aussi montré une réduction de la production d'IL-1 β et d'IL-8, associée à la diminution de leur expression, après 24 h d'exposition de cellules U937 (cellules pro-monocytaires) à des échantillons de poussières intérieures. Parmi le mélange complexe de composés adsorbés sur les poussières issu de l'air intérieur comme le SRM[®] 2585, on peut supposer que certains ont la capacité d'inhiber partiellement la sécrétion de cytokines. En revanche, les niveaux de transcription d'IL-6, d'IL-8 et de TNF- α ont été significativement augmentés dans les cellules NHBE différenciées après une courte exposition (2 h) à des poussières issues du milieu agricole (Hawley et al., 2014). Une étude plus récente menée sur des cellules macrophagiques RAW 264.7 exposées à de la poussière de sable a révélé que le pic de production d'IL-6 était atteint après 4 h d'exposition, tandis que 24 h étaient nécessaires pour le TNF- α (Olgun et al., 2020). Une réponse inflammatoire dose-dépendante observée pour l'IL-6 et l'IL-8 a également été observé dans une étude antérieure sur des cellules A549 exposées en immergé aux poussières domestiques (Saraf et al., 1999). Ainsi, le profil de sécrétion des cytokines dépend à la fois du type de cytokine produit, du type cellulaire utilisé et du moment choisi pour l'analyse, ce qui rend les comparaisons difficiles.

En conclusion, la viabilité des NHBE non différenciées est transitoirement altérée et de façon plus marquée avec le SRM[®] 2585. La production des médiateurs de l'inflammation est modulée selon leur nature et dans le temps. Ainsi, la sécrétion de cytokines n'est augmentée que pour l'IL-1 β sous l'effet du SRM[®] 2585 et dans une moindre mesure pour l'IL-6 sous l'effet des PM₁₀, mais de façon transitoire. En effet, après 72 h d'exposition, la production de ces 2 cytokines est au contraire diminuée, notamment aux plus fortes doses. Ces effets pourraient indiquer une adaptabilité du modèle cellulaire non différencié en réponse à la présence des poussières et soulignent l'importance d'une approche cinétique de ces mesures. Enfin, les productions d'IL-8 et de MCP-1 sont, de façon plus inattendue, inhibées dans toutes les conditions étudiées.

3. Mutagénicité des particules

Nous avons complété cette première partie du travail par la détermination du potentiel mutagène des extraits organiques préparés à partir des échantillons de SRM® 2585 et de PM₁₀. La mutagénicité a été évaluée à l'aide du test d'Ames vis-à-vis de 4 souches de *S. typhimurium* (TA98, YG1042 et TA100 et TA102) en absence (mutagénicité directe) et en présence (mutagénicité indirecte) d'un activateur métabolique issu du foie de rat (S9mix), permettant ainsi de détecter des familles de composés chimiques agissant par différents mécanismes mutationnels, directement ou après métabolisation (El Hajjar et al., 2022).

Tableau 9. Effet mutagène des extraits organiques obtenus à partir du SRM® 2585 et des PM₁₀.
Adapté de El Hajjar et al. (2022).

Souches	S9mix	Témoin Négatif (Moyenne Révertantes spontanées / Plaque)	SRM® 2585			PM ₁₀		
			Doses (µg Equivalent Particules / Plaque)					
			40 µg	10 µg	1 µg	40 µg	10 µg	1 µg
Indice mutagène = Moyenne Révertantes Induites / Moyenne Révertantes spontanées								
TA98	-	35 ± 8	1.1	1.2	1.1	1.6	1.1	1.3
	+	32 ± 9	2.3	1.2	1.1	3.2	1.6	1.2
YG1041	-	46 ± 6	9.3	3	1.2	10.0	3.7	1.2
	+	44 ± 15	8.4	2.6	1.5	8.6	3.8	2.6
TA100	-	112 ± 12	<i>0.6</i>	1.0	0.9	<i>0.7</i>	0.8	1.0
	+	119 ± 14	1.5	1.1	1.0	1.5	1.2	1.0
TA102	-	445 ± 25	1.0	1.0	1.0	1.1	1.0	1.0
	+	478 ± 20	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0

Les réponses mutagènes significatives, correspondant au moins à un doublement des révertants spontanés, sont indiquées en gras, les réponses toxiques sont en italique.

Les souches TA98 et YG1041 caractérisent un mécanisme de décalage du cadre de lecture alors que les souches TA100 et TA102 opèrent par un mécanisme de substitution de paires de bases. Pour les 2 premières souches, les résultats ont montré que les deux types de particules sont dotés d'un potentiel mutagène direct (YG1041) et indirect (TA98 et YG1041), plus prononcé pour les PM₁₀, associé à une relation dose-effet (Tableau 9). En revanche, aucune réponse directe n'a été observée avec la souche TA98. Vis-à-vis de la souche TA100, les 2 extraits organiques s'avèrent toxiques (indice mutagène inférieur à 1) à la dose la plus élevée (40 µg/boîte). L'ajout du S9mix induit une augmentation du nombre de révertants à la dose la plus élevée, qui reste toutefois en deçà du seuil de significativité. Enfin, aucune modification n'est observée vis-à-vis de la souche TA102.

Les réponses significatives observées avec la TA98 en présence de S9mix peuvent être considérées comme caractéristiques des HAP. La souche YG1041 surexprime les enzymes

nitro-réductase et O-acétyltransférase, et a donc été spécifiquement conçue pour la détection des composés nitro-aromatiques (sans S9mix) et amino-aromatiques (avec S9mix). Ainsi, les profils mutagènes obtenus permettent d'identifier la présence concomitante de nitro-HAP (réponse directe renforcée avec la souche YG1041) en plus des HAP déjà présumés et dosés par le NIST. Comme déjà relevé pour les teneurs en endotoxines, la granulométrie des particules influence la réponse mutagène qui est renforcée pour la fraction de faible granulométrie (PM₁₀).

L'absence de réponse vis-à-vis de la souche TA102, sensible notamment aux composés pro-oxydants, suggère que le potentiel oxydant des particules, évalué par la déplétion en DTT et attribué principalement aux HAP, n'est toutefois pas suffisant pour induire un effet mutagène significatif.

En conclusion, les extraits organiques obtenus à partir des poussières montrent un effet mutagène, en accord avec la présence de divers HAP décrite par le NIST, mais aussi probablement de nitro-HAP. Ces derniers ne sont pas intégrés dans l'analyse quantitative effectuée par cet organisme (cf. chapitre 6.1). Certains de ces composés étant connus pour leurs propriétés génotoxiques et cancérogènes, l'exposition répétée et/ou prolongée à ces particules pourrait avoir des effets délétères sur le long terme. C'est pourquoi, après avoir complété la caractérisation des particules, l'essentiel du travail mené durant cette thèse a porté sur un scénario d'étude le plus proche possible des conditions physiologiques, en utilisant un modèle cellulaire trachéo-bronchique humain différencié fonctionnel associé à des particules de granulométrie PM₁₀, compatible avec une déposition à cet étage du tractus respiratoire. Le protocole d'exposition retenu (nébulisation à l'IAL) respecte l'ouverture vers l'extérieur des voies aériennes et les expositions ont été répétées et cumulées en choisissant l'une des doses comme compatible avec les niveaux de déposition réels décrits dans la littérature.

4. Caractérisation du pseudo-épithélium

4.1. Différenciation des cellules NHBE sur inserts

Les cellules NHBE cultivées à l'IAL se différencient en trois types cellulaires : cellules ciliées, cellules à mucus et cellules basales ce qui les rapprochent d'un épithélium physiologique. Le temps nécessaire à la prolifération puis à la différenciation de ces cellules est de trois semaines, ce qui représente une contrainte expérimentale. La différenciation cellulaire a été mise en évidence à l'aide de la microscopie optique par une coloration Hématoxyline-Eosine (H&E) et Bleu alcian (Figure 20). Dès la première semaine à l'IAL, nous pouvons observer la sécrétion de mucus à l'aide du microscope inversé. Cette sécrétion est également mise en évidence par coloration spécifique après 2 semaines de différenciation à l'IAL. L'apparition des battements

ciliaires est visualisable sur les enregistrements vidéo à partir de la deuxième semaine de culture sur inserts. L'efficacité de la fonction ciliaire a été évaluée (cf. chapitre 5.5) ainsi que la production de mucus (cf. chapitre 5.4).

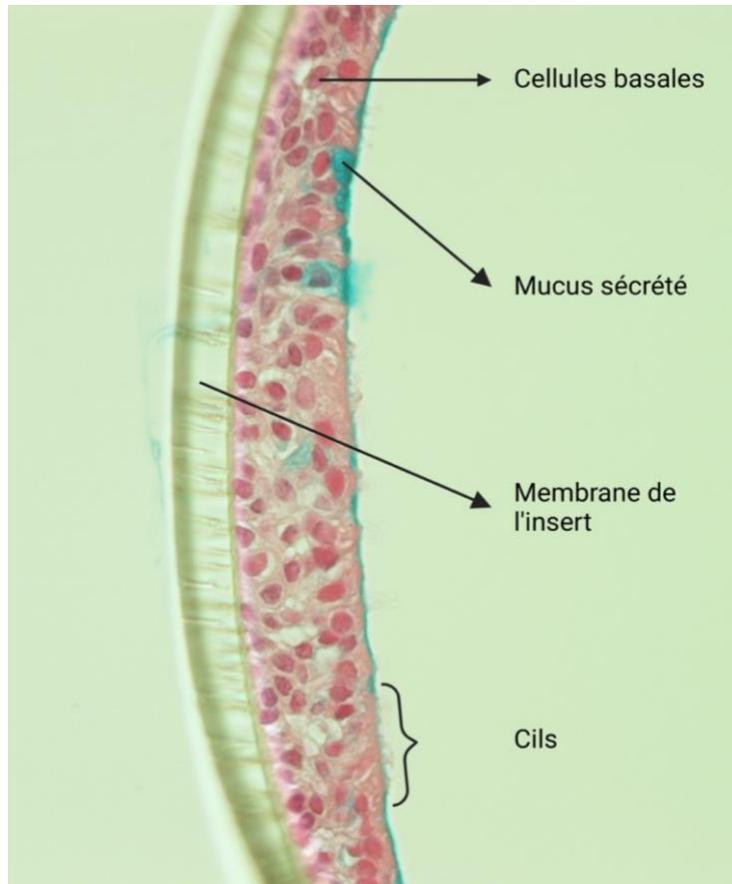


Figure 20. Analyse par microscopie optique de cellules NHBE différenciées après 2 semaines de culture à l'IAL. Coloration H&E et Bleu alcian (mise en évidence du mucus). Grossissement x40.

4.2. Intégrité du tapis cellulaire

L'épithélium des voies aériennes sert de barrière physique entre l'environnement extérieur et le milieu intérieur de l'organisme. L'intégrité de l'épithélium des voies respiratoires est maintenue par des jonctions serrées, des jonctions adhérentes, des jonctions lacunaires et des desmosomes, qui relient les cellules voisines les unes aux autres. Ce système de jonctions tisse étroitement l'épithélium des voies respiratoires pour créer une barrière physique à la migration des particules externes (Lee et al., 2023).

Sur notre modèle cellulaire, la microscopie électronique à balayage (MEB) a permis de mettre en évidence la présence de jonctions serrées (indiquées par des flèche rouge) entre cellules adjacentes après 2 semaines de différenciation à l'IAL (Figure 21).

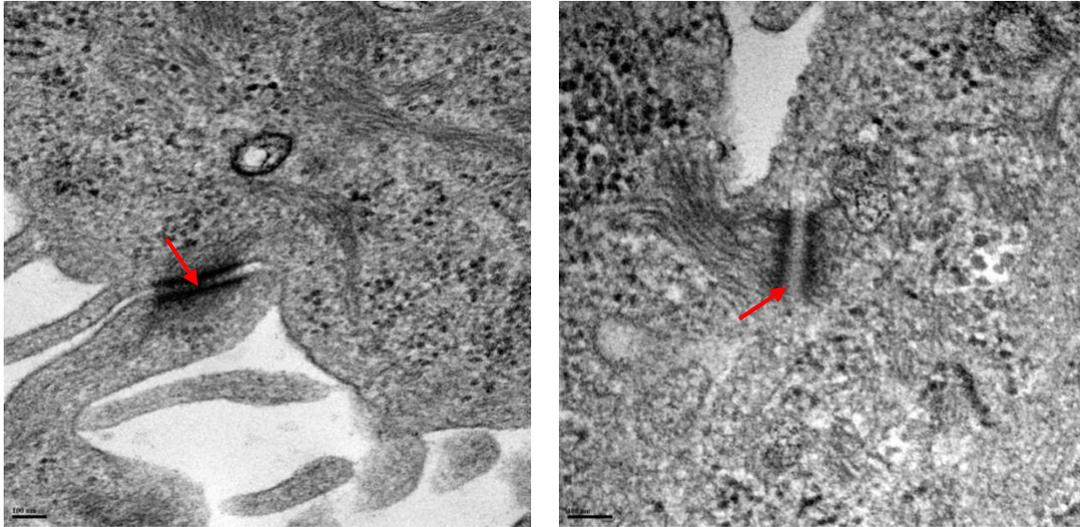


Figure 21. Analyse par MEB des cellules NHBE différenciées après 2 semaines de culture à l'IAL. Identification de jonctions serrées (flèche rouge).

Afin d'évaluer la cohésion du tapis cellulaire, la mesure de la résistance électrique trans-épithéliale (TEER) a été effectuée sur les tapis cellulaires non exposés aux particules (« Témoins IAL »). Les valeurs mesurées s'étalent de 301 à 1598 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ (Figure 22). Une augmentation significative des valeurs de TEER a été observée à J8 et à J11 (valeurs moyennes de 1050 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ et 981 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ respectivement) par rapport à celles mesurées à J2 et J4 (valeurs moyennes de 824 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ et 868 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ respectivement).

La valeur minimale requise pour considérer la barrière épithéliale comme étanche varie selon les auteurs et le modèle cellulaire : 336 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ pour des NHBE différenciées (Nordberg et al., 2020) ou encore 200 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ pour des BEAS-2B (Rossner et al., 2019). Nos valeurs minimales sont donc cohérentes avec celles citées dans la littérature. Sur le modèle NHBE, Nordberg et al. (2020) ont mesuré des valeurs moyennes de 1100 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ avec un maximum pouvant atteindre 3000 $\Omega \cdot \text{cm}^2$. Il faut noter que de multiples facteurs tels que l'épaisseur du tapis cellulaire, l'existence de jonctions serrées, mais aussi la position de l'électrode peuvent influencer les mesures de TEER, expliquant la large gamme de valeurs observées entre différentes études pour les cellules NHBE (Nordberg et al., 2020).

Ces résultats permettent d'attester du développement de jonctions serrées et de l'obtention d'un pseudo-épithélium présentant une bonne cohésion à l'issue de l'étape de différenciation et qui tend à se renforcer tout au long de l'expérience ce qui rapproche structurellement notre modèle de l'épithélium bronchique (Pezzulo et al., 2011).

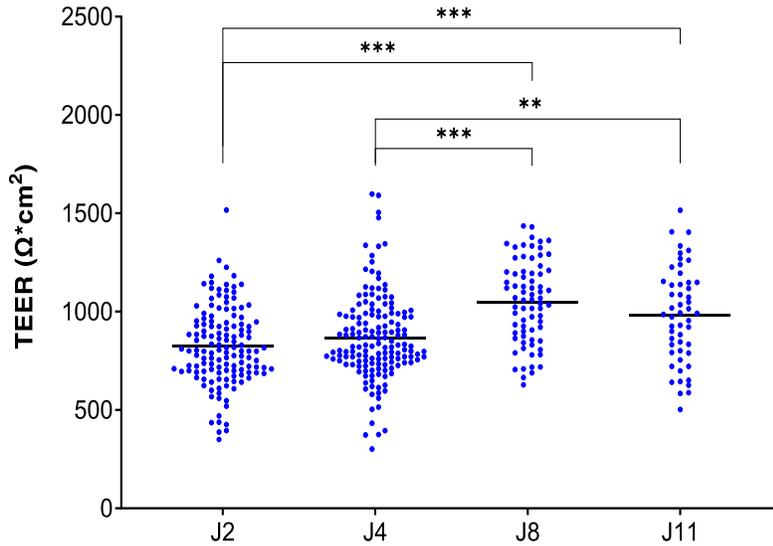


Figure 22. Valeurs du TEER mesuré à J2, J4, J8 et J11 sur des cellules « Témoins IAL ». Les résultats sont exprimés en $\Omega \cdot \text{cm}^2$. Chaque point représente la mesure d'un échantillon. La moyenne est indiquée par une ligne. Le test de Student a été effectué sur les valeurs brutes (** : $p \leq 0,01$; *** : $p \leq 0,001$).

5. Evaluation de la toxicité des PM₁₀ sur le modèle NHBE différencié

5.1. Altérations morphologiques

Les particules dispersées sous forme d'aérosols sont visualisables par MEB à la surface du tapis cellulaire (indiquées par une flèche jaune) et ne semblent pas être internalisées dans notre modèle. Les expositions répétées et cumulées aux PM₁₀ induisent néanmoins une altération morphologique du tapis cellulaire caractérisée par un épithélium présentant une densité plus faible de cils dans certaines zones et/ou des cils plus courts, notamment à la plus forte dose d'exposition (Figure 23). Ces effets peuvent être consécutifs à des phénomènes mécaniques et/ou à une solubilisation partielle de composés chimiques présents sur les particules (Boublil et al., 2013). Ainsi, la capacité des cils à repousser efficacement les particules vers le bord des inserts pourrait être altérée. L'exposition aux PM₁₀ ne modifie pas la viabilité cellulaire, mais une baisse de l'efficacité du battement pourrait néanmoins influencer d'autres marqueurs d'une réponse toxique moins drastique. C'est pourquoi, nous avons tenté d'évaluer cette efficacité en comparant les cinétiques d'évacuation de particules visualisables et colorées vers le bord des inserts (cf. chapitre 5.5).

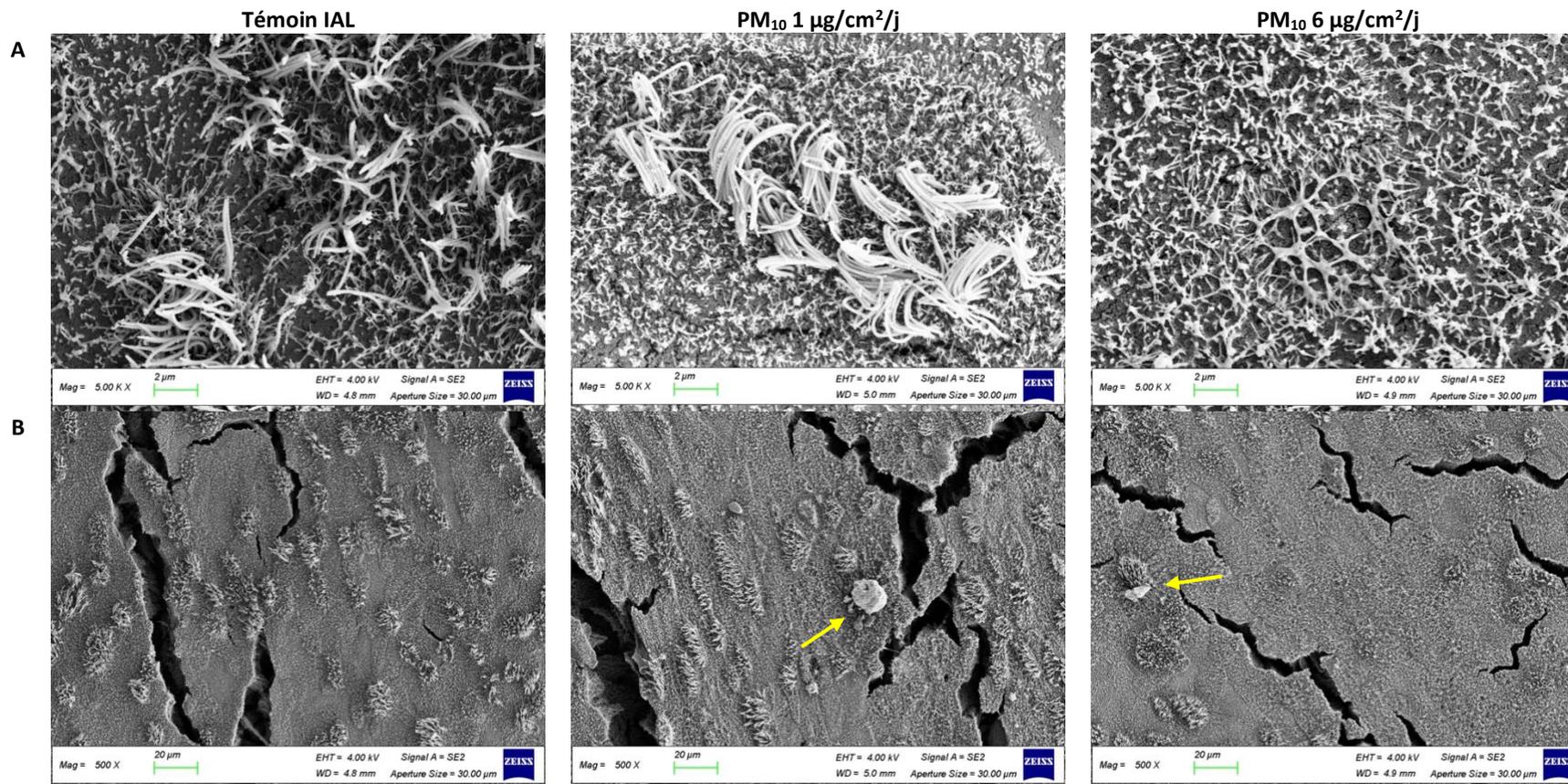


Figure 23. Analyse par MEB de cellules NHBE différenciées cultivées à l'IAL à J4. NHBE « Témoin IAL » (à gauche), NHBE exposées à 1 µg/cm²/j (au centre) et à 6 µg/cm²/j de PM₁₀ pendant 4 jours consécutifs (à droite). Les particules sont indiquées par une flèche jaune. Grossissement : x5000 (A) ; x500 (B).

Nous avons également observé l'aspect de nos pseudo-épithéliums par microscopie optique après une coloration H&E combinée au Bleu alcian (Figure 24). La comparaison des images obtenues sur les coupes d'inserts à J4 et à J11 révèle la présence de zones lacunaires spécifiquement à J11, indépendamment de l'exposition aux particules (Figure 24C et Figure 24D). Cependant, comme il sera présenté par la suite (Figure 26), nous n'avons pas relevé de variations significatives du TEER entre J4 et J11, laissant supposer le maintien d'une barrière fonctionnelle du pseudo-épithélium. Il est possible que ces lacunes soient liées aux contraintes mécaniques, physiques et chimiques induites lors des différentes étapes de préparation automatisée des échantillons pour la coloration, telles que la fixation, l'inclusion en blocs de paraffine, la découpe au microtome. Ces aspects lacunaires ont également été rapportés par Rayner et al. (2019) sur les cellules NHBE cultivées à l'IAL.

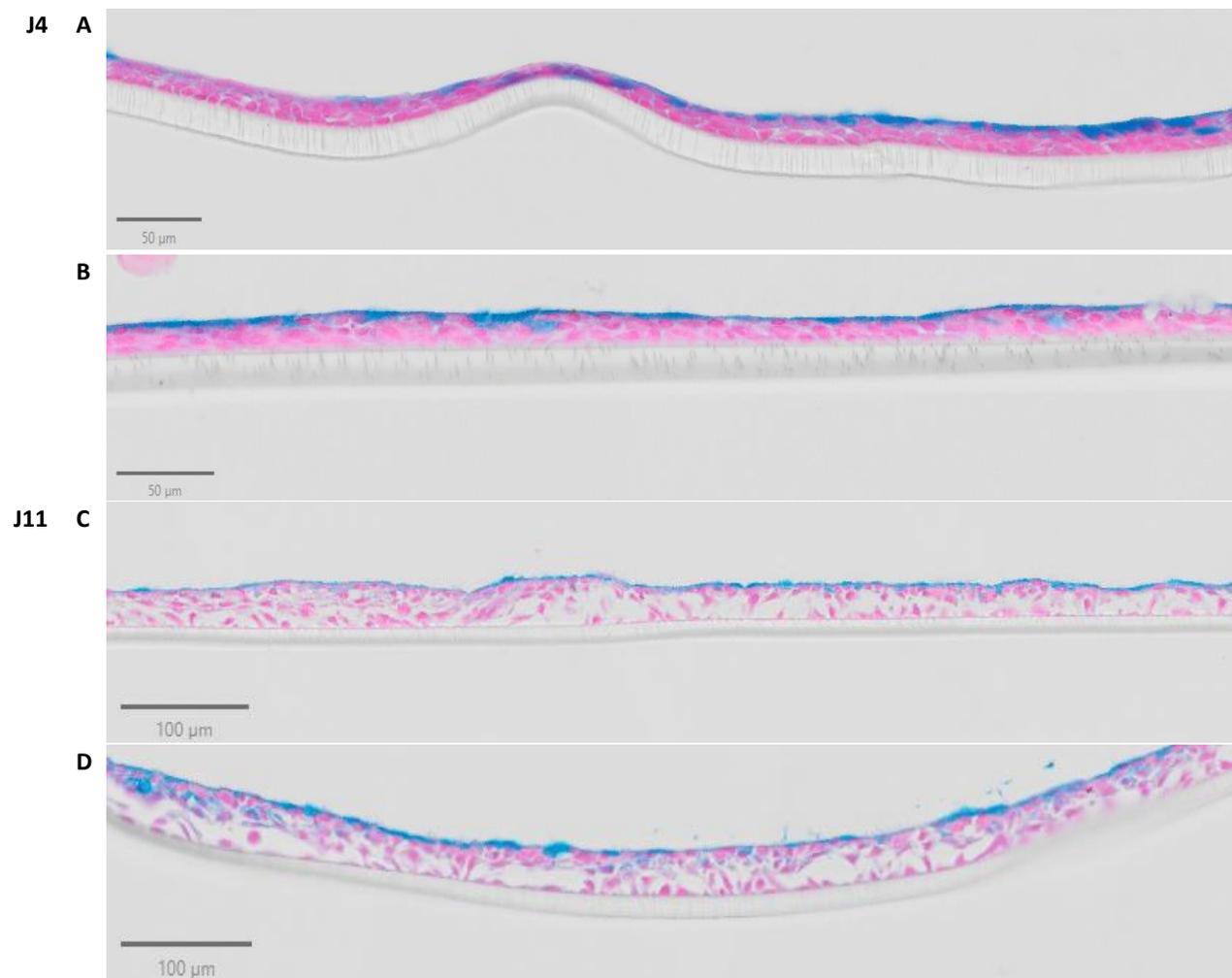


Figure 24. Analyse par microscopie optique de cellules NHBE différenciées après culture à l'IAL à J4 (A) et (B) et à J11 (C) et (D). Coloration H&E et Bleu alcian.

NHBE « Témoin IAL » (A) et (C) ; NHBE exposées à $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{j}$ de PM_{10} pendant 4 jours consécutifs (B) et (D).

Les images obtenues par microscope électronique à transmission (MET) n'ont pas permis de mettre en évidence l'internalisation de PM_{10} après 4 expositions répétées et cumulées. Ces images tendent également à montrer une accentuation des zones lacunaires à J11 (indiquées par une flèche bleue) dans les couches plus profondes du tapis cellulaire par rapport à J4, y compris pour les cellules non exposées (Figure 25B, gauche).

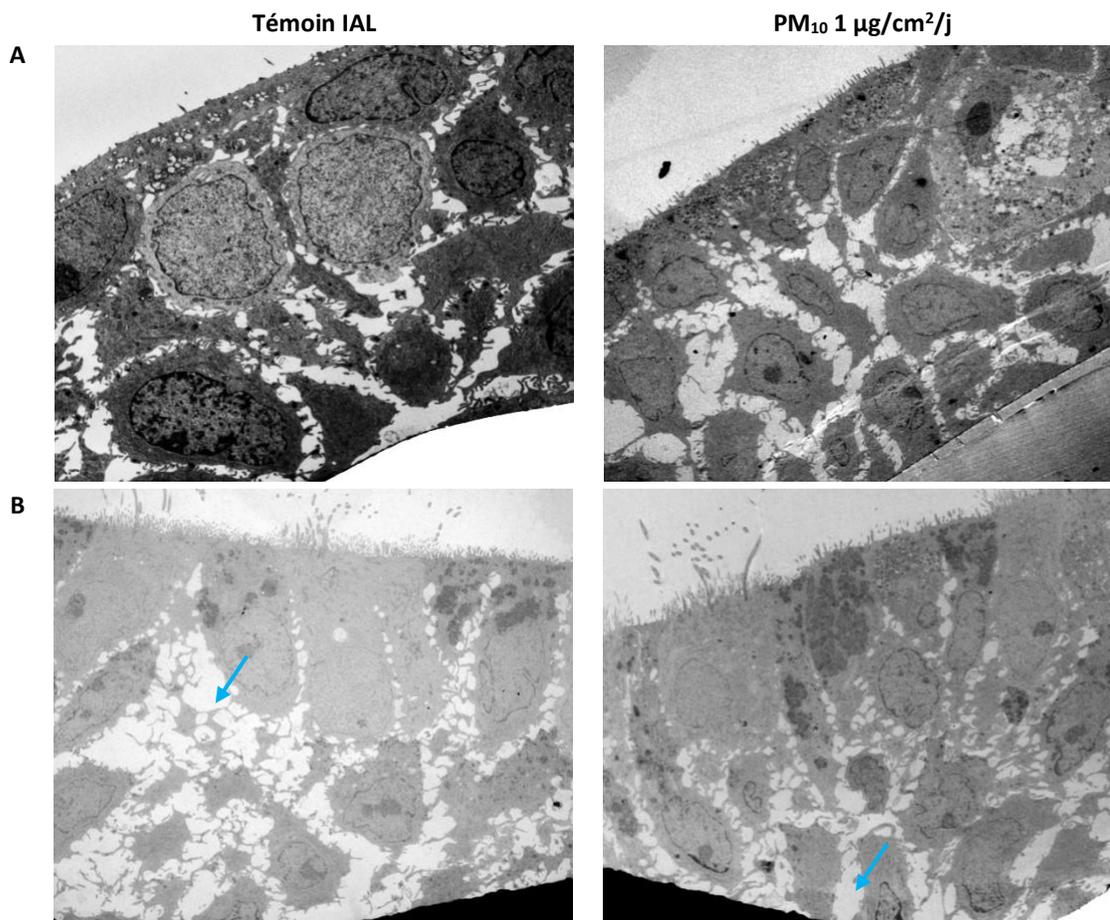


Figure 25. Analyse par MET de cellules NHBE différenciées cultivées à l'IAL à J4 (A) et à J11 (B). NHBE « Témoin IAL » (à gauche) et NHBE exposées à $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{j}$ de PM_{10} pendant 4 jours consécutifs (à droite). Les zones lacunaires sont indiquées par une flèche bleue.

Nordberg et al. (2020) ont aussi observé, aussi bien en microscopie optique qu'en MET, des modifications structurales du tapis cellulaire des NHBE après 24 h d'exposition à des particules de l'air intérieur. Ces altérations comprenaient un relâchement des espaces intercellulaires et la présence de vacuoles avec des signes de cytololyse. Les valeurs de TEER n'étaient toutefois pas significativement modifiées, comparées aux témoins. Ces auteurs ont démontré que le mode de culture des cellules NHBE peut aussi engendrer des lacunes dans le tapis cellulaire sans pour autant qu'il y ait de modification de la fonction de barrière.

5.2. Mesure du TEER

Le TEER reflète l'état global du pseudo-épithélium reconstitué. C'est une technique non invasive, qui ne nécessite pas une destruction du tapis cellulaire et permet donc de suivre l'état et l'évolution de chaque insert au cours de l'exposition et en post-exposition. Les mesures de TEER ont été effectuées à J2, J4, J8 et J11 afin d'étudier les effets de la nébulisation répétées des PM₁₀.

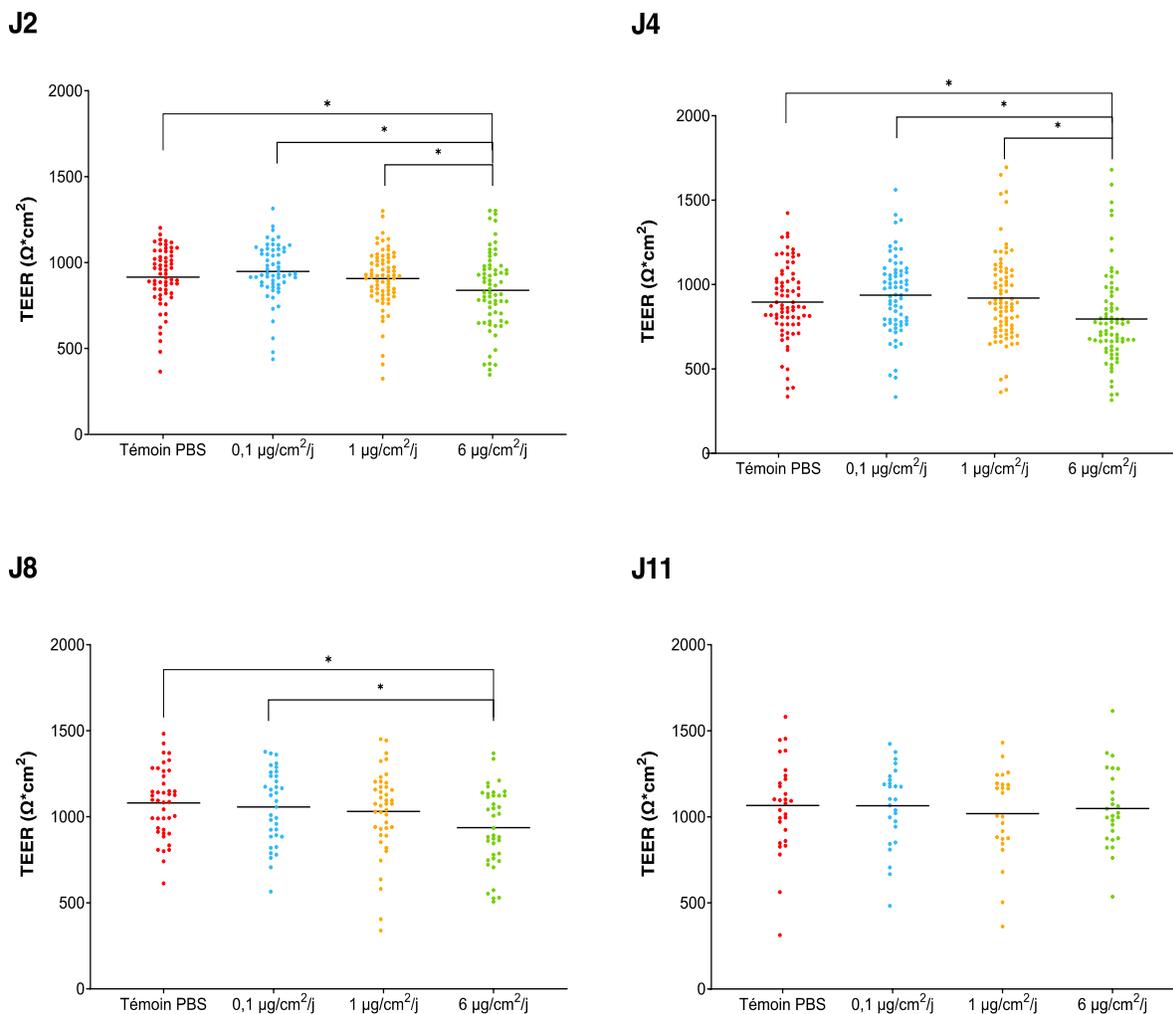


Figure 26. Valeurs du TEER ($\Omega \cdot \text{cm}^2$) mesurées à J2, J4, J8 et J11 sur le tapis cellulaire du groupe « Témoin PBS » et des cellules exposées aux PM₁₀ à 0,1 ; 1 et 6 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{j}$.

Chaque point représente la mesure d'un échantillon, la moyenne est indiquée par une ligne horizontale.
Le test de Student a été effectué sur l'ensemble des valeurs (*: $p \leq 0,05$).

Les valeurs de TEER mesurées varient de 325 à 1516 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ à J2, de 301 à 1680 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ à

J4, de 399 à 1483 $\Omega\cdot\text{cm}^2$ à J8 et de 313 à 1616 $\Omega\cdot\text{cm}^2$ à J11 (Figure 26). Ces valeurs sont toutes supérieures à la valeur de référence admise par différents auteurs pour considérer que le tapis cellulaire n'est pas altéré (Nordberg et al., 2020; Rossner et al., 2019) (cf. chapitre 4.2).

Les valeurs moyennes obtenues à J2 et J4 se situent entre 796 et 949 $\Omega\cdot\text{cm}^2$ tandis que celles obtenues à J8 et J11 sont majorées puisque situées dans une fourchette de 937 à 1081 $\Omega\cdot\text{cm}^2$ (Figure 26), indiquant que la cohésion globale du tapis cellulaire tend à se renforcer avec le temps. Une baisse significative des valeurs de TEER a été néanmoins observée à la plus forte dose d'exposition (6 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{j}$) à J2, J4 et J8 par rapport aux conditions « Témoin PBS » n'ayant reçu que du PBS nébulisé, mais aussi par rapport aux 2 plus faibles doses. En revanche, il n'y a plus de différences à J11, signifiant que le tapis cellulaire a récupéré un niveau de cohésion comparable dans toutes les conditions (Figure 26). Au contraire, le Triton (1 % pendant 30 min) qui est un tensioactif, induit une perte rapide de cette cohésion comme le laisse apparaître l'effondrement du TEER avec des valeurs situées entre -50 et 100 $\Omega\cdot\text{cm}^2$.

5.3. Viabilité cellulaire

L'effet des PM_{10} sur la viabilité cellulaire a été évalué après 4 jours consécutifs d'exposition (J4) et en post-exposition (J8 et J11) pour trois concentrations journalières de PM_{10} (0,1 ; 1 et 6 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{j}$), en évaluant l'activité enzymatique mitochondriale (test à la Résazurine). Elle est estimée en comparant chaque échantillon traité à un échantillon « Témoin PBS ». Le Triton à 1 % est utilisé comme témoin positif.

Les résultats obtenus montrent que l'exposition cumulée aux PM_{10} n'a induit aucune modification significative de la viabilité cellulaire globale, même pour la concentration cumulée la plus élevée (24 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$), que ce soit après la dernière exposition (à J4) ou de manière différée en post-exposition (à J8 et J11). La diminution drastique de la viabilité observée après 1 h d'exposition au Triton à 1 % permet de valider cette technique (Figure 27).

Par ailleurs, l'absence de réponses avec la dose journalière la plus faible (0,1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{j}$), sur les premières séries d'exposition, nous a amené à ne plus l'utiliser par la suite afin de privilégier l'usage des inserts pour la dose d'intérêt (1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{j}$) et la dose plus élevée (6 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{j}$) susceptibles d'induire une réponse cellulaire.

Par comparaison, nous avons observé avec le modèle non différencié en conditions immergées une baisse modérée mais significative de la viabilité cellulaire après 72 h d'exposition en immergé à des concentrations de 44 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (qui correspond au cumul des 4 expositions à 1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) et de 110 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (qui correspond à l'exposition journalière à 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ que nous pensions atteindre initialement).

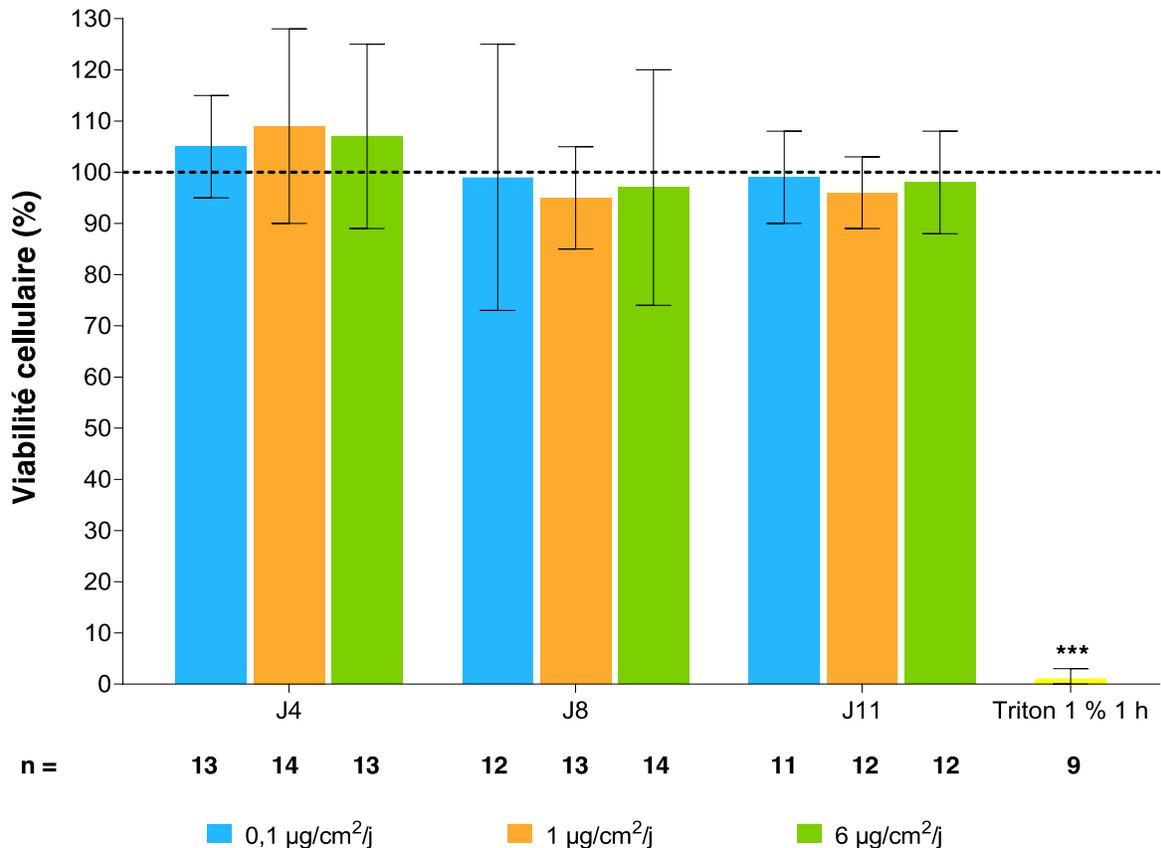


Figure 27. Viabilité des cellules NHBE différenciées après 4 jours d'exposition consécutifs (J4) aux PM_{10} à 0,1 ; 1 et 6 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{j}$ et jusqu'à 7 jours post-exposition (J8 et J11). Témoin positif : Triton (1 %, 1 h).

Les résultats sont exprimés en % moyen par rapport au groupe « Témoins PBS » \pm écart type.

Le test ANOVA bidirectionnel a été effectué sur les moyennes, suivi par le test de Dunnett pour les comparaisons multiples (***) : $p \leq 0,001$. n = nombre de réplicats pour chaque condition.

L'absence d'effets sur la viabilité dans le modèle différencié peut être justifiée notamment par la sécrétion de mucus dans lequel les particules peuvent se trouver piégées, limitant ainsi l'exposition directe de la surface cellulaire et l'éventuelle pénétration dans les cellules. D'autre part, la présence de cellules ciliées dotées de battements fonctionnels permet d'évacuer vers la périphérie de l'insert les particules non piégées, ainsi que probablement une fraction du mucus excrété. Les effets combinés du mucus et des battements ciliaires confèrent ainsi aux cellules une barrière de protection et rapprochent notre modèle des conditions physiologiques (Boublil et al., 2013). Il est également envisageable que, malgré la diversité et la toxicité potentielle des composés retrouvés à la surface des particules, ceux-ci ne soient présents qu'en concentrations trop faibles pour exercer un effet sur la viabilité et/ou faiblement biodisponibles car fortement liés aux particules.

5.4. Sécrétion du mucus et expression des mucines

Les mucines jouent un rôle primordial dans le mécanisme de clairance muco-ciliaire, contribuant à l'élimination des particules et atténuant leurs effets toxiques. De nombreuses pathologies respiratoires s'accompagnent, en tant que causes ou conséquences, de modifications de leur sécrétion. Ces mucines peuvent être suivies en quantifiant leur sécrétion et/ou leur niveau d'expression génique (Lee et al., 2023; Lee et al., 2022; Okuda et al., 2019; Rayner et al., 2019).

La production de mucus a été estimée par le dosage globale des mucines par la méthode ELLA (Epithelix, 2021) (Annexe 5) réalisée sur le lysat cellulaire obtenu après récupération des tapis cellulaires. La concentration est ensuite normée par rapport à la concentration totale de protéines dans l'échantillon afin de prendre en compte les variations de quantités de cellules entre les inserts. Les données sont finalement exprimées par le ratio calculé entre les échantillons exposés et les échantillons « Témoins PBS » issus de la même série d'exposition et au même jour d'analyse (J4, J8 ou J11) (Figure 28).

Il convient de noter que pour la maintenance des cultures sur un plus long terme, des rinçages intermédiaires sont effectués à J4 et J8 afin d'éviter une « asphyxie » des cultures. Ainsi, les inserts conservés sur 8 et 11 jours post-traitement subiront respectivement 1 et 2 rinçage(s) intermédiaires, contrairement aux inserts analysés à J4. C'est pourquoi nous avons comparé l'effet de la concentration en PM₁₀ à un temps donné plutôt que sous un aspect cinétique.

Les résultats ne montrent pas de modification significative de la sécrétion de mucus consécutivement aux expositions aux PM₁₀, par rapport aux conditions « Témoin PBS ». Une tendance à l'augmentation est toutefois systématiquement observée lorsque la dose d'exposition augmente, qui atteint la limite de significativité à J11 ($p = 0,057$). L'interprétation de nos données est limitée par la variabilité entre les inserts inhérente au modèle ainsi que par le nombre limité de cycles d'expositions réalisés. Mais la tendance observée en lien avec la dose d'exposition suggère néanmoins que des expositions répétées et prolongées aux PM₁₀ pourraient à terme avoir un impact sur la production de mucus.

En parallèle de ces mesures globales de mucines, une analyse de l'expression génique de MUC5AC et MUC5B a été réalisée par RT-qPCR. Etant donné que les variations des taux d'ARN_m peuvent être éphémères, les analyses ont été réalisées exclusivement à J4, immédiatement après la dernière exposition. Les résultats sont normalisés par rapport à un gène de ménage, le glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) et exprimés à l'aide de la méthode $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Figure 29).

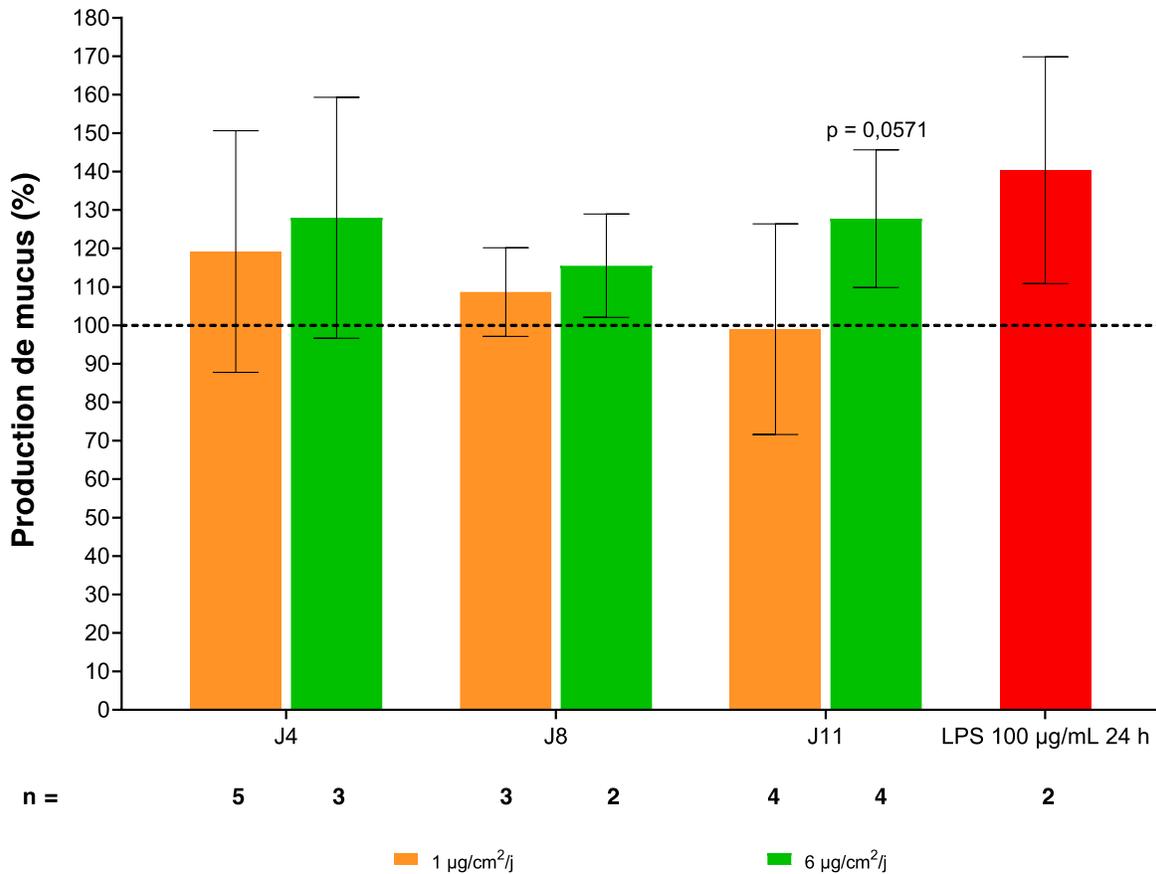


Figure 28. Évaluation de la production du mucus par les NHBE différenciées après 4 jours consécutifs d'exposition (J4) aux PM_{10} à 1 et 6 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{j}$, puis en post-traitement à J8 et J11. Témoin positif : LPS (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 24 h). Les résultats sont exprimés en % moyen par rapport au « Témoin PBS » \pm écart type. Le test non paramétrique Wilcoxon-Mann-Whitney a été effectué sur les données brutes (μg de mucines/mg de protéines) pour effectuer les comparaisons à chaque jour d'analyse. n = nombre d'inserts testés pour chaque condition.

Aucune modification significative de l'expression de ces deux gènes n'a été observée après exposition aux PM_{10} , que ce soit par rapport au groupe « Témoin PBS » ou bien entre les doses testées. La tendance à l'augmentation de la sécrétion globale de mucus n'impliquerait donc pas une augmentation spécifique de MUC5AC et MUC5B, mais potentiellement d'autres mucines. Ces résultats restent à interpréter avec prudence.

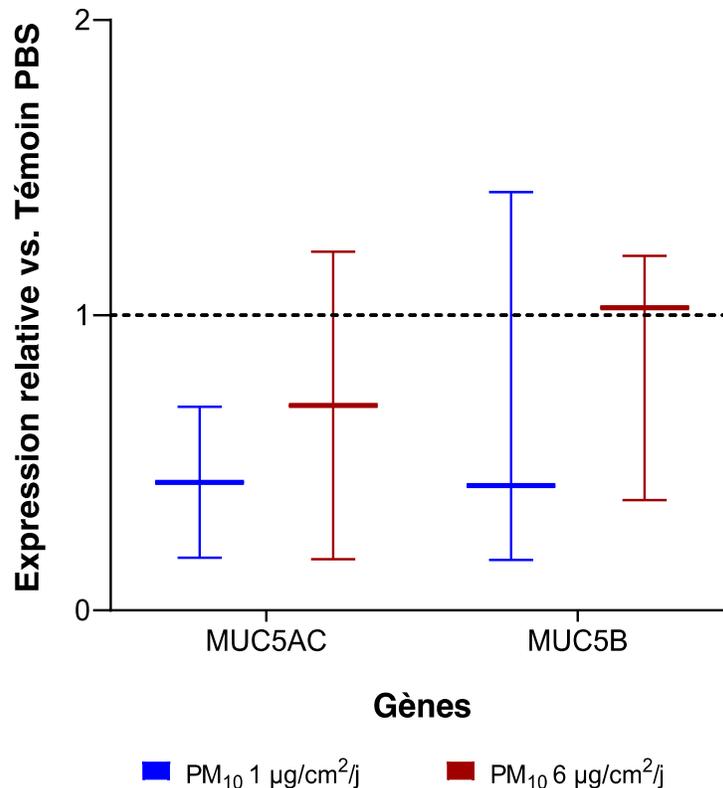


Figure 29. Expression par rapport aux conditions « Témoin PBS » après 4 jours d'exposition répétée (à J4) des cellules NHBE différenciées aux PM₁₀ à 1 et 6 µg/cm²/j.

Les résultats sont normalisés par rapport à GAPDH et analysés par la méthode $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Le test ANOVA unidirectionnel a été effectué sur les données brutes, suivi par le test de Newman-Keuls pour les comparaisons multiples. n = 2-3 analyses indépendantes sur un échantillon représentatif de 6 insert.

Dans les voies respiratoires saines, la sécrétion de MUC5B est prédominante à l'exception des bronchioles terminales (Okuda et al., 2019; Rogers, 2003; Widdicombe & Wine, 2015). Alors que MUC5B est essentiel pour assurer la clairance muco-ciliaire, MUC5AC est une « mucine de réponse », dont l'expression est régulée durant le stress des voies respiratoires par la réponse inflammatoire (Okuda et al., 2019). Une expression accrue de MUC5AC est souvent associée à des maladies respiratoires. Une surexpression et une production accrue de MUC5A a été observée dans les cellules trachéo-bronchiques humaines saines cultivées à l'IAL dans le milieu de différenciation PneumaCult-ALI (Okuda et al., 2019).

Bien que MUC5AC et MUC5B soient principalement sécrétées dans les poumons, elles ne reflètent pas le niveau global de mucus produit car d'autres mucines sont également produites. La composition du mucus, en particulier le rapport entre les mucines sécrétées majeures (MUC5AC/MUC5B) est un déterminant crucial des propriétés biophysiques de la couche de mucus dont la viscoélasticité. MUC5AC forme un réseau plus ramifié et réticulé, contrairement à MUC5B qui établit des structures plus linéaires et moins enchevêtrées (Lee et al., 2022).

Les caractéristiques individuelles du donneur, notamment son état de santé passé, ses antécédents de maladies et de tabagisme, auront également une influence sur les propriétés de la couche de mucus (Lee et al., 2022).

5.5. Battement ciliaire

Le laboratoire n'étant pas équipé de dispositifs permettant de mesurer la fréquence et/ou l'amplitude du battement ciliaire à proprement parler, nous avons tenté d'évaluer la capacité du mouvement ciliaire à évacuer les particules vers la périphérie des inserts.

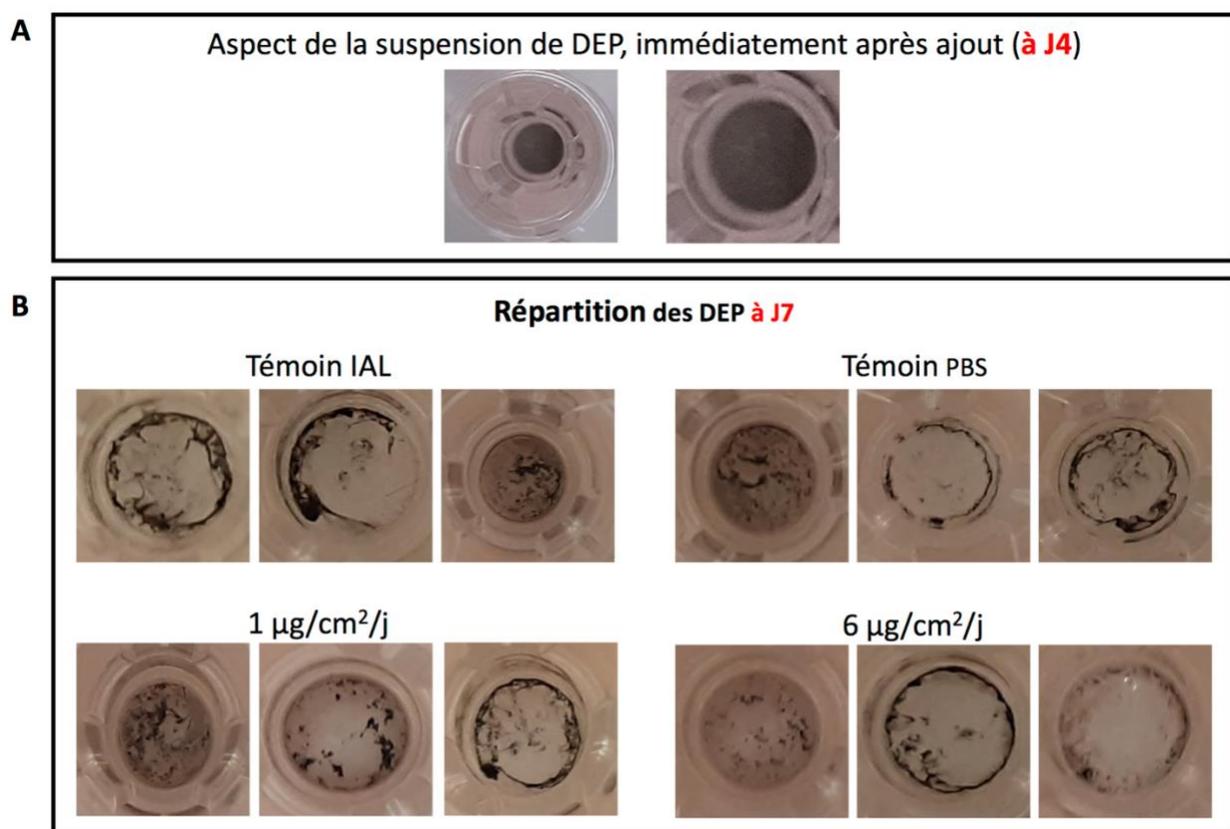


Figure 30. Évaluation de la fonction ciliaire (à J7) visualisable par l'ajout de particules DEP à J4. De J1 à J4, le pseudo-épithélium a préalablement été laissé à l'air (groupe « Témoïn IAL ») ou exposé au PBS (groupe « Témoïn PBS ») ou aux PM_{10} (4 expositions à 1 et 6 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{j}$).

Toutefois, les PM_{10} n'étant pas visibles à l'œil nu ni au microscope inversé, il n'a pas été possible d'observer directement leur migration. Nous avons donc ajouté à J4 un « traceur coloré » sous la forme d'une suspension de particules de diesel noires sur les tapis cellulaires et suivi leur mouvement. Immédiatement après leur ajout en apical des inserts, les particules DEP étaient visibles à l'œil nu sous forme d'un dépôt de couleur grise homogène (Figure 30A). Trois

jours plus tard (J7), les particules DEP apparaissent majoritairement en périphérie des inserts, plus ou moins agrégées sur ce qui correspondrait à des filaments de mucus. L'exposition préalable aux PM₁₀ ne semble pas avoir notablement modifié l'efficacité du battement ciliaire, même si certaine variabilité entre les triplicatas d'une même condition a été observée (Figure 30B).

Cette approche va être affinée en utilisant un microscope asservi à un enceinte thermostatée et dont les prises de vue peuvent être programmées à intervalles de temps réguliers. Il est à noter que les battements ciliaires restaient toutefois toujours bien visibles au microscope à J7 et même plusieurs jours après cette analyse ce qui témoigne de la robustesse de ce modèle cellulaire. Des analyses supplémentaires vont donc être réalisées d'une part pour affiner la cinétique d'observation et d'autre part en utilisant un inhibiteur de la fonction ciliaire qui permettra de vérifier que la migration des particules n'est pas simplement liée à leur diffusion dans le fin film liquidien présent à la surface du tapis cellulaire.

5.6. Evaluation de la réponse cellulaire pro-oxydante

La capacité des PM₁₀ à induire une réponse cellulaire pro-oxydante a été étudiée par l'utilisation d'un dérivé réduit de la fluorescéine, le DCFDA, qui est capable de pénétrer dans les cellules. Le composé obtenu après déacétylation par des estérases cellulaires, le DCF, émettra une fluorescence proportionnelle au taux d'ERO. Les analyses ont été réalisées à J4 juste après les expositions répétées et en post-traitement à J8 et J11 (Figure 31). La fluorescence de chaque échantillon exposé aux PM₁₀ est comparée à celle mesurée dans le groupe « Témoin PBS » de la même série d'exposition et au même jour d'analyse. La Pyocyanine (450 µM, 30 min) a servi de témoin positif.

A J4, les résultats ont montré une augmentation significative de la fluorescence uniquement pour la concentration intermédiaire de particules (1 µg/cm²/j), sans effet-dose associée. Cet effet est transitoire puisque l'étude cinétique indique un retour à une situation identique à celle des conditions témoins à J8 et J11. Pour le témoin positif, une augmentation significative de 64 % de la fluorescence a été observée.

Diverses études réalisées sur des polluants particulaires aériens d'origines variées ont rapporté l'induction d'effets pro-oxydants se traduisant par l'augmentation des ERO, la modification des activités ainsi que des expressions géniques ou protéiques d'enzymes anti-oxydantes (glutathion peroxydase (GPx), superoxyde dismutase (SOD), catalase (CAT)) ou encore par des altérations cellulaires (adduits à l'ADN type 8-oxodGuo et protéines oxydées) (Ekstrand-Hammarström et al., 2013 ; Leclercq et al., 2016; Liu et al., 2016). Dans notre étude, la production cellulaire d'ERO apparait limitée à la fois en amplitude et dans le temps. L'absence d'effet significatif à J4 avec la plus forte dose nous amène à considérer ces données avec

précaution. Il faut ici rappeler que ces PM₁₀ ont montré, en milieu acellulaire, une capacité intrinsèque limitée à produire des ERO (El Hajjar et al., 2022) (cf.chapitre 1.3). Le piégeage d'une partie des particules dans la couche de mucus, qui possède des propriétés anti-oxydantes, contribue sans doute également à limiter la réponse cellulaire pro-oxydante.

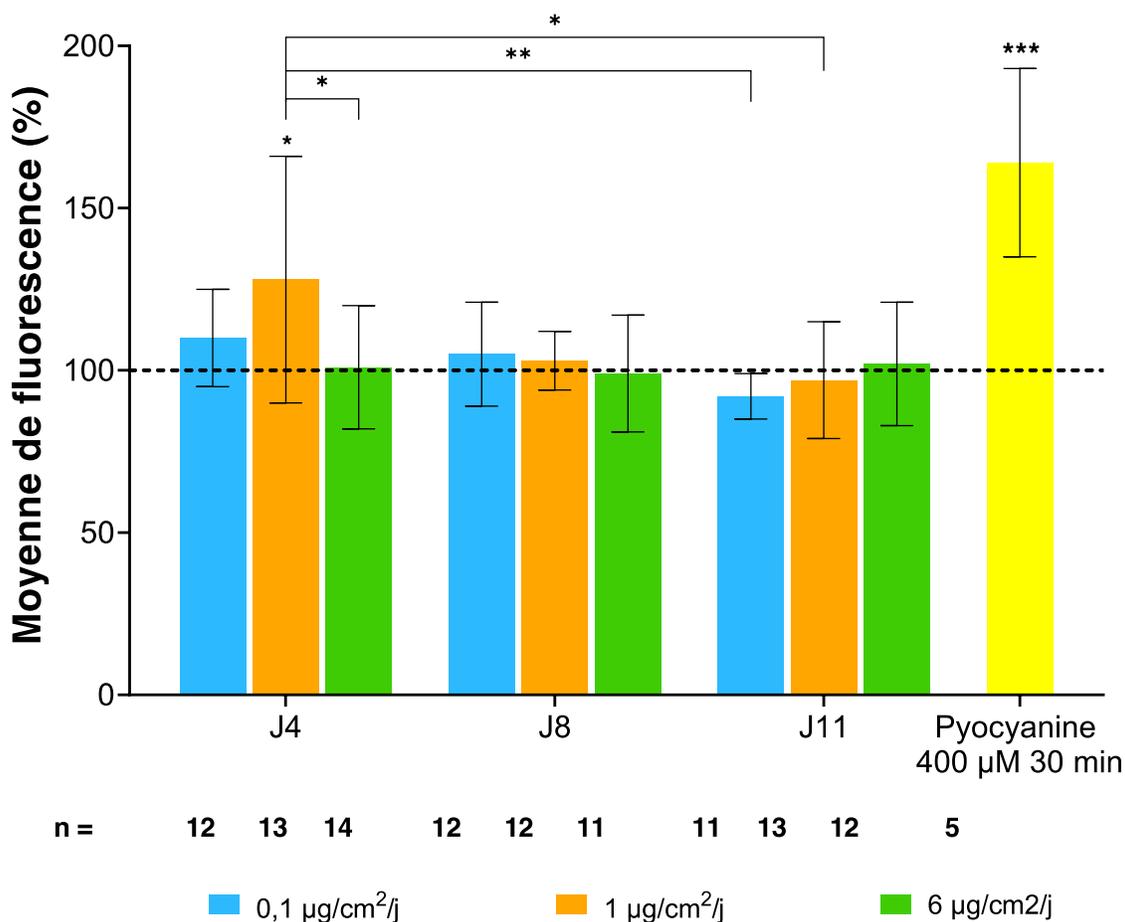


Figure 31. Production d'ERO par les cellules NHBE différenciées après 4 jours d'expositions consécutives aux PM₁₀ (0,1 ; 1 et 6 µg/cm²/j) à J4, J8 et J11. Témoin positif : Pyocyanine (450 µM, 30 min).

Les résultats sont exprimés en % moyen des échantillons exposés par rapport aux « Témoins PB » ± écart type. Le test ANOVA bidirectionnel a été effectué sur les moyennes, suivi par le test de Dunnett pour les comparaisons multiples (*: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$). n = nombre d'inserts testés pour chaque condition.

Nous avons également évalué l'expression d'un panel de 82 gènes impliqués dans la réponse cellulaire pro-oxydante (kit « RT² Profiler™ PCR Array Human Oxidative Stress Pathway Plus », Qiagen). Les expositions ont été réalisées à 1 et 6 µg/cm²/j. La production d'ERO n'étant apparue modulée qu'à une temporalité proche de l'exposition, l'analyse de l'expression génique n'a été effectuée qu'à J4. Les résultats obtenus par RT-qPCR ont été analysés via la plateforme dédiée du fournisseur (GeneGlobe Data Analysis Center, Qiagen). Les données présentées résultent, pour chaque condition, de deux analyses réalisées indépendamment sur un même

échantillon intégrant six inserts (doublons issus de 3 séries d'expositions indépendantes). Les gènes dont l'expression a été significativement modulée (facteur ≥ 2) sont répertoriés dans le Tableau 10 et signalés en **gras**.

Le gène codant pour la SELENOP est surexprimé d'un facteur moyen de 6,83 après expositions à $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{j}$, mais n'est pas modifié à la plus forte dose. Toutefois, cette surexpression n'est retrouvée que dans une des deux analyses réalisées indépendamment, ce qui limite la véracité de cet effet. La SELENOP est une protéine ayant des propriétés anti-oxydantes et participe à la défense contre les dommages oxydatifs et à la modulation de la réponse inflammatoire. Sa surexpression reste néanmoins cohérente avec les réponses obtenues avec les autres biomarqueurs.

L'exposition à $6 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{j}$ de PM_{10} a induit une légère augmentation (+ 2,06) de l'expression du gène CYBB, qui code pour une protéine de l'enzyme NADPH oxydase, impliquée dans la production d'ERO.

Le gène GPX3 est également surexprimé après exposition aux PM_{10} mais aussi consécutivement à la nébulisation de PBS. De plus, le niveau de surexpression reste quasi constant, ce qui laisse suggérer un effet lié à la nébulisation et non pas spécifiquement aux PM_{10} . Le gène GPX3 code pour une enzyme qui transforme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en eau et en O_2 en utilisant le glutathion réduit (GSH).

Au contraire, les gènes MT3 et PRDX1 sont sous-exprimés (-3,01 et -2,05 respectivement). Le gène PRDX1 code pour une enzyme d'action équivalente au GPX3 tandis que le gène MT3 code pour une enzyme impliquée dans la détoxification des métaux, en particulier le Zinc. Cette enzyme est toutefois décrite comme principalement exprimée dans les tissus cérébraux.

Tableau 10. Modulation de l'expression de gènes (Fold Regulation) impliqués dans la réponse cellulaire au stress oxydant après exposition des cellules NHBE aux PM_{10} (1 et $6 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{j}$). Mesures effectuées par RT-qPCR (kit « Human Oxidative Stress Plus PCR Array », Qiagen). $n = 2$ analyses indépendantes.

Nom du gène	Symbole du gène	Témoin PBS vs. Témoin IAL	PM_{10} $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{j}$ vs. Témoin PBS	PM_{10} $6 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{j}$ vs. Témoin PBS
Sélénoprotéine P	SELENOP	-1.13	6,83	-1.32
Cytochrome b-245, bêta polypeptide	CYBB	-1,37	1,17	2.06
Métallothionéine 3	MT3	-1,00	-1,32	-3.01
Péroxiredoxine 1	PRDX1	1,04	-1,06	-2.05
Glutathion peroxydase 3 (plasma)	GPX3	2,28	2,33	2.15

Cette seconde approche montre qu'un nombre très limité de gènes impliqué dans la réponse oxydative a été modulé. Parmi eux, 3 gènes (CYBB, MT3 et PDRX1) présentaient des modulations dose-dépendant devenant significatif à la plus forte dose testée. En effet, certains gènes, comme CYBB, favorisent le stress oxydatif. À l'inverse, des gènes tels que MT3, PRDX et GPX3, codant pour des systèmes de détoxification, tendent plutôt à être réprimés, ce qui pourrait accentuer les effets pro-oxydants. L'induction de protéines anti-oxydantes (SELENOP) indique également une réponse à un stress oxydatif.

Les 2 approches utilisées pour évaluer la réponse pro-oxydante cellulaire sont cohérentes dans leurs conclusions et suggèrent que les PM₁₀ ont une capacité restreinte et temporaire à induire du stress oxydatif dans notre modèle représentatif d'un pseudo-épithélium respiratoire.

5.7. Evaluation de la réponse inflammatoire

Après expositions répétées aux PM₁₀, cinq cytokines (IL-1 β , TNF- α , MCP-1 ou CCL-2, IL-6 et IL-8) ont été dosées dans les milieux de culture récupérés en partie basale des inserts à J4, J8 et J11 (Figure 32). Ce choix repose sur une précédente étude menée au laboratoire sur le même modèle cellulaire différencié. Parmi les 13 cytokines dosées alors, seuls le MCP-1 et l'IL-8 avaient présenté des modulations de leur production après exposition à des polluants particulaires. IL-1 β , TNF- α et IL-6 sont les cytokines les plus fréquemment retrouvées dans la littérature pour étudier la réponse inflammatoire au niveau pulmonaire.

Le TNF- α et l'IL-1 β n'ont pas été détectés dans les milieux de culture analysés. Les concentrations mesurées pour l'IL-6 se situaient entre 40 à 186 pg/mL (Figure 32A), celles du MCP-1 entre 138 à 684 pg/mL (Figure 32B) et celles de l'IL-8 entre 815 et 15 254 pg/mL (Figure 32B).

Afin de réaliser une analyse cinétique des effets inflammatoires, nous avons comparés les niveaux de production de chaque cytokine au cours du temps (Figure 32). L'exposition répétée à 6 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{j}$ de PM₁₀ a provoqué une augmentation significative du taux d'IL-6 à J8 et J11, même si pour ce dernier point, le taux semble déjà plus faible. La production de MCP-1 n'a subi aucune variation significative sous l'effet des PM₁₀ à J4 et J8, mais une baisse significative de sa sécrétion a été observée à J11 par rapport à J8 uniquement pour la plus forte dose d'exposition (6 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{j}$). La production d'IL-8 n'est pas influencée par la présence des PM₁₀, mais les niveaux de sécrétion subissent un effet temporel avec une diminution significative à J8 et J11 comparée à J4.

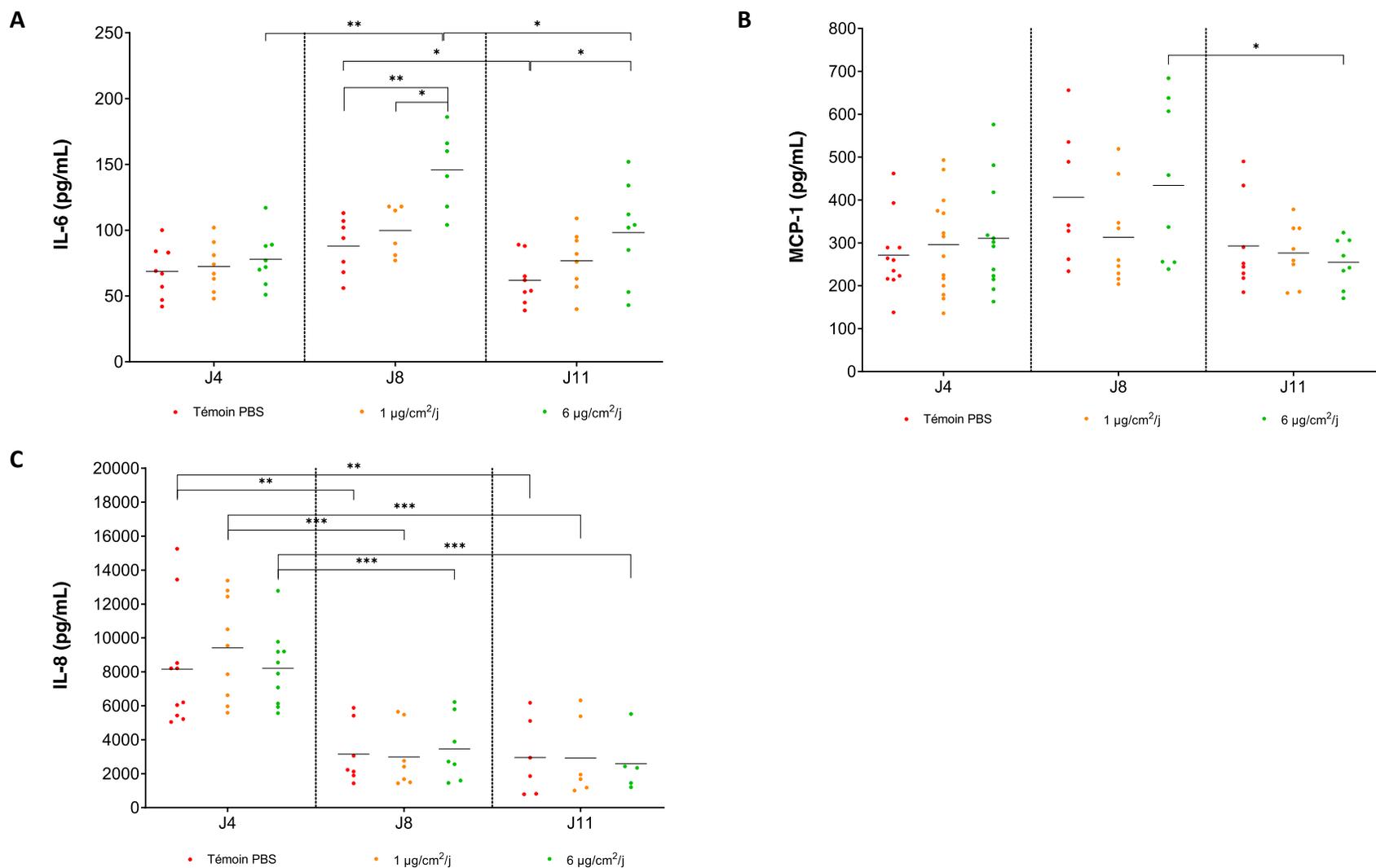


Figure 32. Niveaux d'excrétion de l'IL-6 (A), du MCP-1 (B) et de l'IL-8 (C) à J4, J8 et J11 des cellules NHBE différenciées exposées pendant 4 jours consécutifs au PBS ou aux PM₁₀ à 1 et 6 µg/cm²/j. Chaque point représente la mesure d'un échantillon, la moyenne est indiquée par une ligne horizontale. Le test ANOVA unidirectionnel a été effectué sur les valeurs brutes, suivi par le test de Tukey pour les comparaisons multiples (*: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$).

Généralement, l'IL-6 est produite rapidement et d'une manière transitoire en réponse à des stimuli exogènes. Elle est impliquée dans les phases initiales de l'inflammation et de la réponse immunitaire. L'IL-8 est également exprimée par les cellules épithéliales et les macrophages pour le recrutement des neutrophiles dans les zones d'inflammation, d'infection ou de lésion (Marques dos Santos et al., 2022). Selon Marques dos Santos et al. (2022), l'exposition de cellules 16HBE14o- en culture 3D au SRM® 2585 induit une augmentation significative de la sécrétion d'IL-6 et d'IL-8 notamment ainsi que d'autres cytokines (GM-CSF et CXCL10).

Par ailleurs, notre pseudo-épithélium reconstitué produit à l'état basal des concentrations importantes de cytokines. Ainsi, la production d'IL-8 est nettement plus importante qu'avec d'autres types cellulaires déjà analysés au sein du laboratoire, nécessitant une dilution des milieux de culture d'un facteur 10 à 20 pour entrer dans la gamme proposée par le fabricant. De même, le dosage de MCP-1 a nécessité une dilution au quart des milieux de culture. Par conséquent, les éventuelles variations de concentrations de cytokines pourraient être plus difficiles à caractériser si elles sont d'amplitude modérée. Marques dos Santos et al. (2022) ont également observé des niveaux de sécrétion de cytokines significativement différents entre des cellules 16HBE14o- et NuLi-1 exposées aux extraits organiques du SRM® 2585, en particulier pour l'IL-6 et le TNF- α . Ces différences pourraient être en lien avec la plus faible capacité des cellules NuLi-1 à former une barrière épithéliale pseudo-stratifiée et des jonctions serrées en culture à l'IAL comparées aux cellules 16HBE14o- (valeurs de TEER maximales de $803 \pm 54 \Omega \cdot \text{cm}^2$ pour les cellules 16HBE14o- et $621 \pm 21 \Omega \cdot \text{cm}^2$ pour les cellules NuLi-1). A titre comparatif, les valeurs moyennes de TEER dans notre étude (cf. chapitre 5.2) se situaient au-delà des valeurs mentionnées précédemment y compris dans le groupe « Témoin PBS », ce qui vérifie l'hypothèse de Marques dos Santos. Le TNF- α n'a pour sa part pas été excrété par nos cellules dans les conditions de l'étude.

L'étude cinétique prend ici tout son intérêt en montrant des variations significatives des niveaux de sécrétion à des moments différents selon les cytokines. Seule l'IL-6 voit sa sécrétion influencée par la présence des PM₁₀, de façon différée et selon une amplitude modérée.

Ces dosages de cytokines ont été complétés par une analyse en RT-qPCR de l'expression à J4 des gènes codant pour leur synthèse (Figure 33). Les niveaux relatifs d'expression des différents gènes ont été analysés et comparés selon la même démarche que celle décrite au chapitre 5.4 pour les mucines. Une augmentation significative de l'expression du gène IL-6 a été observé à la plus faible dose uniquement ($1 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{j}$) par rapport au groupe « Témoin PBS » et à la plus forte concentration testée ($6 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{j}$). En revanche, l'IL-8 tend à être sous-exprimée par rapport au « Témoin PBS », ainsi que MCP-1 à la plus forte dose uniquement.

Ces données d'expression sont à mettre en regard des profils cinétiques de production de l'IL-6 montrant une réponse cellulaire différée à J8 et J11, significative uniquement à la plus forte dose d'exposition, mais présentant un profil dose-réponse. En effet, il existe un décalage temporel entre la production des ARN_m et la sécrétion/excrétion des cytokines dans le milieu de culture. Par conséquent, la plus faible concentration de PM₁₀ induirait une augmentation progressive du taux d'ARN_m, encore observable à J4, mais n'aboutissant qu'à une tendance renforcée de sa production à J8 et à J11, sans atteindre un seuil significatif. En contraste, la synthèse d'ARN_m pourrait avoir eu lieu rapidement dès les premières expositions à la dose d'exposition plus élevée, puis s'être normalisée avant nos mesures, expliquant l'absence de modulation à J4. En revanche, la synthèse de la cytokine, plus tardive et/ou moins éphémère, est retrouvée significativement augmentée à J8 et J11.

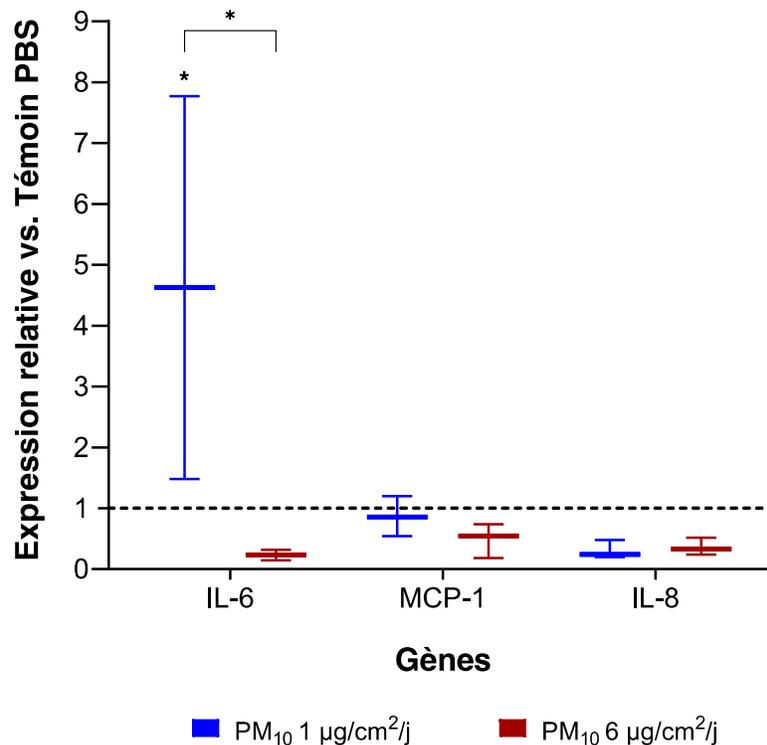


Figure 33. Expression relative des cytokines (IL-6, MCP-1 et IL-8) par rapport aux conditions « Témoin PBS » après 4 jours d'expositions répétées des cellules NHBE différenciées aux PM₁₀ à 1 et 6 µg/cm²/j.

Les résultats sont normalisés par rapport à GAPDH et analysés par la méthode $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Le test ANOVA unidirectionnel a été effectué sur les données brutes, suivi par le test de Newman-Keuls pour les comparaisons multiples (*: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$).

$n = 2-3$ analyses indépendantes sur un échantillon représentatif de 6 inserts.

Pour illustrer l'importance de la fenêtre en conservant un modèle comparable de cellules NHBE différenciées cultivées à l'IAL, on trouve dans la littérature que 4 h d'exposition à

différentes fractions de particules de l'air ambiant n'a conduit à aucune augmentation significative de l'expression d'IL-6 et IL-8 (Ghio et al., 2013). Mais 24 h d'exposition à des particules de l'air intérieur modifie l'expression des gènes impliqués dans la réponse immunotoxique (CD8A, CYP1A1, ITGAX, LYZ, et PTPRC).

5.8. Evaluation de la génotoxicité

Nous avons tout d'abord tenté de quantifier l'induction de la phosphorylation du variant de l'histone H2AX (γ -H2AX), qui est un marqueur précoce de la réponse cellulaire à un endommagement de l'ADN. La phosphorylation de l'histone H2AX n'est pas uniquement corrélée à la formation de cassures doubles brins (CDB) mais aussi à l'induction de cassures simple brin (CSB) pouvant être induites, entre autres facteurs, par les ERO. Nous avons utilisé un immunomarquage suivi d'une analyse par microscopie à fluorescence à l'aide d'un système d'analyse d'images (Metafer, MetaSystems). Différents essais ont été réalisés, soit par marquage direct des inserts, soit après trypsination, fixation, marquage et réalisation d'un cytospin. Dans tous les cas, la qualité des images obtenues était médiocre, avec un nombre important de foyers dans le témoin négatif. Des essais d'analyse par cytométrie en flux ne nous ont pas non plus permis d'obtenir des données de qualité satisfaisante.

D'une manière similaire à ce que nous avons utilisé pour évaluer la réponse cellulaire pro-oxydante, nous nous sommes alors tournés vers étude de l'expression d'un panel de 82 gènes impliqués dans la réponse cellulaire aux dommages à l'ADN (RT² Profiler™ PCR Array Human DNA Damage Signaling Pathway, Qiagen). Les résultats obtenus à J4 uniquement sont présentés dans le Tableau 11.

Seuls 2 gènes HUS1 et FANCG, impliqués dans la régulation du cycle cellulaire et dans la réparation des lésions de l'ADN respectivement, sont ressortis de l'analyse comme faiblement mais significativement modulés par rapport aux témoins. L'expression de HUS1 est majorée d'un facteur 2,16 tandis que celle de FANCG est réprimée d'un facteur -2,05, mais uniquement à la dose de 1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{j}$.

La réponse cellulaire à un stress génotoxique apparaît donc modérée avec absence d'effet-dose. En effet, seuls 2 gènes (HUS1 et FANCG) subiraient des variations significatives mais de faible amplitude de leur expression à la concentration de PM₁₀ qui représente notre dose d'intérêt. L'augmentation de l'expression de HUS1 pourrait indiquer une réponse cellulaire suite à une altération de l'ADN, alors que l'inhibition de FANCG pourrait contribuer à maintenir ces altérations en diminuant leur réparation.

Tableau 11. Modulation de l'expression de gènes (Fold Regulation) impliqués dans la réponse génotoxique après exposition des cellules NHBE aux PM₁₀ (1 et 6 µg/cm²/j). Mesures effectuées par RT-qPCR (kit « Human Oxidative Stress Plus PCR Array », Qiagen). n = 2 analyses indépendantes.

Nom du gène	Symbole du gène	Groupe IAL vs. Témoin PBS	PM ₁₀ 1 µg/cm ² /j vs. Témoin PBS	PM ₁₀ 6 µg/cm ² /j vs. Témoin PBS
HUS1 checkpoint homolog (S. pombe)	HUS1	1,31	2,16	1,79
Fanconi anemia, complementation group G	FANCG	-1,6	-2,05	-1,47

D'autres effets génotoxiques, tels que les cassures de l'ADN, la présence de micronoyaux et des modulations épigénétiques susceptibles de contribuer à des effets délétères différés sont également rapportés dans la littérature après exposition aiguë (4 h d'exposition) et répétée (3 expositions consécutifs de 4 h avec 24 h d'intervalle) des cellules NHBE cultivées à l'IAL à des particules de l'air ambiant (PM_{2,5}) (2 à 10 mg/cm² et 6 à 30 mg/cm² respectivement, introduit sous forme de film très fin sur le tapis cellulaire) (Leclercq et al., 2016).

6. Evaluation de la co-exposition des NHBE différenciées aux PM₁₀ à l'IAL et aux milieux « conditionnés » des MDM exposées aux PM_{2,5}

Dans le tissu pulmonaire, les cellules épithéliales développent un dialogue avec les cellules macrophagiques du tractus respiratoire. Ces dernières ont un rôle fondamental dans la réponse aux polluants particulaires, notamment en ce qui concerne la réponse inflammatoire et la clairance. Dans le but de déterminer les éventuels mécanismes d'interaction entre les NHBE différenciées et les MDM, un modèle de co-exposition a été élaboré dans le dernier volet de ce travail.

L'évaluation des biomarqueurs impliqués dans l'inflammation, le potentiel oxydant et la sécrétion de mucus, a été réalisée exclusivement à J4. Aucune de ces analyses ne pouvait être réalisée directement dans les milieux de culture. En effet, la co-exposition est obtenue en introduisant des milieux « conditionnés » issus de l'exposition des MDM à la fraction plus fine du SRM® 2585 (PM_{2,5}). Ces milieux contiennent donc des médiateurs libérés par ce type cellulaire, telles que des cytokines et des chimiokines, qu'il ne serait pas possible de distinguer de la fraction sécrétée par les cellules NHBE en réponse à la co-exposition. Pour ces raisons, seule l'étude de l'expression génique a été réalisée.

6.1. Evaluation de la réponse cellulaire pro-oxydante

Dans le modèle de co-exposition, la réponse cellulaire pro-oxydante a été évaluée en analysant l'expression de 82 gènes impliqués dans le stress oxydatif, d'une manière identique à celle déjà décrite au chapitre 5.6 après expositions répétées aux PM₁₀ seules. Les gènes ayant subi une modification significative (indiquées en **gras**) de leur expression sont listés dans le Tableau 12.

A J4, une surexpression des gènes PTGS2 (ou cyclo-oxygénase-2 (COX-2)) et SOD2 (+ 2,04 et + 2,32 respectivement) a été observée par rapport au groupe « Témoin PBS/M0 », uniquement dans les conditions de plus fortes expositions (PM₁₀ à 6 µg/cm²/j et PM_{2,5} à 10 µg/cm²/j). A l'inverse, les plus faibles concentrations (PM₁₀ à 1 µg/cm²/j et PM_{2,5} à 1 µg/cm²/j) conduisaient à une sous-expression d'un facteur 2,07 du gène CCL5 codant pour une chimiokine pro-inflammatoire impliquée dans le recrutement de leucocytes vers les sites d'inflammation. L'expression du gène AOX1, qui joue un rôle dans la métabolisation des aldéhydes et des xanthines, a été légèrement induite à la fois dans le groupe « Témoin PBS/M0 » et après co-exposition aux plus fortes doses, d'une manière comparable (+2,60 et +2,29 respectivement), ce qui pourrait indiquer un effet lié à la nébulisation et non pas aux particules elles-mêmes.

Tableau 12. Modulation de l'expression de gènes impliqués dans le stress oxydant après co-exposition des cellules NHBE aux PM₁₀ (1 et 6 µg/cm²/j) et aux milieux « conditionnés » issus de l'exposition des MDM aux PM_{2,5} (1 et 10 µg/cm²/j) pendant 2 jours.

n = 2 analyses indépendantes d'un échantillon représentatif de 6 inserts.

Nom du gène	Symbole du gène	Témoin PBS/M0 vs. Groupe IAL/RPMI	PM ₁₀ 1 µg/cm ² /j + PM _{2,5} 1 µg/cm ² /j vs. Témoin PBS/M0	PM ₁₀ 6 µg/cm ² /j + PM _{2,5} 10 µg/cm ² /j vs. Témoin PBS/M0
Prostaglandine-endoperoxyde synthase 2	PTGS2 (COX-2)	-1,00	1,04	2,04
Superoxyde dismutase 2, mitochondrial	SOD2	-1,09	1,08	2,32
Chemokine (C-C motif) ligand 5	CCL5	1,12	-2,07	1,00
Aldéhyde oxydase 1	AOX1	2,60	1,76	2,29

La SOD2 est une enzyme mitochondriale de détoxification qui catalyse la dismutation du superoxyde (O₂^{•-}) en peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et en oxygène (O₂). Ce processus est essentiel pour protéger les cellules des dommages oxydatifs induits par les ERO générées dans les mitochondries. L'inflammation et le stress oxydatif sont des processus physiopathologiques étroitement liés : l'inflammation peut générer du stress oxydant et, inversement, le stress

oxydant peut exacerber la réponse inflammation (Biswas, 2016). C'est le cas du gène PTGS2 qui code pour une enzyme clé dans la voie de biosynthèse de la prostaglandine E2 (PGE2), impliqués dans la réponse inflammatoire (Anamthathmakula & Winuthayanon, 2021).

Globalement, la réponse cellulaire pro-oxydante mise en évidence après co-exposition apparaît modérée à la fois en diversité et en amplitude. En effet, 3 gènes (PTGS2, SOD2 et CCL5) subiraient des modulations, en interaction avec des processus inflammatoires. Ces gènes sont différents de ceux subissant une modulation après expositions répétées aux seules PM₁₀ (SELENOP, CYBB, MT3 et PRDX1). L'apport de milieu « conditionné » par les MDM n'augmente donc pas la réponse pro-oxydante liée spécifiquement aux PM₁₀. Néanmoins, l'augmentation de l'expression de SOD2, une enzyme inductible, pourrait signer une réponse cellulaire à une présence accrue d'ERO, tandis que l'augmentation de COX-2 traduirait un contexte inflammatoire.

6.2. Evaluation de l'effet inflammatoire

Nous avons évalué le rôle de médiateurs macrophagiques sur la réponse inflammatoire fournie par les cellules épithéliales pulmonaires.

Le travail réalisé spécifiquement sur les cellules MDM exposées aux PM_{2,5} a été effectué au sein de l'IRSET à Rennes par l'équipe du Pr Lecqueur, qui nous a ensuite fourni une partie des surnageants « conditionnés » récupérés à J4 afin de réaliser les co-expositions. L'exposition répétée des MDM aux PM_{2,5} a induit à J4 une augmentation significative de la sécrétion de plusieurs cytokines (Figure 18) : l'IL-6, l'IL-8, le TNF- α et CCL3/4, tandis que la production de CXCL10 a été au contraire diminuée. Ces effets sont essentiellement observés après expositions à 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{j}$. Une sécrétion d'IL-10, non modifiée par l'exposition aux PM_{2,5}, a également été observée.

Les macrophages alvéolaires sont la principale source de sécrétion de cytokines inflammatoires dans les poumons (Thomassen et al., 1996). Ils sécrètent notamment l'IL-6, l'IL-8 et le TNF- α , mais aussi des dérivés activés de l'oxygène et de l'azote, contribuant à l'endommagement tissulaire (Arora et al., 2018). CXCL10 est également connue pour être impliquée dans les pathologies inflammatoires pulmonaires et le syndrome de détresse respiratoire aiguë (Tsai et al., 2019). L'IL-10 a au contraire un effet anti-inflammatoire et favorise la réparation tissulaire (Arora et al., 2018). Selon Thomassen et al. (1996), elle est capable de réduire, voire même d'inhiber, la production de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α , l'IL-1, l'IL-6 et l'IL-8.

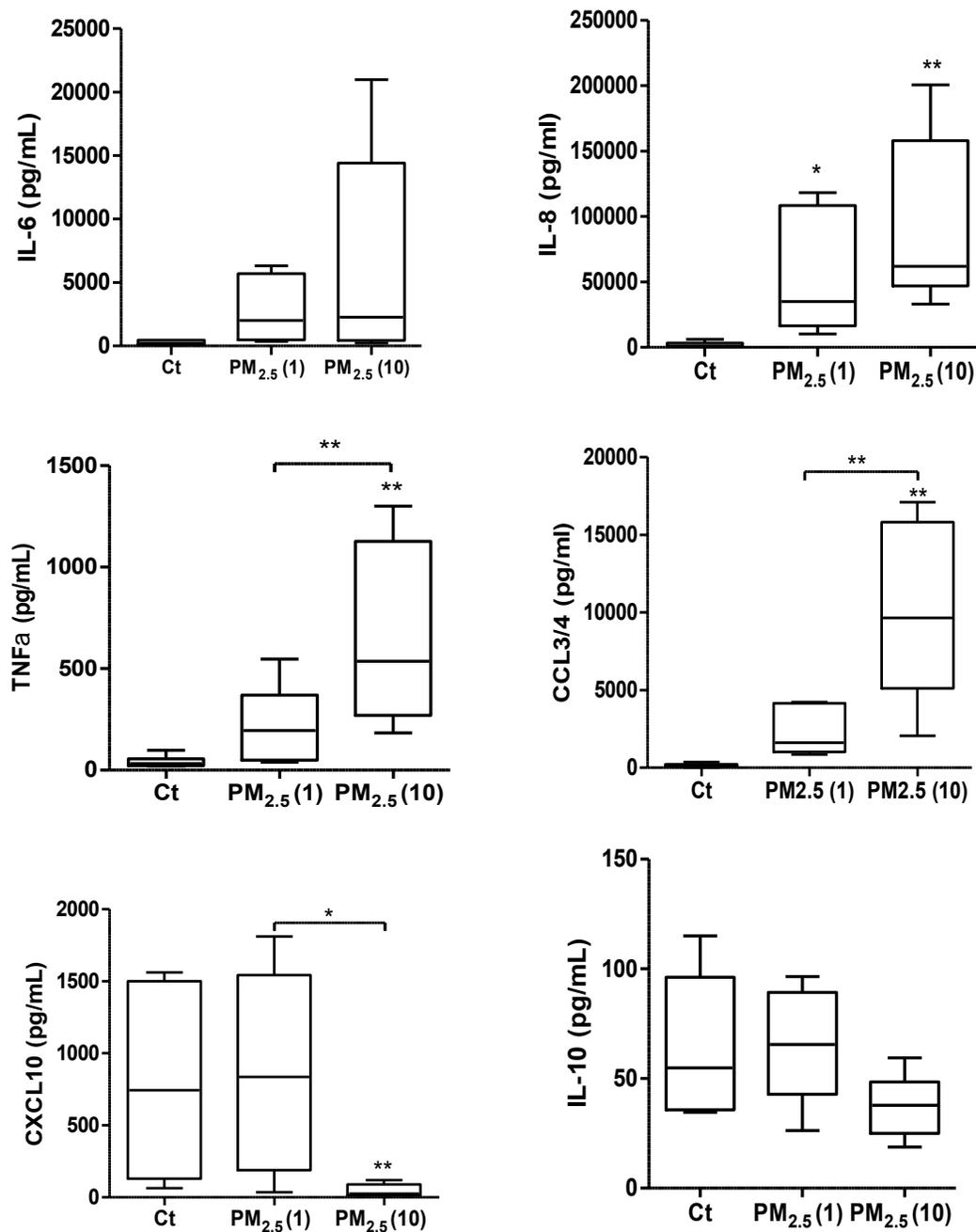


Figure 34. Sécrétion de cytokines (IL-6, IL-8, TNF- α , CCL3/4, CXCL10 et IL-10) à J4 après 4 expositions consécutives des cellules MDM à 1 et 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{j}$ de PM_{2.5}.

Le test ANOVA unidirectionnel a été effectué sur les données brutes, suivi par le test de Newman-Keuls pour les comparaisons multiples (*: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$). $n = 6$.

La réponse inflammatoire observée après exposition aux PM_{2.5} (Figure 34) pourrait être argumentée par un niveau d'endotoxines plus important comparé aux PM₁₀ ou au SRM® 2585 complet (cf. chapitre 1.2). Ces milieux « conditionnés » présentent donc bien une composition

spécifiquement liée à l'exposition aux PM_{2,5}, susceptible de mimer la réponse de macrophages exposés au niveau alvéolaire.

La réponse inflammatoire des NHBE dans le modèle de co-exposition a été évaluée par RT-qPCR d'une façon identique à celle réalisée dans le chapitre 5.7 après expositions répétées aux seules PM₁₀. Les niveaux d'expression des 3 mêmes cytokines (IL-8, MCP-1 et IL-6) ont été déterminés par la méthode $2^{-\Delta\Delta Ct}$ et comparés au groupe « Témoin PBS/M0 », après normalisation par rapport à un gène de ménage (GAPDH) (Figure 35).

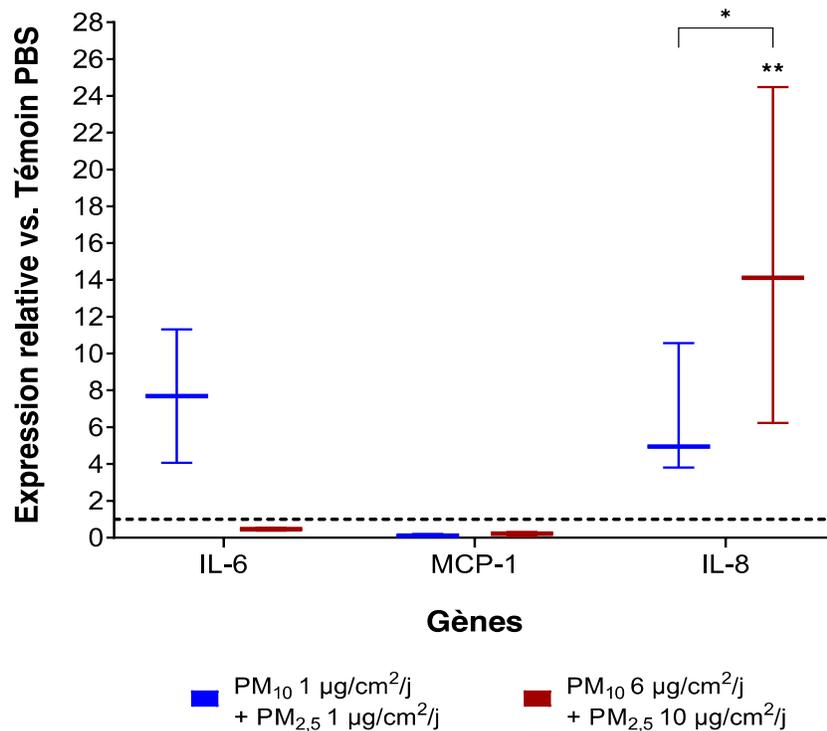


Figure 35. Expression relative des cytokines (IL-6, MCP-1 et IL-8) par rapport aux conditions « Témoin PBS/M0 » à J4 après co-exposition des cellules NHBE différenciées aux PM₁₀ à 1 et 6 µg/cm²/j pendant 4 jours consécutifs et aux milieux de culture « conditionnés » issus de l'exposition des MDM aux PM_{2,5} (1 et 10 µg/cm²/j) pendant 2 jours.

Les résultats sont normalisés par rapport à GAPDH et analysés par la méthode $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Le test ANOVA unidirectionnel a été effectué sur les données brutes, suivi par le test de Newman-Keuls pour les comparaisons multiples (*: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$).

$n = 2-3$ analyses indépendantes sur un échantillon représentatif de 6 inserts.

La co-exposition n'a pas induit de modifications significatives d'expression du gène MCP-1. Pour l'IL-6, une tendance très nette à l'augmentation a été observée à la plus faible concentration de particules uniquement. Enfin, une augmentation significative et dose-dépendante de l'expression de l'IL-8 a été mise en évidence (Figure 35).

Par comparaison avec les résultats obtenus après expositions répétées aux PM₁₀ seules (Figure 33), on retrouve la surexpression du gène codant pour l'IL-6, là encore uniquement après expositions à la plus faible concentration de particules. Ces 2 modes d'exposition ayant été réalisés de façon indépendante et à des périodes distinctes, cette absence d'effet-dose semble bien une caractéristique de la concentration de particules à laquelle l'exposition a été réalisée, indépendamment de la variabilité de l'expérimentation. Comme déjà évoqué, il est possible qu'à la plus forte concentration, l'augmentation d'ARN_m soit intervenue avant J4 puis se soit normalisée d'où l'absence de modulation de l'expression génique. La co-exposition semble à la fois renforcer cet effet si l'on compare les valeurs moyennes d'induction de l'IL-6 (+ 7,7 pour la co-exposition vs. + 4,6 pour l'exposition simple), mais aussi induire de façon additionnelle une forte surexpression de l'IL-8, qui contraste avec l'absence d'effet notée après exposition aux particules seules. Ces données indiquent globalement que le modèle de co-exposition, qui complète la représentation des types cellulaires impliqués dans la réponse inflammatoire et prend en compte leurs interactions, renforce l'expression de ce processus.

6.3. Evaluation de l'expression de mucines

L'analyse de l'expression des gènes MUC5AC et MUC5B par RT-qPCR a été réalisée dans le modèle de coexposition d'une manière similaire à celle réalisée pour l'analyse après expositions répétées des NHBE aux PM₁₀ (cf. chapitre 5.4).

La co-exposition n'a pas induit des modifications significatives de l'expression des gènes MUC5AC et MUC5B à J4 (Figure 36). Toutefois, une tendance à la surexpression du gène codant pour MUC5AC a été constatée à la plus faible dose. D'importantes variabilités dans l'expression génique des mucines au sein du même échantillon testé ont été observées, rendant difficile toute conclusion.

Le profil d'expression de MUC5AC apparaît néanmoins modifié après co-exposition, comparé à celui observé après exposition uniquement aux PM₁₀. En effet, la tendance était plutôt à une sous-expression de ce gène alors qu'ici, nous avons une nette tendance à l'augmentation. MUC5AC est considérée comme une « mucine de réponse », régulée notamment par la réponse inflammatoire (Okuda et al., 2019). Il est donc cohérent d'observer cette tendance dans la mesure où il vient d'être montré que la réponse inflammatoire est elle aussi renforcée dans le cas de la co-exposition. Le nombre limité d'analyses et les écart-types importants empêchent là encore une conclusion plus affirmée.

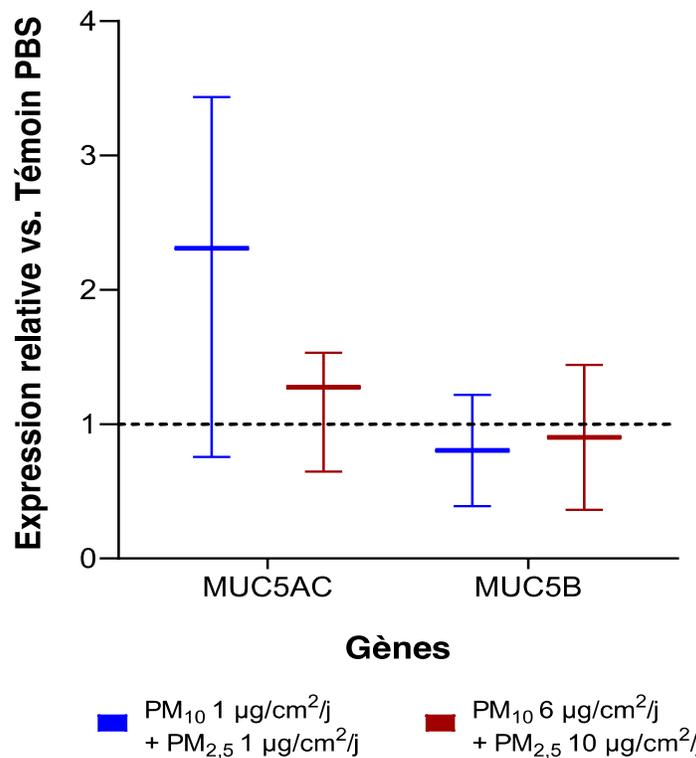


Figure 36. Expression relative des mucines (MUC5AC et MUC5B) par rapport au Témoin « PBS/M0 » à J4 après co-exposition des cellules NHBE différenciées aux PM₁₀ à 1 et 6 µg/cm²/j pendant 4 jours consécutifs et aux milieux de culture « conditionnés » issus de l'exposition des MDM aux PM_{2,5} (1 et 10 µg/cm²/j) pendant 2 jours. Les résultats sont normalisés par rapport à GAPDH et analysés par la méthode 2^{-ΔΔCt}. Le test ANOVA unidirectionnel a été effectué sur les données brutes, suivi par le test de Newman-Keuls pour les comparaisons multiples. n = 2-3 analyses indépendantes sur un échantillon représentatif de 6 inserts.

Discussion Générale

L'objectif de cette thèse était d'évaluer, dans une démarche *in vitro*, la toxicité respiratoire de poussières domestiques représentatives de la pollution de l'air intérieur (SRM® 2585), en s'appuyant sur un modèle cellulaire le plus représentatif possible de l'exposition par inhalation à ces polluants particulaires. Nous avons ainsi choisi de travailler à partir d'un pseudo-épithélium trachéo-bronchique fonctionnel en termes de production de mucus et de battement ciliaire, maintenu en interface air-liquide. Nous avons également pris soin de respecter une granulométrie réaliste du niveau trachéo-bronchique en utilisant la fraction PM₁₀ isolée du SRM® 2585. Des expositions répétées ont été réalisées par nébulisation des poussières de sorte à obtenir un niveau de déposition compatible avec les modélisations disponibles dans la littérature pour cet étage du tractus respiratoire.

Ce travail de thèse s'intègre dans le projet plus large « ToxIALMix », visant également à déterminer les effets de la fraction plus fine (PM_{2,5}) à l'étage alvéolaire. Ce volet a été réalisé en parallèle de cette thèse par l'équipe du Pr Valérie Lecureur (IRSET, Inserm UMR S 1085, Rennes) en utilisant un modèle de cellules macrophagiques humaines. Outre leur rôle dans la clairance des particules dans le poumon profond, elles interviennent aussi dans un dialogue entre les différents types cellulaires constituant le tractus respiratoire, et contribuent à la réponse toxique globale après inhalation de poussières. Si l'étude menée spécifiquement sur le modèle macrophagique a été réalisée indépendamment du présent travail de thèse, l'investigation du dialogue cellulaire entre pseudo-épithélium trachéo-bronchique et macrophages constitue le 3^{ème} volet de la présente thèse.

La mise en œuvre d'une telle démarche doit permettre, à terme, de fournir des informations pertinentes aux décideurs contribuant à l'élaboration de normes et de lignes directrices concernant la qualité de l'air dans les environnements clos.

1. Caractérisation physico-chimique complémentaire des PM₁₀

Les effets sanitaires des particules étant le plus souvent décrits comme liés à leurs potentiels pro-oxydant et pro-inflammatoire (Hellack et al., 2014), nous avons dans un premier temps complété la caractérisation physico-chimique intrinsèque des PM₁₀ vis à vis de ces propriétés. Nous avons mesuré des taux d'endotoxines se situant à des niveaux bas à modérés comparés à l'éventail très large rapporté dans la littérature pour des poussières sédimentées domestiques (Shamsollahi et al., 2019). Les propriétés pro-oxydantes relevées seraient pour leur part associées principalement à la présence de composés organiques, laissant supposer l'implication des HAP identifiés par le NIST, sans écarter une contribution possible des autres familles de composés listés. Comparativement, ces capacités restent toutefois nettement plus faibles que celles des particules DEP utilisées comme référence.

Les extraits organiques issus du SRM® 2585 et de sa fraction PM₁₀ se sont révélés mutagènes avec un profil cohérent avec la présence de HAP, mais révèlent également la présence de nitro-HAP, non identifiés par le NIST. Ces familles de composés sont notamment connues pour leur potentiel génotoxique, susceptible d'induire des effets de santé sur le long terme.

La valeur « prédictive » de ces propriétés, déterminées principalement en conditions acellulaires (excepté la mutagénicité), sera discutée par la suite après comparaison avec les effets biologiques mesurés sur le pseudo-épithélium.

2. Effets biologiques des PM₁₀ vis-à-vis du pseudo-épithélium trachéo-bronchique

Dans les conditions d'exposition « réalistes » aux PM₁₀ appliquées, nous n'avons relevé aucune altération de la viabilité cellulaire mesurée à l'échelle globale du pseudo-épithélium. Toutefois, la plus forte dose d'exposition conduit à une diminution significative de la cohésion du tapis cellulaire dès J2 et jusqu'à J8. Cet effet apparaît néanmoins réversible 7 jours après la dernière exposition (J11), indiquant que le pseudo-épithélium possède des capacités de régénération, à l'instar de la physiologie du tissu qu'il représente. Même si les conditions utilisées par Marques dos Santos et al. (2022) sont difficilement comparables avec les nôtres car réalisées à partir d'extraits organiques issus du SRM® 2585, ces auteurs rapportent également une altération significative de la barrière épithéliales respiratoires (cellules 16HBE14o- et NuLI-1) après 24h d'exposition à 0,26 mg/mL. Selon les équivalences indiquées par les auteurs, ce niveau correspondrait à environ 13 µg/cm², et serait donc du même ordre que dans notre étude.

Nous n'avons pas observé de modifications significatives de la production globale de mucus mais une tendance à l'augmentation en fonction de la dose de PM₁₀, retrouvée aux différents temps de mesure. Les expressions de MUC5AC et de MUC5B, mesurées uniquement à J4, ne sont pas modulées et aucune perturbation majeure de la fonction ciliaire n'a été mise en évidence. Cette dernière évaluation reste toutefois à affiner dans un contexte où l'analyse par MEB a montré un possible raccourcissement des cils et une diminution de leur densité. A ce stade de nos travaux, l'exposition aux PM₁₀ ne semble donc pas affecter l'efficacité globale de la clairance muco-ciliaire dans notre modèle. Il faut toutefois garder à l'esprit que le protocole de rinçage des tapis cellulaires ne permet pas d'éliminer/récupérer totalement le mucus formé, ce qui introduit une source de variabilité des dosages.

Bien qu'indispensable à un certain nombre de processus physiologiques, la production accrue d'ERO est rapportée comme un mécanisme très largement impliqué dans la réponse cellulaire aux polluants inhalés (Samet & Wages, 2018 ; Wages et al., 2016). Dans notre étude, la production d'ERO n'a été que marginalement augmentée : uniquement à J4 et sans effet-dose

associé. Les niveaux d'expression d'un panel de gènes impliqués dans la réponse pro-oxydante ne sont que peu modulés à J4. On peut néanmoins remarquer que les 2 gènes réprimés codent pour des systèmes de détoxification, alors que l'un des gènes surexprimés favorise le mécanisme oxydatif. Même si elles restent modérées, l'ensemble de ces modulations concoure globalement à un accroissement de la réponse pro-oxydante. La production accrue d'ERO et la modulation de l'expression génique constituent des réponses cellulaires souvent rapides (quelques heures), mais aussi transitoires et pouvant conduire à une réponse adaptative du tissu. Il est donc possible que la fenêtre de mesure choisie, uniquement en fin du cycle d'exposition, ne soit pas optimale pour objectiver les variations de ces biomarqueurs. Ce point de mesure reflète néanmoins le statut atteint après des expositions répétées et cumulées aux PM₁₀, intégrant les éventuelles adaptations cellulaires.

Les propriétés pro-oxydantes intrinsèques des particules mesurées en conditions acellulaires laissent entrevoir une faible production d'ERO mais une capacité à induire une déplétion en DTT, signant un PO majoritairement lié à la fraction organique. Ce profil intrinsèque reste cohérent avec les réponses cellulaires observées, mais le caractère « prédictif » vis-à-vis de la réponse cellulaire dans le cas d'expositions répétées reste toutefois à déterminer.

Outre une homéostasie redox perturbée, les maladies pulmonaires sont le plus souvent associées à une composante inflammatoire. Nous avons donc analysé la réponse du pseudo-épithélium aux PM₁₀ en termes de sécrétion de cytokines et de leurs niveaux d'expression génique. Nous avons trouvé une réponse cellulaire essentiellement médiée par l'IL-6 dont l'expression et la sécrétion se trouvent augmentées, mais avec des cinétiques décalées et distinctes selon les niveaux d'exposition appliqués. Les sécrétions de MCP-1 et d'IL-8 et ne sont pas modifiées par l'exposition aux PM₁₀.

Même si la réponse pro-inflammatoire ne peut être attribuée exclusivement à la présence d'endotoxines, l'amplitude modérée observée est néanmoins cohérente avec les niveaux d'endotoxines de nos échantillons de poussières domestiques, situés dans les valeurs plutôt faibles de la littérature.

Il est difficile de comparer directement ces données avec celles disponibles car les conditions expérimentales diffèrent sous différents aspects : soit par rapport au type de poussières, soit par rapport au modèle cellulaire, aux conditions de culture et d'exposition. Citons toutefois l'étude de Marques dos Santos et al. (2022) réalisée avec un extrait organique issu du SRM® 2585 et utilisant des cellules 16 HBE14o- et NuLi-1 cultivées à l'IAL. Ces auteurs ont observé une tendance à la diminution de la production d'IL-6 et d'IL-8 après 24h d'exposition à 0,02 µg/mL, mais une augmentation après exposition à 0,6 µg/mL. Le niveau de significativité de ces variations n'est toutefois pas précisé.

En restant sur un modèle de cellules HBE fraîchement isolées de donneurs sains et maintenues en immergé, (Becker et al., 2005) rapportent une augmentation de l'expression de

l'IL-8 après 18 h d'exposition à des PM₁₀ d'origine atmosphérique. Sur un modèle équivalent mais maintenu à l'IAL, Leni et al. (2020b) ont observé une augmentation de la sécrétion d'IL-6 et d'IL-8 après 24h d'exposition à des PM₁₀ et à des PM_{2,5}, que ces particules soient d'origine urbaine ou rurale.

Enfin, avec un modèle de BEAS-2B cultivées à l'IAL, Gualtieri et al. (2018) ont pour leur part observé que 4 jours d'exposition en continu à des PM₁ atmosphériques induisaient une production accrue d'IL-6 et d'IL-8. A l'inverse, l'exposition de ce même modèle à des produits de combustion de biocarburants entraînait une diminution de l'expression des 2 cytokines (Juarez Facio et al., 2022).

Il n'y a donc pas de profil type de réponse, mais l'étude la plus proche de nos conditions (Marques dos Santos et al., 2022) ne rapporte que des variations limitées des taux de ces 2 cytokines, même en utilisant un extrait organique du SRM[®] 2585, dont la composition et les concentrations de polluants peuvent notablement différer de celles rencontrées après exposition aux particules elles-mêmes.

Les réponses biologiques caractérisées à ce stade indiquent que les expositions répétées à des concentrations « réalistes » de PM₁₀ n'induisent que des effets toxiques limités sur le modèle de pseudo-épithélium trachéo-bronchique. Par comparaison, diverses études menées par expositions immergées, le plus souvent en aigu et sur modèles non différenciés, rapportent au contraire pour différents polluants particuliers des effets cytotoxiques et/ou pro-oxydants, pro-inflammatoires et génotoxiques significatifs (Abbas et al., 2019; Badran et al., 2020; Becker et al., 2005; Marques dos Santos et al., 2022; Platel et al., 2020; Saraf et al., 1999). Afin d'estimer l'effet de la différenciation cellulaire sur les profils de réponses toxiques, nous avons mené comparativement des essais de cytotoxicité et de réponse inflammatoire sur ce même type de cellules NHBE, mais cultivées en immergé donc indifférenciées. Les concentrations utilisées correspondaient aux doses journalières et cumulées déposées après nébulisation. Nous avons ainsi pu observer une baisse significative de la viabilité, contrairement aux observations effectuées en conditions IAL. La production d'IL-8 et de MCP-1 étaient diminuées par rapport au témoin, mais celle d'IL-6 se trouvait transitoirement augmentée sous l'effet des doses journalières PM₁₀. En revanche, les expositions aux doses cumulées conduisaient à une diminution des niveaux d'IL-6 dans les milieux de culture, quelle que soit la durée de l'exposition. Le profil de réponse des 3 cytokines est assez cohérent entre les 2 conditions de culture : l'IL-8 et le MCP-1 se trouvant non modifiés ou diminués sous l'effet des particules, tandis que l'IL-6 peut être augmentée dans certaines conditions. Toutefois, pour cette dernière cytokine, les concentrations induisant son augmentation ne sont pas identiques : les doses cumulées induisent une augmentation significative de la production d'IL-6 en IAL mais au contraire une diminution en conditions immergées. Ce sont les doses journalières qui induisent la surproduction d'IL-6 en immergé.

Le contrôle de la dosimétrie exacte des particules susceptibles d'interagir avec les cellules est l'une des principales limitations du modèle de culture en immergé. Des particules peuvent rester en suspension dans le milieu de culture ou être poussées vers les parois, affectant ainsi la dose réellement en interaction avec les cellules (Upadhyay & Palmberg, 2018).

D'autre part, les particules dispersées dans le milieu de culture ont souvent tendance à former des agrégats ou des « couronnes » pouvant modifier leur granulométrie, leur composition chimique et par conséquent leur toxicité (Loret et al., 2016 ; Upadhyay & Palmberg, 2018 ; Platel et al., 2022).

Dans une démarche de comparaison de cultures immergées et à l'IAL, Panas et al. (2014) ont ainsi observé, sur des cellules A549 exposées à des particules de SiO₂, des effets cytotoxiques et pro-inflammatoires majorés après exposition en immergé comparé à l'IAL. Lan et al. (2021) ont de leur côté observé que la cytotoxicité de PM_{2,5} vis-à-vis de cellules SAEC non différenciées cultivées en immergé était abolie lorsque ces mêmes cellules étaient cultivées à l'IAL et différenciées. Ghio et al. (2013) ont tout d'abord mis en évidence, qu'indépendamment de toute exposition, des augmentations significatives d'expression de gènes impliqués dans l'inflammation (IL-6 et IL-8) et le stress oxydant (HOX1 et COX-2) interviennent au cours de la différenciation de cellules NHBE et de BEAS-2B cultivées à l'IAL, comparés aux conditions en immergé. Cela suggère que la durée de culture à l'IAL s'accompagne de modulations de l'expression des protéines impliquées dans l'inflammation et le stress oxydant. Après expositions de cellules NHBE cultivées en immergé à des particules atmosphériques de diamètres variables (PM_{2,5-10}, PM_{0,1-2,5} et PM_{<0,1}), une augmentation significative de l'expression de l'IL-8, de l'IL-6, de HOX1 et de COX-2 a été observée. Ces modifications n'ont pas été retrouvées après des expositions identiques de NHBE cultivées à l'IAL. Les cellules BEAS-2B cultivées en immergé ont pour leur part montré une augmentation significative de l'expression de l'IL-8 et de HOX1 après exposition à des particules de l'air ambiant (SRM® 1648) par rapport aux conditions de culture à l'IAL. Ces auteurs ont également montré que l'hypoxie exercerait un effet synergique sur l'augmentation de la réponse pro-inflammatoire après exposition aux particules dans les cellules cultivées en immergé. Ainsi, la diminution ou l'abolition de la réponse inflammatoire observée avec les cultures à l'IAL pourrait être liée à l'augmentation de la disponibilité de l'oxygène par rapport aux conditions de culture en immergé (Ghio et al., 2013). D'autres études ont également mis en évidence le lien entre l'hypoxie et les réponses inflammatoires et pro-oxydantes dans différents modèles *in vitro* et *in vivo*. La sécrétion d'IL-6 et d'IL-8 est par exemple significativement augmentée dans des cellules endothéliales (UVEC) et des macrophages maintenus en conditions hypoxiques (Ali et al., 1999 ; Hirani et al., 2001). De même, l'expression du TNF- α , de MIP-1 β et MCP-1 est augmentée dans des macrophages de rats en hypoxie (Madjpour et al., 2003).

En utilisant un modèle de co-cultures A549 et THP-1, Wang et al. (2020) ont, en accord avec les études précédentes, montré des effets pro-inflammatoires majorés en condition

immergée en réponse à une exposition à des particules urbaines. Mais de façon contrastée, Loret et al. (2016) ont rapporté, sur ce même modèle de co-cultures, des effets cytotoxiques et pro-inflammatoires plus marqués en condition IAL *versus* immergée après exposition au TiO₂ et au CeO₂.

Malgré la présence de HAP et de nitro-HAP (attestée par le test d'Ames) aux propriétés génotoxiques avérées, nous n'avons observé qu'une très faible modulation de l'expression de gènes impliqués dans ces mécanismes. Le caractère mutagène a été déterminé en utilisant des extraits organiques qui ne prennent pas en compte la biodisponibilité des polluants chimiques adsorbés sur les PM₁₀. Ainsi, le cocktail de composés organiques potentiellement toxiques n'est pas suffisamment disponible pour induire un stress génotoxique majeur sur le pseudo-épithélium, malgré les nébulisations répétées et cumulées de particules.

Un certain nombre de travaux visant à évaluer la génotoxicité des particules ont néanmoins été réalisées à partir d'extraits organiques, aboutissant à des réponses génotoxiques significatives sur des modèles cellulaires A549 ou Beas2B non différenciés (Abbas et al., 2013, 2019; Billet et al., 2018b; Bocchi et al., 2016; Platel et al., 2020). En revanche, aucune activité génotoxique n'a été mise en évidence avec des cellules NHBE différenciées à l'IAL et exposées d'une manière répétée (3 jours consécutifs, 4 h/j) à des PM_{2,5} atmosphérique (Leclercq et al., 2017). Platel et al. (2020) ont également montré que des PM_{2,5-0,18} et PM_{0,18} provenant d'une zone urbano-industrielle ne génèrent d'effets génotoxiques que sur des lignées pulmonaires immortalisées (BEAS-2B et NCI-H292) cultivées à l'IAL. En revanche, aucun effet significatif n'a été relevé sur des cellules NHBE différenciées, ni *in vivo* sur des souris BALB/c après expositions intranasales aiguës (24 h), subaiguës (1 mois) ou sub-chroniques (3 mois). Ces essais *in vivo* ont investigué aussi bien les lésions primaires de l'ADN, que les aberrations chromosomiques et les mutations génétiques. Par conséquent, les cellules NHBE différenciées affichent un profil de réponse similaire à celui observé *in vivo* et peuvent être considérées comme un bon modèle prédictif d'un effet *in vivo*. Les cellules cancéreuses NCI-H292 et immortalisées BEAS-2B présenteraient des capacités de détoxification, notamment dans les systèmes antioxydants, moins efficaces, les rendant plus sensibles aux altérations de l'ADN (Platel et al., 2020).

Ainsi, tous ces travaux montrent de façon convergente que l'utilisation de modèles non différenciés, cultivés en immergé tend à majorer les réponses cytotoxiques, pro-oxydantes, pro-inflammatoires contribuant à surestimer la toxicité globale des particules inhalées (Lan et al., 2021). Ils soulignent l'intérêt de choisir un modèle plus pertinent, proche des conditions physiologiques particulières du tractus respiratoire, afin d'obtenir des données utilisables dans la perspective de définir des normes de qualité de l'air.

3. Réponses biologiques du pseudo-épithélium à une co-exposition aux PM₁₀ et aux milieux « conditionnés » issus des macrophages exposés aux PM_{2,5}

Graf et al. (2023) ont récemment mis en avant la nécessité d'utiliser des modèles *in vitro* cultivés à l'IAL mais auxquels il convient d'ajouter des types cellulaires représentatifs de l'immunité innée du tissu pulmonaire. Dans cette dernière partie du travail, nous avons abordé la notion d'interactions entre les macrophages et le pseudo-épithélium. Compte tenu de l'articulation du projet « ToxIALMix » entre les sites de Caen et Rennes, nous avons opté pour un modèle de co-exposition plutôt que de co-cultures. Le pseudo-épithélium a ainsi été exposé d'une part aux PM₁₀ en apical et simultanément aux milieux « conditionnés » par l'exposition de macrophages à la fraction PM_{2,5} ajoutés en basal des inserts à J2. Les conséquences de ce « dialogue » ont été évaluées au niveau des réponses pro-oxydante, pro-inflammatoire et vis-à-vis de l'expression des mucines. Ces dernières ne sont pas significativement modifiées, mais une nette inversion de tendance est observée pour MUC5AC à la plus faible dose, suggérant une possible augmentation de son expression.

Les gènes significativement surexprimés (SOD2, COX-2, IL-6 et IL-8) indiquent un contexte pro-oxydant associé à une réponse pro-inflammatoire, qui restent toutefois d'amplitude modérée. Seul le gène codant pour l'IL-6 se trouve modifié à la fois après exposition aux PM₁₀ seules, et de façon majorée, après co-exposition. Il est à noter que cet effet n'est observé qu'avec la plus faible dose de particules, dans les 2 cas. A l'inverse, l'expression de l'IL-8 se trouve pour sa part augmentée uniquement après co-exposition, et de façon dose dépendante, « renforçant » la réponse pro-inflammatoire du pseudo-épithélium sous l'effet des médiateurs libérés par les macrophages.

Divers auteurs ont pour leur part utilisé des modèles de co-cultures associant des cellules épithéliales pulmonaires et des cellules immunitaires. Ainsi, les réponses biologiques obtenues dans un modèle associant des cellules A549 et THP-1 différenciées en macrophages varient notablement par rapport à celles observées sur les monocultures. Dans un premier travail réalisé en conditions immergées, une production significativement majorée de cytokines a ainsi été observée (IL-1 β , IL-6 et IL-8) par rapport aux monocultures après exposition au TiO₂ (Dekali et al., 2013). Une seconde étude a été réalisée en conditions submergées mais aussi à l'IAL, en utilisant du TiO₂ et du CeO₂ (Loret et al., 2016). Ici encore, les co-cultures ont conduit à des réponses cytotoxiques, pro-oxydantes et pro-inflammatoires majorées. He et al. (2021) ont utilisé une co-culture à l'IAL de cellules Calu-3 et de monocytes ou de THP-1 différenciés en macrophages. Après exposition au LPS, la réponse pro-inflammatoire (IL-1 β et TNF- α) se trouvait augmentée au pôle apical de la co-culture.

Dans l'objectif global de développer un modèle *in vitro* aussi représentatif que possible du tractus respiratoire, il y a donc une pertinence à utiliser des cultures réalisées à l'IAL, différenciées afin d'obtenir un système muco-ciliaire fonctionnel associé à une fonction barrière efficace, et combinées à un type cellulaire représentatif de la fonction macrophagique et de l'immunité innée.

Conclusions et Perspectives

Le choix du modèle de cellules NHBE différenciées cultivées et exposées à l'IAL couplé au dispositif Vitrocell® permet de se rapprocher des conditions réelles d'une exposition par inhalation. La présence avérée de nombreux composés chimiques à la surface des poussières domestiques étudiées se traduit par un potentiel mutagène des extraits organiques correspondants. Toutefois, les expositions répétées et cumulées à la fraction PM₁₀ ne conduisent qu'à des réponses cellulaires de faibles amplitudes, indiquant une toxicité et une génotoxicité limitées vis à vis du pseudo-épithélium trachéobronchique. Le potentiel oxydant intrinsèque, la présence d'endotoxines et la diversité des composés chimiques potentiellement toxiques identifiés ne présentent donc qu'un caractère prédictif limité des effets cellulaires.

L'analyse de la littérature montre que l'utilisation de modèles immergés plus classiques conduit à une probable surestimation de la toxicité respiratoire des particules. Le statut différencié de notre modèle, avec établissement d'un mécanisme muco-ciliaire fonctionnel participe à la limitation de ces effets. Par ailleurs, nous avons pris soin de travailler avec une dose d'intérêt compatible avec les niveaux de déposition dans l'arbre respiratoire, mais qui de ce fait est relativement basse (1 µg/cm²/j). La seconde dose utilisée, bien que supérieure, ne constitue pas, pour des raisons techniques inhérentes au dispositif Vitrocell®, à proprement parler une dose « forte ». La prise en compte de la contribution des cellules macrophagiques à la réponse toxique globale répond à une étape supplémentaire dans la représentativité physiologique du modèle *in vitro*. La démarche de co-exposition que nous avons utilisée peut-être une alternative intéressante à l'utilisation de co-cultures plus fréquemment citées dans la littérature, mais qui complexifie la mise en œuvre de tels modèles.

Parmi les limites de notre démarche, il faut noter que les cellules NHBE ne sont issues que d'un seul donneur sain et jeune, mais qui n'est pas représentatif des disparités fonctionnelles au sein d'une population. L'hétérogénéité des pseudo-épithéliums obtenus au bout de 3 semaines de culture (et jusqu'à 5 semaines pour les conditions J11 post-exposition) est plus importante que lors de l'utilisation de cellules en cultures immergées. De ce fait, la variabilité des réponses est plus marquée, nécessitant davantage de répliquats, ce qui n'est pas toujours aisé compte tenu de la lourdeur du protocole. Les mesures des concentrations en cytokines n'ont été réalisées que dans le milieu basal, ce qui suppose un relargage au travers des pores des inserts, mais également leur « migration » au travers du pseudo-épithélium pluristratifié. Certains auteurs ont montré que le relargage des cytokines pouvait être (plus) conséquent sur le versant apical des cultures (He et al., 2021), ce que nous n'avons pas investigué. Enfin, la fenêtre de mesure à J4 a été choisie pour évaluer la réponse cellulaire environ 15 à 18 h après la dernière exposition aux PM₁₀ et intégrer ainsi les éventuelles adaptations du pseudo-épithélium au stress induit et cumulé. Cette fenêtre peut toutefois ne pas être optimale pour objectiver des effets transitoires ou éphémères comme la synthèse d'ARN_m ou la production d'ERO. C'est pourquoi nous avons prévu de compléter ce travail par la mesure des adduits d'oxydation qui représentent un biomarqueur plus intégratif des effets pro-oxydants.

Dans le cadre du projet plus large « ToxIAlMix », nous allons maintenant utiliser une démarche expérimentale équivalente appliquée à des particules de nature différente, également présentes dans des environnements clos. Il s'agit de particules fraîchement collectées par nos soins dans des enceintes souterraines ferroviaires. Le dispositif de collecte utilisé a permis de récupérer des particules de taille comparable (PM₁₀), mais de nature et de composition contrastées. Elles sont en effet riches en composés métalliques, car issues majoritairement des processus de freinage des rames arrivant à quai. Les métaux étant impliqués dans de nombreux mécanismes toxiques mais aussi génotoxiques, nous pourrions ainsi comparer l'impact toxique de ces particules avec celui des particules domestiques, majoritairement chargées de composés organiques. Les niveaux d'adduits d'oxydation seront ainsi mesurés simultanément sur les échantillons issus des expositions aux 2 types de particules. Nous réaliserons également une analyse plus fine et plus complète de la fonction muco-ciliaire, compte tenu de son importance pour l'élimination des substances exogènes au niveau des poumons.

Parmi les évolutions possibles du modèle, et toujours dans un souci de réalisme, il faudra envisager des cycles plus longs d'exposition (« sub-chronique »), ce qui est rendu possible par la conservation prolongée dans ces conditions de culture.

L'ensemble des données collectées permettra d'apporter aux décideurs des éléments contribuant à l'élaboration de normes quant aux conditions acceptables d'exposition aux polluants particulaires en milieu intérieur.

A terme, cette démarche pourra également être appliquée à des cellules primaires pulmonaires pathologiques permettant d'étudier plus spécifiquement l'effet des polluants aériens sur des populations fragilisées atteintes de maladies respiratoires chroniques telles que l'asthme et la BPCO.

Références Bibliographiques

- Abbas, I., Badran, G., Verdin, A., Ledoux, F., Roumie, M., Lo Guidice, J.-M., Courcot, D., & Garçon, G. (2019). In vitro evaluation of organic extractable matter from ambient PM_{2.5} using human bronchial epithelial BEAS-2B cells: Cytotoxicity, oxidative stress, pro-inflammatory response, genotoxicity, and cell cycle deregulation. *Environmental Research*, *171*, 510–522. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.01.052>
- Abbas, I., Garçon, G., Saint-Georges, F., Andre, V., Gosset, P., Billet, S., Goff, J. L., Verdin, A., Mulliez, P., Sichel, F., & Shirali, P. (2013). Polycyclic aromatic hydrocarbons within airborne particulate matter (PM_{2.5}) produced DNA bulky stable adducts in a human lung cell coculture model. *Journal of Applied Toxicology*, *33*(2), 109–119. <https://doi.org/10.1002/jat.1722>
- Adaji, E. E., Ekezie, W., Clifford, M., & Phalkey, R. (2019). Understanding the effect of indoor air pollution on pneumonia in children under 5 in low- and middle-income countries: A systematic review of evidence. *Environmental Science and Pollution Research*, *26*(4), 3208–3225. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-3769-1>
- Adam, D., Perotin, J.-M., Lebargy, F., Birembaut, P., Deslée, G., & Coraux, C. (2014). Régénération de l'épithélium des voies aériennes. *Revue des Maladies Respiratoires*, *31*(4), 300–311. <https://doi.org/10.1016/j.rmr.2013.11.001>
- Alfaro-Moreno, E., Nawrot, T. S., Vanaudenaerde, B. M., Hoylaerts, M. F., Vanoirbeek, J. A., Nemery, B., & Hoet, P. H. M. (2008). Co-cultures of multiple cell types mimic pulmonary cell communication in response to urban PM₁₀. *European Respiratory Journal*, *32*(5), 1184–1194. <https://doi.org/10.1183/09031936.00044008>
- Ali, M. H., Schlidt, S. A., Chandel, N. S., Hynes, K. L., Schumacker, P. T., & Gewertz, B. L. (1999). Endothelial permeability and IL-6 production during hypoxia: Role of ROS in signal transduction. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, *277*(5), L1057–L1065. <https://doi.org/10.1152/ajplung.1999.277.5.L1057>
- Almeida-Silva, M., Wolterbeek, H. T., & Almeida, S. M. (2014). Elderly exposure to indoor air pollutants. *Atmospheric Environment*, *85*, 54–63. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2013.11.061>

- Anamthathmakula, P., & Winuthayanon, W. (2021). Prostaglandin-Endoperoxide Synthase 2 (PTGS2) in the Oviduct: Roles in Fertilization and Early Embryo Development. *Endocrinology*, *162*(4), bqab025. <https://doi.org/10.1210/endo/bqab025>
- ANSES. (2016). L'amiante [Internet]. [Cité 30 juin 2020]. Disponible sur : <https://www.anses.fr/fr/content/l%E2%80%99amiante>
- ANSES. (2018). Valeurs Guides de qualité d'Air Intérieur (VGAi) [Internet]. [Cité 23 mai 2020]. Disponible sur : <https://www.anses.fr/fr/content/valeurs-guides-de-qualit%C3%A9-d%E2%80%99air-int%C3%A9rieur-vgai>.
- ANSES. (2019). Exposition aux poussières sédimentées dans les environnements intérieurs - Rapport d'expertise collective [Internet]. [Cité 17 avril 2020]. Disponible sur : <https://www.anses.fr/fr/system/files/AIR2017SA0192Ra.pdf>
- ANSES. (2023). Les particules de l'air ambiant extérieur. [Cité 16 juin 2023]. Disponible sur : <https://www.anses.fr/fr/content/pollution-de-l%E2%80%99air-nouvelles-connaissances-sur-les-particules-de-l%E2%80%99air-ambiant-et-l%E2%80%99impact>
- Apte, K., & Salvi, S. (2016). Household air pollution and its effects on health. *F1000Research*, *5*. <https://doi.org/10.12688/f1000research.7552.1>
- Arora, S., Dev, K., Agarwal, B., Das, P., & Syed, M. A. (2018). Macrophages: Their role, activation and polarization in pulmonary diseases. *Immunobiology*, *223*(4–5), 383–396. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2017.11.001>
- Badran, G., Verdin, A., Grare, C., Abbas, I., Achour, D., Ledoux, F., Roumie, M., Cazier, F., Courcot, D., Lo Guidice, J.-M., & Garçon, G. (2020). Toxicological appraisal of the chemical fractions of ambient fine (PM_{2.5-0.3}) and quasi-ultrafine (PM_{0.3}) particles in human bronchial epithelial BEAS-2B cells. *Environmental Pollution*, *263*, 114620. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114620>
- Becker, S., Mundandhara, S., Devlin, R. B., & Madden, M. (2005). Regulation of cytokine production in human alveolar macrophages and airway epithelial cells in response to ambient air pollution particles: Further mechanistic studies. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *207*(2, Supplement), 269–275. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2005.01.023>

- Belo, J., Carreiro-Martins, P., Papoila, A. L., Palmeiro, T., Caires, I., Alves, M., Nogueira, S., Aguiar, F., Mendes, A., Cano, M., Botelho, M. A., & Neuparth, N. (2019). The impact of indoor air quality on respiratory health of older people living in nursing homes: Spirometric and exhaled breath condensate assessments. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, *54*(12), 1153–1158. <https://doi.org/10.1080/10934529.2019.1637206>
- Benam, K. H., Villenave, R., Lucchesi, C., Varone, A., Hubeau, C., Lee, H.-H., Alves, S. E., Salmon, M., Ferrante, T. C., Weaver, J. C., Bahinski, A., Hamilton, G. A., & Ingber, D. E. (2016). Small airway-on-a-chip enables analysis of human lung inflammation and drug responses in vitro. *Nature Methods*, *13*(2), Article 2. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3697>
- Benbrahim-Tallaa, L., Baan, R. A., Grosse, Y., Lauby-Secretan, B., El Ghissassi, F., Bouvard, V., Guha, N., Loomis, D., & Straif, K. (2012). Carcinogenicity of diesel-engine and gasoline-engine exhausts and some nitroarenes. *The Lancet Oncology*, *13*(7), 663–664. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(12\)70280-2](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(12)70280-2)
- Bengalli, R., Zerboni, A., Marchetti, S., Longhin, E., Priola, M., Camatini, M., & Mantecca, P. (2019). In vitro pulmonary and vascular effects induced by different diesel exhaust particles. *Toxicology Letters*, *306*, 13–24. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2019.01.017>
- BéruBé, K., Aufderheide, M., Breheny, D., Clothier, R., Combes, R., Forbes, B., Gaça, M., Gray, A., Hall, I., Kelly, M., Lethem, M., Liebsch, M., Merolla, L., Morin, J.-P., Seagrave, J., Swartz, M. A., Tetley, T. D., & Umachandran, M. (2009). *In Vitro Models of Inhalation Toxicity and Disease*. 54.
- Bhowmick, R., & Gappa-Fahlenkamp, H. (2016). Cells and Culture Systems Used to Model the Small Airway Epithelium. *Lung*, *194*(3), 419–428. <https://doi.org/10.1007/s00408-016-9875-2>
- Billet, S., Landkocz, Y., Martin, P. J., Verdin, A., Ledoux, F., Lepers, C., André, V., Cazier, F., Sichel, F., Shirali, P., Gosset, P., & Courcot, D. (2018a). Chemical characterization of fine and ultrafine PM, direct and indirect genotoxicity of PM and their organic extracts on pulmonary cells. *Journal of Environmental Sciences*, *71*, 168–178. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2018.04.022>

- Billet, S., Landkocz, Y., Martin, P. J., Verdin, A., Ledoux, F., Lepers, C., André, V., Cazier, F., Sichel, F., Shirali, P., Gosset, P., & Courcot, D. (2018b). Chemical characterization of fine and ultrafine PM, direct and indirect genotoxicity of PM and their organic extracts on pulmonary cells. *Journal of Environmental Sciences*, *71*, 168–178. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2018.04.022>
- 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>
- Bocchi, C., Bazzini, C., Fontana, F., Pinto, G., Martino, A., & Cassoni, F. (2016). Characterization of urban aerosol: Seasonal variation of mutagenicity and genotoxicity of PM_{2.5}, PM₁ and semi-volatile organic compounds. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, *809*, 16–23. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2016.07.007>
- Boei, J. J. W. A., Vermeulen, S., Klein, B., Hiemstra, P. S., Verhoosel, R. M., Jennen, D. G. J., Lahoz, A., Gmuender, H., & Vrieling, H. (2017). Xenobiotic metabolism in differentiated human bronchial epithelial cells. *Archives of Toxicology*, *91*(5), 2093–2105. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1868-7>
- 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>
- Bose, S., Rivera-Mariani, F., Chen, R., Williams, D., Belli, A., Aloe, C., McCormack, M. C., Breyse, P. N., & Hansel, N. N. (2016). Domestic exposure to endotoxin and respiratory morbidity in former smokers with COPD. *Indoor Air*, *26*(5), 734–742. <https://doi.org/10.1111/ina.12264>
- Boublil, L., Assémat, E., Borot, M.-C., Boland, S., Martinon, L., Sciare, J., & Baeza-Squiban, A. (2013). Development of a repeated exposure protocol of human bronchial epithelium in vitro to study the long-term effects of atmospheric particles. *Toxicology in Vitro*, *27*(2), 533–542. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2012.11.008>

- Braakhuis, H. M., He, R., Vandebriel, R. J., Gremmer, E. R., Zwart, E., Vermeulen, J. P., Fokkens, P., Boere, J., Gosens, I., & Cassee, F. R. (2020). An Air-liquid Interface Bronchial Epithelial Model for Realistic, Repeated Inhalation Exposure to Airborne Particles for Toxicity Testing. *Journal of Visualized Experiments*, 159. <https://doi.org/10.3791/61210>
- Bustamante-Marin, X. M., & Ostrowski, L. E. (2017). Cilia and Mucociliary Clearance. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 9(4), a028241. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028241>
- Butte, W., & Heinzow, B. (2002). Pollutants in house dust as indicators of indoor contamination. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 175, 1–46.
- Calcabrini, A., Meschini, S., Marra, M., Falzano, L., Colone, M., De Berardis, B., Paoletti, L., Arancia, G., & Fiorentini, C. (2004). Fine environmental particulate engenders alterations in human lung epithelial A549 cells. *Environmental Research*, 95(1), 82–91. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2003.07.011>
- Cao, Z., Wang, M., Chen, Q., Zhu, C., Jie, J., Li, X., Dong, X., Miao, Z., Shen, M., & Bu, Q. (2019). Spatial, seasonal and particle size dependent variations of PAH contamination in indoor dust and the corresponding human health risk. *Science of The Total Environment*, 653, 423–430. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.10.413>
- Casarett, L. J., Doull, J., & Klaassen, C. D. (Eds.). (2001). *Casarett and Doull's toxicology: The basic science of poisons* (6th ed). McGraw-Hill, Medical Publishing Division.
- Charrier, J. G., & Anastasio, C. (2012). On dithiothreitol (DTT) as a measure of oxidative potential for ambient particles: Evidence for the importance of soluble transition metals. *Atmospheric Chemistry and Physics*, 12(19), 9321–9333. <https://doi.org/10.5194/acp-12-9321-2012>
- Cheng, Y., Engling, G., He, K., Duan, F., Du, Z., Ma, Y., Liang, L., Lu, Z., Liu, J., Zheng, M., & Weber, R. J. (2014). The characteristics of Beijing aerosol during two distinct episodes: Impacts of biomass burning and fireworks. *Environmental Pollution (Barking, Essex : 1987)*, 185, 149–157. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.10.037>
- Chithra V. S. & Nagendra Saragur Madanayak Shiva. (2018). Source Identification of Indoor Particulate Matter and Health Risk Assessment in School Children. *Journal of Hazardous,*

Toxic, and Radioactive Waste, 22(2), 04018002. [https://doi.org/10.1061/\(ASCE\)HZ.2153-5515.0000390](https://doi.org/10.1061/(ASCE)HZ.2153-5515.0000390)

- Chortarea, S., Clift, M. J. D., Vanhecke, D., Endes, C., Wick, P., Petri-Fink, A., & Rothen-Rutishauser, B. (2015). Repeated exposure to carbon nanotube-based aerosols does not affect the functional properties of a 3D human epithelial airway model. *Nanotoxicology*, 9(8), 983–993. <https://doi.org/10.3109/17435390.2014.993344>
- Chung, M. Y., Lazaro, R. A., Lim, D., Jackson, J., Lyon, J., Rendulic, D., & Hasson, A. S. (2006). Aerosol-Borne Quinones and Reactive Oxygen Species Generation by Particulate Matter Extracts. *Environmental Science & Technology*, 40(16), 4880–4886. <https://doi.org/10.1021/es0515957>
- Corsini, E., Ozgen, S., Papale, A., Galbiati, V., Lonati, G., Fermo, P., Corbella, L., Valli, G., Bernardoni, V., Dell'Acqua, M., Becagli, S., Caruso, D., Vecchi, R., Galli, C. L., & Marinovich, M. (2017). Insights on wood combustion generated proinflammatory ultrafine particles (UFP). *Toxicology Letters*, 266, 74–84. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2016.12.005>
- 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>
- Cyprowski, M., Buczyńska, A., & Szadkowska-Stańczyk, I. (2013). Indoor allergens in settled dust from kindergartens in city of Łódź, Poland. *International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health*, 26(6), 890–899. <https://doi.org/10.2478/s13382-013-0153-8>
- Danielsen, P. H., Loft, S., Kocbach, A., Schwarze, P. E., & Møller, P. (2009). Oxidative damage to DNA and repair induced by Norwegian wood smoke particles in human A549 and THP-1 cell lines. *Mutation Research*, 674(1–2), 116–122. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2008.10.014>
- Dassonville, C., Derbez, M., Lucas, J.-P., Malingre, L., Ramalho, O., Riberon, J., Rousselle, D., Wei, W., Wyart, G., Mandin, C., Cochet, V., Grégoire, A., Sivanantham, S., Achille, J., & Berthineau, B. (2019). QUALITÉ DE L'AIR INTÉRIEUR ET CONTAMINATION DES POUSSIÈRES DÉPOSÉES AU SOL DANS LES ÉCOLES EN FRANCE - Rapport final [Internet]. [Cité 30 janvier

- 2023]. Disponible sur : [file:///Users/carineelhajjar/Downloads/Campagne-OQAI-Ecoles_Rapport-final-Contamination-Air-Poussieres%20\(1\).pdf](file:///Users/carineelhajjar/Downloads/Campagne-OQAI-Ecoles_Rapport-final-Contamination-Air-Poussieres%20(1).pdf)
- De Lagarde, V. M., Chevalier, L., Méausoone, C., Cazier, F., Dewaele, D., Cazier-Dennin, F., Janona, M., Logie, C., Achard, S., André, V., Rogez-Florent, T., Monteil, C., & Corbière, C. (2022). *Toxicity of acute or repeated exposures to particles from pyrotechnic smokes in normal human bronchial epithelial (NHBE) cells 3D culture* [Preprint]. In Review. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-2213612/v1>
- Deering-Rice, C. E., Memon, T., Lu, Z., Romero, E. G., Cox, J., Taylor-Clark, T., Veranth, J. M., & Reilly, C. A. (2019). Differential Activation of TRPA1 by Diesel Exhaust Particles: Relationships between Chemical Composition, Potency, and Lung Toxicity. *Chemical Research in Toxicology*, 32(6), 1040–1050. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.8b00375>
- Dekali, S., Divetain, A., Kortulewski, T., Vanbaelinghem, J., Gamez, C., Rogerieux, F., Lacroix, G., & Rat, P. (2013). Cell cooperation and role of the P2X₇ receptor in pulmonary inflammation induced by nanoparticles. *Nanotoxicology*, 7(8), 1302–1314. <https://doi.org/10.3109/17435390.2012.735269>
- 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_{2.5–0.3}) and toxicological effects in human bronchial epithelial cells (BEAS-2B). *Environmental Research*, 137, 256–267. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2014.12.015>
- Dieme, D., Cabral-Ndior, M., Garçon, G., Verdin, A., Billet, S., Cazier, F., Courcot, D., Diouf, A., & Shirali, P. (2012). Relationship between physicochemical characterization and toxicity of fine particulate matter (PM_{2.5}) collected in Dakar city (Senegal). *Environmental Research*, 113, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2011.11.009>
- Ding, X., Wang, M., Chu, H., Chu, M., Na, T., Wen, Y., Wu, D., Han, B., Bai, Z., Chen, W., Yuan, J., Wu, T., Hu, Z., Zhang, Z., & Shen, H. (2014). Global gene expression profiling of human bronchial epithelial cells exposed to airborne fine particulate matter collected from

- Wuhan, China. *Toxicology Letters*, 228(1), 25–33.
<https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2014.04.010>
- Dominici, L., Guerrero, E., Villarini, M., Fatigoni, C., Moretti, M., Blasi, P., & Monarca, S. (2013). Evaluation of In Vitro Cytotoxicity and Genotoxicity of Size-Fractionated Air Particles Sampled during Road Tunnel Construction. *BioMed Research International*, 2013.
<https://doi.org/10.1155/2013/345724>
- Duquenne, P., Marchand, G., & Duchaine, C. (2011). Mesure des endotoxines dans les aérosols biologiques aux postes de travail [Internet]. [Cité 30 janvier 2022]. Disponible sur :
<https://hal-lara.archives-ouvertes.fr/hal-01420336/document>
- Ekstrand-Hammarström, B., Magnusson, R., Österlund, C., Andersson, B. M., Bucht, A., & Wingfors, H. (2013). Oxidative stress and cytokine expression in respiratory epithelial cells exposed to well-characterized aerosols from Kabul, Afghanistan. *Toxicology in Vitro*, 27(2), 825–833. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2012.12.022>
- El Hajjar, C., Rogez-Florent, T., Seguin, V., Verdin, A., Garon, D., Pottier, I., & André, V. (2022). Intrinsic Characteristics and Biological Effects of Standard Reference Indoor Dust SRM® 2585 and Its Inhalable Subfractions PM10 and PM2.5. *Atmosphere*, 13(11), 1818.
<https://doi.org/10.3390/atmos13111818>
- Epithelix. (n.d.). ALVEOLAIR™ (AA) : IN VITRO 3D HUMAN ALVEOLAR EPITHELIUM [Internet]. [Cité 27 avril 2023]. Disponible sur : <https://www.epithelix.com/products/alveolaiR>
- European Commission. (2020). OFFICAIR project - Final Report Summary [Internet]. [Cité 27 avril 2023]. Disponible sur : <https://cordis.europa.eu/project/id/265267/reporting>.
- Falcon-Rodriguez, C. I., Osornio-Vargas, A. R., Sada-Ovalle, I., & Segura-Medina, P. (2016). Aeroparticles, Composition, and Lung Diseases. *Frontiers in Immunology*, 7.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00003>
- Fang, T., Verma, V., Bates, J. T., Abrams, J., Klein, M., Strickland, M. J., Sarnat, S. E., Chang, H. H., Mulholland, J. A., Tolbert, P. E., Russell, A. G., & Weber, R. J. (2016). Oxidative potential of ambient water-soluble PM_{2.5} in the southeastern United States: Contrasts in sources and health associations between ascorbic acid (AA) and dithiothreitol (DTT) assays.

- Atmospheric Chemistry and Physics*, 16(6), 3865–3879. <https://doi.org/10.5194/acp-16-3865-2016>
- Friesen, A., Fritsch-Decker, S., Hufnagel, M., Mülhopt, S., Stapf, D., Weiss, C., & Hartwig, A. (2022). Gene Expression Profiling of Mono- and Co-Culture Models of the Respiratory Tract Exposed to Crystalline Quartz under Submerged and Air-Liquid Interface Conditions. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(14), 7773. <https://doi.org/10.3390/ijms23147773>
- Gangwar, R. S., Bevan, G. H., Palanivel, R., Das, L., & Rajagopalan, S. (2020). Oxidative stress pathways of air pollution mediated toxicity: Recent insights. *Redox Biology*, 34, 101545. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101545>
- Ghio, A. J., Dailey, L. A., Soukup, J. M., Stonehuerner, J., Richards, J. H., & Devlin, R. B. (2013). Growth of human bronchial epithelial cells at an air-liquid interface alters the response to particle exposure. *Particle and Fibre Toxicology*, 10, 25. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-10-25>
- Graf, J., Trautmann-Rodriguez, M., Sabnis, S., Kloxin, A. M., & Fromen, C. A. (2023). On the path to predicting immune responses in the lung: Modeling the pulmonary innate immune system at the air-liquid interface (ALI). *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 191, 106596. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2023.106596>
- Gratton, S. E. A., Ropp, P. A., Pohlhaus, P. D., Luft, J. C., Madden, V. J., Napier, M. E., & DeSimone, J. M. (2008). The effect of particle design on cellular internalization pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(33), 11613–11618. <https://doi.org/10.1073/pnas.0801763105>
- Gualtieri, M., Grollino, M. G., Consales, C., Costabile, F., Manigrasso, M., Avino, P., Aufderheide, M., Cordelli, E., Di Liberto, L., Petralia, E., Raschellà, G., Stracquadanio, M., Wiedensohler, A., Pacchierotti, F., & Zanini, G. (2018). Is it the time to study air pollution effects under environmental conditions? A case study to support the shift of in vitro toxicology from the bench to the field. *Chemosphere*, 207, 552–564. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.05.130>

- Guan, W.-J., Zheng, X.-Y., Chung, K. F., & Zhong, N.-S. (2016). Impact of air pollution on the burden of chronic respiratory diseases in China: Time for urgent action. *Lancet (London, England)*, 388(10054), 1939–1951. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)31597-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31597-5)
- Gustafsson, Å., Krais, A. M., Gorzsás, A., Lundh, T., & Gerde, P. (2018). Isolation and characterization of a respirable particle fraction from residential house-dust. *Environmental Research*, 161, 284–290. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2017.10.049>
- Hastedt, J. E., Bäckman, P., Clark, A. R., Doub, W., Hickey, A., Hochhaus, G., Kuehl, P. J., Lehr, C.-M., Mauser, P., McConville, J., Niven, R., Sakagimi, M., & Weers, J. G. (2016). Scope and relevance of a pulmonary biopharmaceutical classification system AAPS/FDA/USP Workshop March 16-17th, 2015 in Baltimore, MD. *AAPS Open*, 2(1), 1. <https://doi.org/10.1186/s41120-015-0002-x>
- Hawley, B., L'Orange, C., Olsen, D. B., Marchese, A. J., & Volckens, J. (2014). Oxidative stress and aromatic hydrocarbon response of human bronchial epithelial cells exposed to petro- or biodiesel exhaust treated with a diesel particulate filter. *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology*, 141(2), 505–514. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfu147>
- Hawley, B., Schaeffer, J., Poole, J. A., Dooley, G. P., Reynolds, S., & Volckens, J. (2015). Differential Response of Human Nasal and Bronchial Epithelial Cells upon Exposure to Size-fractionated Dairy Dust. *Journal of Toxicology and Environmental Health. Part A*, 78(9), 583–594. <https://doi.org/10.1080/15287394.2015.1015699>
- HCSP. (2013). VALEURS REPÈRES D'AIDE À LA GESTION DANS L'AIR DES ESPACES CLOS LES PARTICULES - Rapport. [Internet]. [Cité 15 mars 2023]. Disponible sur: <https://www.hcsp.fr/Explore.cgi/avisrapportsdomaine?clefr=371>
- He, R.-W., Braakhuis, H. M., Vandebriel, R. J., Staal, Y. C. M., Gremmer, E. R., Fokkens, P. H. B., Kemp, C., Vermeulen, J., Westerink, R. H. S., & Cassee, F. R. (2021). Optimization of an air-liquid interface in vitro cell co-culture model to estimate the hazard of aerosol exposures. *Journal of Aerosol Science*, 153, 105703. <https://doi.org/10.1016/j.jaerosci.2020.105703>

- He, R.-W., Li, Y.-Z., Xiang, P., Li, C., Cui, X.-Y., & Ma, L. Q. (2018). Impact of particle size on distribution and human exposure of flame retardants in indoor dust. *Environmental Research*, *162*, 166–172. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2017.12.014>
- Hellack, B., Yang, A., Cassee, F. R., Janssen, N. A. H., Schins, R. P. F., & Kuhlbusch, T. A. J. (2014). Intrinsic hydroxyl radical generation measurements directly from sampled filters as a metric for the oxidative potential of ambient particulate matter. *Journal of Aerosol Science*, *72*, 47–55. <https://doi.org/10.1016/j.jaerosci.2014.02.003>
- 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>
- Hirani, N., Antonicelli, F., Strieter, R. M., Wiesener, M. S., Ratcliffe, P. J., Haslett, C., & Donnelly, S. C. (2001). The regulation of interleukin-8 by hypoxia in human macrophages—A potential role in the pathogenesis of the acute respiratory distress syndrome (ARDS). *Molecular Medicine*, *7*(10), 685–697.
- Horick, N., Weller, E., Milton, D. K., Gold, D. R., Li, R., & Spiegelman, D. (2006). Home Endotoxin Exposure and Wheeze in Infants: Correction for Bias Due to Exposure Measurement Error. *Environmental Health Perspectives*, *114*(1), 135–140. <https://doi.org/10.1289/ehp.7981>
- 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>
- H Huh, D., Matthews, B. D., Mammoto, A., Montoya-Zavala, M., Yuan Hsin, H., & Ingber, D. E. (2010). Reconstituting Organ-Level Lung Functions on a Chip. *Science (New York, N.Y.)*, *328*(5986), 1662–1668. <https://doi.org/10.1126/science.1188302>
- Huh, D., Hamilton, G. A., & Ingber, D. E. (2011). From 3D cell culture to organs-on-chips. *Trends in Cell Biology*, *21*(12), 745–754. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2011.09.005>
- Hussein, T., Wierzbicka, A., Löndahl, J., Lazaridis, M., & Hänninen, O. (2015). Indoor aerosol modeling for assessment of exposure and respiratory tract deposited dose. *Atmospheric Environment*, *106*, 402–411. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2014.07.034>

- NRS. (2016). Valeurs limites d'exposition professionnelle aux agents chimiques en France [Internet]. [Cité 30 juin 2020]. Disponible sur : <https://www.inrs.fr/media.html?refINRS=ED%206443>
- Iwasaki, A., Foxman, E. F., & Molony, R. D. (2017). Early local immune defences in the respiratory tract. *Nature Reviews Immunology*, *17*(1), 7–20. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.117>
- Janbazacyabar, H., Van Bergenhenegouwen, J., Varasteh, S., Garssen, J., Folkerts, G., & Braber, S. (2022). Repeated exposure of bronchial epithelial cells to particulate matter increases allergen-induced cytokine release and permeability. *Cytokine*, *154*, 155878. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2022.155878>
- Jantunen, M., Kephelopoulos, S., Carrer, P., & Oliveira Fernandes, E. (2011). [Internet]. [Cité 10 juin 2022]. Disponible sur : <https://op.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/4beb6973-83f8-49a9-a6c8-d31a6d75a247>
- Juarez Facio, A. T., Yon, J., Corbière, C., Rogez-Florent, T., Castilla, C., Lavanant, H., Mignot, M., Devouge-Boyer, C., Logie, C., Chevalier, L., Vaugeois, J.-M., & Monteil, C. (2022). Toxicological impact of organic ultrafine particles (UFPs) in human bronchial epithelial BEAS-2B cells at air-liquid interface. *Toxicology in Vitro*, *78*, 105258. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2021.105258>
- Kang, Y., Cheung, K. C., & Wong, M. H. (2010). The use of cytokine array to examine cytokine profiles of two human cell lines exposed to indoor dust. *Toxicology Letters*, *199*(3), 301–307. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2010.09.012>
- Kasurinen, S., Jalava, P. I., Happonen, M. S., Sippula, O., Uski, O., Koponen, H., Orasche, J., Zimmermann, R., Jokiniemi, J., & Hirvonen, M.-R. (2017). Particulate emissions from the combustion of birch, beech, and spruce logs cause different cytotoxic responses in A549 cells. *Environmental Toxicology*, *32*(5), 1487–1499. <https://doi.org/10.1002/tox.22369>
- Khan, Y. S., & Lynch, D. T. (2023). Histology, Lung [E-book]. *StatPearls Publishing*. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK534789/>
- King, L. E., & Weber, R. J. (2013). Development and testing of an online method to measure ambient fine particulate reactive oxygen species (ROS) based on the 2',7'-

- dichlorofluorescein (DCFH) assay. *Atmospheric Measurement Techniques*, 6(7), 1647–1658. <https://doi.org/10.5194/amt-6-1647-2013>
- Klein, S. G., Serchi, T., Hoffmann, L., Blömeke, B., & Gutleb, A. C. (2013). An improved 3D tetra-culture system mimicking the cellular organisation at the alveolar barrier to study the potential toxic effects of particles on the lung. *Particle and Fibre Toxicology*, 10, 31. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-10-31>
- Kulshrestha, A., Satsangi, P. G., Masih, J., & Taneja, A. (2009). Metal concentration of PM_{2.5} and PM₁₀ particles and seasonal variations in urban and rural environment of Agra, India. *Science of The Total Environment*, 407(24), 6196–6204. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2009.08.050>
- Lacroix, G., Koch, W., Ritter, D., Gutleb, A. C., Larsen, S. T., Loret, T., Zanetti, F., Constant, S., Chortarea, S., Rothen-Rutishauser, B., Hiemstra, P. S., Frejafon, E., Hubert, P., Gribaldo, L., Kearns, P., Aublant, J.-M., Diabaté, S., Weiss, C., de Groot, A., & Kooter, I. (2018). Air–Liquid Interface In Vitro Models for Respiratory Toxicology Research: Consensus Workshop and Recommendations. *Applied In Vitro Toxicology*, 4(2), 91–106. <https://doi.org/10.1089/aivt.2017.0034>
- Lan, Y., Ng, C. T., Ong, C. N., Yu, L. E., & Bay, B. H. (2021). Transcriptomic analysis identifies dysregulated genes and functional networks in human small airway epithelial cells exposed to ambient PM_{2.5}. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 208, 111702. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111702>
- Larsson, K., & Berglund, M. (2018). Children’s exposure to chemicals in indoor environments - A literature survey of chemicals in dust [Internet]. [Cité 25 avril 2020]. Disponible sur : <http://www.diva-portal.org/smash/get/diva2:1220692/FULLTEXT01.pdf>
- Lawson, J. A., Dosman, J. A., Rennie, D. C., Beach, J., Newman, S. C., & Senthilselvan, A. (2011). Relationship of endotoxin and tobacco smoke exposure to wheeze and diurnal peak expiratory flow variability in children and adolescents. *Respirology (Carlton, Vic.)*, 16(2), 332–339. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1843.2010.01911.x>

- Lechanteur, A., Das Neves, J., & Sarmento, B. (2018). The role of mucus in cell-based models used to screen mucosal drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *124*, 50–63. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2017.07.019>
- Leclercq, B., Happillon, M., Antherieu, S., Hardy, E. M., Alleman, L. Y., Grova, N., Perdrix, E., Appenzeller, B. M., Lo Guidice, J.-M., Coddeville, P., & Garçon, G. (2016). Differential responses of healthy and chronic obstructive pulmonary diseased human bronchial epithelial cells repeatedly exposed to air pollution-derived PM4. *Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)*, *218*, 1074–1088. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.08.059>
- Leclercq, B., Kluza, J., Antherieu, S., Sotty, J., Alleman, L. Y., Perdrix, E., Loyens, A., Coddeville, P., Lo Guidice, J.-M., Marchetti, P., & Garçon, G. (2018). Air pollution-derived PM2.5 impairs mitochondrial function in healthy and chronic obstructive pulmonary diseased human bronchial epithelial cells. *Environmental Pollution*, *243*, 1434–1449. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.09.062>
- Leclercq, B., Platel, A., Antherieu, S., Alleman, L. Y., Hardy, E. M., Perdrix, E., Grova, N., Riffault, V., Appenzeller, B. M., Happillon, M., Nessler, 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>
- Lee, R. E., Reidel, B., Nelson, M. R., Macdonald, J. K., Kesimer, M., & Randell, S. H. (2023). Air-Liquid interface cultures to model drug delivery through the mucociliary epithelial barrier. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *198*, 114866. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2023.114866>
- Lee, S., Na, H. G., Choi, Y. S., Bae, C. H., Song, S.-Y., & Kim, Y.-D. (2022). SARS-CoV-2 Induces Expression of Cytokine and MUC5AC/5B in Human Nasal Epithelial Cell through ACE 2 Receptor. *BioMed Research International*, *2022*, 2743046. <https://doi.org/10.1155/2022/2743046>
- Legifrance. (2016). Code de l'environnement [Internet]. [Cité 20 avril 2020]. Disponible sur : <https://www.legifrance.gouv.fr/codes/id/LEGISCTA000022495541>

- Leni, Z., Cassagnes, L. E., Daellenbach, K. R., Haddad, I. E., Vlachou, A., Uzu, G., Prévôt, A. S. H., Jaffrezo, J.-L., Baumlin, N., Salathe, M., Baltensperger, U., Dommen, J., & Geiser, M. (2020). Oxidative stress-induced inflammation in susceptible airways by anthropogenic aerosol. *PLOS ONE*, *15*(11), e0233425. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0233425>
- Leni, Z., Künzi, L., & Geiser, M. (2020). Air pollution causing oxidative stress. *Current Opinion in Toxicology*, *20–21*, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.cotox.2020.02.006>
- Lenz, A.-G., Karg, E., Brendel, E., Hinze-Heyn, H., Maier, K. L., Eickelberg, O., Stoeger, T., & Schmid, O. (2013). Inflammatory and Oxidative Stress Responses of an Alveolar Epithelial Cell Line to Airborne Zinc Oxide Nanoparticles at the Air-Liquid Interface: A Comparison with Conventional, Submerged Cell-Culture Conditions. *BioMed Research International*, *2013*, 652632. <https://doi.org/10.1155/2013/652632>
- Leung, T. F., Wong, Y. S., Chan, I. H. S., Yung, E., Wong, C. K., Lam, C. W. K., & Wong, G. W. K. (2010). Indoor determinants of endotoxin and dust mite exposures in Hong Kong homes with asthmatic children. *International Archives of Allergy and Immunology*, *152*(3), 279–287. <https://doi.org/10.1159/000283039>
- Lewis, R. D., Ong, K. H., Emo, B., Kennedy, J., Kesavan, J., & Elliot, M. (2018). Resuspension of house dust and allergens during walking and vacuum cleaning. *Journal of Occupational and Environmental Hygiene*, *15*(3), 235–245. <https://doi.org/10.1080/15459624.2017.1415438>
- Lioy, P. J., Freeman, N. C. G., & Millette, J. R. (2002). Dust: A metric for use in residential and building exposure assessment and source characterization. *Environmental Health Perspectives*, *110*(10), 969–983.
- Litonjua, A. A., Milton, D. K., Celedon, J. C., Ryan, L., Weiss, S. T., & Gold, D. R. (2002). A longitudinal analysis of wheezing in young children: The independent effects of early life exposure to house dust endotoxin, allergens, and pets. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *110*(5), 736–742. <https://doi.org/10.1067/mai.2002.128948>
- Liu, Y., Ma, J., Yan, H., Ren, Y., Wang, B., Lin, C., & Liu, X. (2016). Bioaccessibility and health risk assessment of arsenic in soil and indoor dust in rural and urban areas of Hubei province,

- China. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 126, 14–22.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.11.037>
- Loret, T., Peyret, E., Dubreuil, M., Aguerre-Chariol, O., Bressot, C., le Bihan, O., Amodeo, T., Trouiller, B., Braun, A., Egles, C., & Lacroix, G. (2016). Air-liquid interface exposure to aerosols of poorly soluble nanomaterials induces different biological activation levels compared to exposure to suspensions. *Particle and Fibre Toxicology*, 13(1), 58.
<https://doi.org/10.1186/s12989-016-0171-3>
- Loret, T., Rogerieux, F., Trouiller, B., Braun, A., Egles, C., & Lacroix, G. (2018). Predicting the in vivo pulmonary toxicity induced by acute exposure to poorly soluble nanomaterials by using advanced in vitro methods. *Particle and Fibre Toxicology*, 15, 25.
<https://doi.org/10.1186/s12989-018-0260-6>
- Lu, F., Xu, D., Cheng, Y., Dong, S., Guo, C., Jiang, X., & Zheng, X. (2015). Systematic review and meta-analysis of the adverse health effects of ambient PM_{2.5} and PM₁₀ pollution in the Chinese population. *Environmental Research*, 136, 196–204.
<https://doi.org/10.1016/j.envres.2014.06.029>
- Luo, F., Guo, H., Yu, H., Li, Y., Feng, Y., & Wang, Y. (2021). PM_{2.5} organic extract mediates inflammation through the ER β pathway to contribute to lung carcinogenesis in vitro and vivo. *Chemosphere*, 263, 127867. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127867>
- Madjdpour, C., Jewell, U. R., Kneller, S., Ziegler, U., Schwendener, R., Booy, C., Kläusli, L., Pasch, T., Schimmer, R. C., & Beck-Schimmer, B. (2003). Decreased alveolar oxygen induces lung inflammation. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 284(2), L360–L367. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00158.2002>
- Mandin, C., Trantallidi, M., Cattaneo, A., Canha, N., Mihucz, V. G., Szigeti, T., Mabilia, R., Perreca, E., Spinazzè, A., Fossati, S., De Kluizenaar, Y., Cornelissen, E., Sakellaris, I., Saraga, D., Hänninen, O., De Oliveira Fernandes, E., Ventura, G., Wolkoff, P., Carrer, P., & Bartzis, J. (2017). Assessment of indoor air quality in office buildings across Europe – The OFFICAIR study. *Science of The Total Environment*, 579, 169–178.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.10.238>

- Maragkidou, A., Jaghbeir, O., Hämeri, K., & Hussein, T. (2018). Aerosol particles (0.3–10 µm) inside an educational workshop–Emission rate and inhaled deposited dose. *Building and Environment*, *140*, 80–89. <https://doi.org/10.1016/j.buildenv.2018.05.031>
- Marchetti, S., Longhin, E., Bengalli, R., Avino, P., Stabile, L., Buonanno, G., Colombo, A., Camatini, M., & Mantecca, P. (2019). In vitro lung toxicity of indoor PM10 from a stove fueled with different biomasses. *Science of The Total Environment*, *649*, 1422–1433. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.08.249>
- Marques dos Santos, M., Tan Pei Fei, M., Li, C., Jia, S., & Snyder, S. A. (2022). Cell-line and culture model specific responses to organic contaminants in house dust: Cell bioenergetics, oxidative stress, and inflammation endpoints. *Environment International*, *167*, 107403. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2022.107403>
- Marrazzo, P., Maccari, S., Taddei, A., Bevan, L., Telford, J., Soriani, M., & Pezzicoli, A. (2016). 3D Reconstruction of the Human Airway Mucosa In Vitro as an Experimental Model to Study NTHi Infections. *PLoS ONE*, *11*(4), e0153985. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153985>
- McWhinney, R. D., Badali, K., Liggio, J., Li, S.-M., & Abbatt, J. P. D. (2013). Filterable redox cycling activity: A comparison between diesel exhaust particles and secondary organic aerosol constituents. *Environmental Science & Technology*, *47*(7), 3362–3369. <https://doi.org/10.1021/es304676x>
- Ministère de la Santé et de la Prévention. (2023). Effets sanitaires et valeurs guides pour l'air intérieur [Internet]. [Cité 4 avril 2020]. Disponible sur : <https://sante.gouv.fr/sante-et-environnement/batiments/article/effets-sanitaires-et-valeurs-guides-pour-l-air-interieur>
- Ministère de la Santé et du Sport. (2020). Gestion de la qualité de l'air intérieur - Guide 2020 [Internet]. [Cité 4 avril 2020]. Disponible sur : <http://solidarites-sante.gouv.fr/>
- Ministère de l'intérieur et des outre-mer. (2019). Observatoire de la qualité de l'air intérieur : Bilan et perspectives [Internet]. [Cité 18 avril 2020]. Disponible sur : <https://www.interieur.gouv.fr/Publications/Rapports-de-l-IGA/Rapports-recents/Observatoire-de-la-qualite-de-l-air-interieur-Bilan-et-perspectives>

- Morawska, L., & Salthammer, T. (2006). Indoor Environment: Airborne Particles and Settled Dust [E-book]. *John Wiley & Sons*. <https://www.wiley.com/en-gb>
- Mossman, B. T., Borm, P. J., Castranova, V., Costa, D. L., Donaldson, K., & Kleeberger, S. R. (2007). Mechanisms of action of inhaled fibers, particles and nanoparticles in lung and cardiovascular diseases. *Particle and Fibre Toxicology*, 4(1), 4. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-4-4>
- Mossman, B. T., Lippmann, M., Hesterberg, T. W., Kelsey, K. T., Barchowsky, A., & Bonner, J. C. (2011). Pulmonary Endpoints (Lung Carcinomas and Asbestosis) Following Inhalation Exposure to Asbestos. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, 14(1–4), 76–121. <https://doi.org/10.1080/10937404.2011.556047>
- Muala, A., Rankin, G., Sehlstedt, M., Unosson, J., Bosson, J. A., Behndig, A., Pourazar, J., Nyström, R., Pettersson, E., Bergvall, C., Westerholm, R., Jalava, P. I., Happonen, M. S., Uski, O., Hirvonen, M.-R., Kelly, F. J., Mudway, I. S., Blomberg, A., Boman, C., & Sandström, T. (2015). Acute exposure to wood smoke from incomplete combustion—Indications of cytotoxicity. *Particle and Fibre Toxicology*, 12(1), 33. <https://doi.org/10.1186/s12989-015-0111-7>
- Nezis, I., Biskos, G., Eleftheriadis, K., & Kalantzi, O.-I. (2019). Particulate matter and health effects in offices—A review. *Building and Environment*, 156, 62–73. <https://doi.org/10.1016/j.buildenv.2019.03.042>
- Niemann, B., Rohrbach, S., Miller, M. R., Newby, D. E., Fuster, V., & Kovacic, J. C. (2017). Oxidative Stress and Cardiovascular Risk: Obesity, Diabetes, Smoking, and Pollution: Part 3 of a 3-Part Series. *Journal of the American College of Cardiology*, 70(2), 230–251. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2017.05.043>
- NIST. (2016a). Certificate of Analysis for Standard Reference Material 2583 (SRM®2583), Trace Elements in Indoor Dust, Nominal 90 mg/kg Lead. [Cité 11 septembre 2023]. Disponible sur: https://assets.lgcstandards.com/sys-master_NIST-2583_ST-WB-CERT-3406625-1-1-1.PDF

- NIST. (2016b). Certificate of Analysis for Standard Reference Material 2584 (SRM® 2584), Trace Elements in Indoor Dust, Nominal 1% Lead. [Cité 11 septembre 2023]. Disponible sur : https://shop.nist.gov/ccrz__CCPage?pageKey=SRMORS
- NIST. (2018). Certificate of Analysis: Standard Reference Material® 2585 Organic Contaminants in House Dust [Internet]. [Cité 20 avril 2020]. Disponible sur : <https://www-s.nist.gov/srmors/viewTableV.cfm?tableid=54>.
- Nordberg, M., Täubel, M., Jalava, P. I., BéruBé, K., Tervahauta, A., Hyvärinen, A., & Huttunen, K. (2020). Human airway construct model is suitable for studying transcriptome changes associated with indoor air particulate matter toxicity. *Indoor Air*, 30(3), 433–444. <https://doi.org/10.1111/ina.12637>
- Oeder, S., Jörres, R. A., Weichenmeier, I., Pusch, G., Schober, W., Pfab, F., Behrendt, H., Schierl, R., Kronseder, A., Nowak, D., Dietrich, S., Fernández-Caldas, E., Lintelmann, J., Zimmermann, R., Lang, R., Mages, J., Fromme, H., & Buters, J. T. M. (2012). Airborne Indoor Particles from Schools Are More Toxic than Outdoor Particles. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 47(5), 575–582. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2012-0139OC>
- Okuda, K., Chen, G., Subramani, D. B., Wolf, M., Gilmore, R. C., Kato, T., Radicioni, G., Kesimer, M., Chua, M., Dang, H., Livraghi-Butrico, A., Ehre, C., Doerschuk, C. M., Randell, S. H., Matsui, H., Nagase, T., O’Neal, W. K., & Boucher, R. C. (2019). Localization of Secretory Mucins MUC5AC and MUC5B in Normal/Healthy Human Airways. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 199(6), 715–727. <https://doi.org/10.1164/rccm.201804-0734OC>
- Olgun, N. S., Morris, A. M., Stefaniak, A. B., Bowers, L. N., Knepp, A. K., Duling, M. G., Mercer, R. R., Kashon, M. L., Fedan, J. S., & Leonard, S. S. (2020). Biological effects of inhaled hydraulic fracturing sand dust. III. Cytotoxicity and pro-inflammatory responses in cultured murine macrophage cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 408, 115281. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2020.115281>
- OMS. (2018). Household air pollution and health [Internet]. [Cité 18 avril 2020]. Disponible sur : <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/household-air-pollution-and-health>

- OQAI. (2018). Campagne nationale "Ecoles" n°1 [Internet]. [Cité 23 avril 2023]. Disponible sur : <https://www.oqai.fr/fr/campagnes/campagne-nationale-ecoles-n01>.
-  sterlund, C., Grönlund, H., Polovic, N., Sundström, S., Gafvelin, G., & Bucht, A. (2009). The non-proteolytic house dust mite allergen Der p 2 induce NF- B and MAPK dependent activation of bronchial epithelial cells. *Clinical & Experimental Allergy*, *39*(8), 1199–1208. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2009.03284.x>
- Panas, A., Comouth, A., Saathoff, H., Leisner, T., Al-Rawi, M., Simon, M., Seemann, G., D ssel, O., M lhopt, S., Paur, H.-R., Fritsch-Decker, S., Weiss, C., & Diabat , S. (2014). Silica nanoparticles are less toxic to human lung cells when deposited at the air–liquid interface compared to conventional submerged exposure. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, *5*, 1590–1602. <https://doi.org/10.3762/bjnano.5.171>
- Pardo, M., Qiu, X., Zimmermann, R., & Rudich, Y. (2020). Particulate Matter Toxicity Is Nrf2 and Mitochondria Dependent: The Roles of Metals and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Chemical Research in Toxicology*, *33*(5), 1110–1120. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.0c00007>
- Pascal, L. E., & Tessier, D. M. (2004). Cytotoxicity of chromium and manganese to lung epithelial cells in vitro. *Toxicology Letters*, *147*(2), 143–151. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2003.11.004>
- Perez-Padilla, R., Schilman, A., & Riojas-Rodríguez, H. (2010). Respiratory health effects of indoor air pollution. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease: The Official Journal of the International Union Against Tuberculosis and Lung Disease*, *14*(9), 1079–1086.
- Pezzulo, A. A., Starner, T. D., Scheetz, T. E., Traver, G. L., Tilley, A. E., Harvey, B.-G., Crystal, R. G., McCray, P. B., & Zabner, J. (2011). The air-liquid interface and use of primary cell cultures are important to recapitulate the transcriptional profile of in vivo airway epithelia. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, *300*(1), L25–L31. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00256.2010>
- Platel, A., Privat, K., Talahari, S., Delobel, A., Dourdin, G., Gateau, E., Simar, S., Saleh, Y., Sotty, J., Antherieu, S., Canivet, L., Alleman, L.-Y., Perdrix, E., Garçon, G., Denayer, F. O., Lo Guidice,

- J. M., & Nesslany, F. (2020). Study of in vitro and in vivo genotoxic effects of air pollution fine (PM_{2.5-0.18}) and quasi-ultrafine (PM_{0.18}) particles on lung models. *Science of The Total Environment*, *711*, 134666. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134666>
- Poster, D. L., Kucklick, J. R., Schantz, M. M., Vander Pol, S. S., Leigh, S. D., & Wise, S. A. (2007). Development of a house dust standard reference material for the determination of organic contaminants. *Environmental Science & Technology*, *41*(8), 2861–2867. <https://doi.org/10.1021/es061966z>
- Rahman, T., Faisal, A.-R. Md., Khanam, T., & Shekhar, H. U. (2020). Recurrent Indoor Environmental Pollution and Its Impact on Health and Oxidative Stress of the Textile Workers in Bangladesh. *Environmental Health Insights*, *14*, 1178630220938393. <https://doi.org/10.1177/1178630220938393>
- Rasmussen, P. E., Beauchemin, S., Nugent, M., Dugandzic, R., Lanouette, M., & Chénier, M. (2008). Influence of Matrix Composition on the Bioaccessibility of Copper, Zinc, and Nickel in Urban Residential Dust and Soil. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*, *14*(2), 351–371. <https://doi.org/10.1080/10807030801934960>
- Rayner, R. E., Makena, P., Prasad, G. L., & Cormet-Boyaka, E. (2019). Optimization of Normal Human Bronchial Epithelial (NHBE) Cell 3D Cultures for in vitro Lung Model Studies. *Scientific Reports*, *9*(1), 500. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36735-z>
- Réseau français Villes-Santé. (2015). Qualité de l'air intérieur et extérieur [Internet]. [Cité 24 juin 2022]. Disponible sur : <http://www.villes-sante.com/qualite-air/>. <http://www.villes-sante.com/qualite-air/>.
- Rock, J. R., Onaitis, M. W., Rawlins, E. L., Lu, Y., Clark, C. P., Xue, Y., Randell, S. H., & Hogan, B. L. M. (2009). Basal cells as stem cells of the mouse trachea and human airway epithelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(31), 12771–12775. <https://doi.org/10.1073/pnas.0906850106>
- Rogers, D. F. (2003). The airway goblet cell. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *35*(1), 1–6. [https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(02\)00083-3](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(02)00083-3)
- Rokicki, W., Rokicki, M., Wojtacha, J., & Dželjijli, A. (2016). The role and importance of club cells (Clara cells) in the pathogenesis of some respiratory diseases. *Kardiochirurgia i*

- Torakochirurgia Polska = Polish Journal of Cardio-Thoracic Surgery*, 13(1), 26–30.
<https://doi.org/10.5114/kitp.2016.58961>
- 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), 5710.
<https://doi.org/10.3390/ijms20225710>
- Salomon, J. J., Muchitsch, V. E., Gausterer, J. C., Schwagerus, E., Huwer, H., Daum, N., Lehr, C.-M., & Ehrhardt, C. (2014). The Cell Line NCI-H441 Is a Useful *in Vitro* Model for Transport Studies of Human Distal Lung Epithelial Barrier. *Molecular Pharmaceutics*, 11(3), 995–1006. <https://doi.org/10.1021/mp4006535>
- Samet, J. M., & Wages, P. A. (2018). Oxidative stress from environmental exposures. *Current Opinion in Toxicology*, 7, 60–66. <https://doi.org/10.1016/j.cotox.2017.10.008>
- Saraf, A., Larsson, L., Larsson, B.-M., Larsson, K., & Palmberg, L. (1999). House Dust Induces IL-6 and IL-8 Response in A549 Epithelial Cells. *Indoor Air*, 9(4), 219–225.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-0668.1999.00002.x>
- Sauvain, J.-J., Rossi, M. J., & Riediker, M. (2013). Comparison of Three Acellular Tests for Assessing the Oxidation Potential of Nanomaterials. *Aerosol Science and Technology*, 47(2), 218–227. <https://doi.org/10.1080/02786826.2012.742951>
- Scheffler, S., Dieken, H., Krischenowski, O., & Aufderheide, M. (2015). Cytotoxic Evaluation of e-Liquid Aerosol using Different Lung-Derived Cell Models. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 12(10), 12466–12474.
<https://doi.org/10.3390/ijerph121012466>
- Schmidt-Ott, A., & Ristovski, Z. D. (2006). Measurement of Airborne Particles. In *Indoor Environment* (pp. 56–81). John Wiley & Sons, Ltd.
<https://doi.org/10.1002/9783527610013.ch2b>
- Shamsollahi, H. R., Ghoochani, M., Jaafari, J., Moosavi, A., Sillanpää, M., & Alimohammadi, M. (2019). Environmental exposure to endotoxin and its health outcomes: A systematic

- review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 174, 236–244. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.02.046>
- Shamsollahi, H. R., Jahanbin, B., Rafieian, S., & Yunesian, M. (2021). Particulates induced lung inflammation and its consequences in the development of restrictive and obstructive lung diseases: A systematic review. *Environmental Science and Pollution Research*, 28(20), 25035–25050. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-13559-5>
- Singh, P., & Arora, R. (2018). Indoor Air Quality in Schools : A Review Based Study. *International Journal of Engineering & Scientific Research*, 6(3). https://www.ijmra.us/project%20doc/2018/IJESR_MARCH2018/16_4953_pdf.pdf
- Sotty, J., Garçon, G., Denayer, F.-O., Alleman, L.-Y., Saleh, Y., Perdrix, E., Riffault, V., Dubot, P., Lo-Guidice, J.-M., & Canivet, L. (2019). Toxicological effects of ambient fine (PM_{2.5-0.18}) and ultrafine (PM_{0.18}) particles in healthy and diseased 3D organo-typic mucociliary-phenotype models. *Environmental Research*, 176, 108538. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.108538>
- Stoeger, T., Takenaka, S., Frankenberger, B., Ritter, B., Karg, E., Maier, K., Schulz, H., & Schmid, O. (2009). Deducing in Vivo Toxicity of Combustion-Derived Nanoparticles from a Cell-Free Oxidative Potency Assay and Metabolic Activation of Organic Compounds. *Environmental Health Perspectives*, 117(1), 54–60. <https://doi.org/10.1289/ehp.11370>
- Sturm, R. (2015). Spatial visualization of theoretical nanoparticle deposition in the human respiratory tract. *Annals of Translational Medicine*, 3(21). <https://doi.org/10.3978/j.issn.2305-5839.2015.12.19>
- Sun, L., Miller, J. D., Van Ryswyk, K., Wheeler, A. J., Héroux, M., Goldberg, M. S., & Mallach, G. (2022). Household determinants of biocontaminant exposures in Canadian homes. *Indoor Air*, 32(1), e12933. <https://doi.org/10.1111/ina.12933>
- Tata, P. R., & Rajagopal, J. (2017). Plasticity in the lung: Making and breaking cell identity. *Development*, 144(5), 755–766. <https://doi.org/10.1242/dev.143784>
- Thomassen, M. J., Divis, L. T., & Fisher, C. J. (1996). Regulation of Human Alveolar Macrophage Inflammatory Cytokine Production by Interleukin-10. *Clinical Immunology and Immunopathology*, 80(3), 321–324. <https://doi.org/10.1006/clin.1996.0130>

- Thorne, P. S., Kulhánková, K., Yin, M., Cohn, R., Arbes, S. J., & Zeldin, D. C. (2005). Endotoxin Exposure Is a Risk Factor for Asthma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, *172*(11), 1371–1377. <https://doi.org/10.1164/rccm.200505-758OC>
- Tischer, C., Gehring, U., Chen, C.-M., Kerkhof, M., Koppelman, G., Sausenthaler, S., Herbarth, O., Schaaf, B., Lehmann, I., Kramer, U., Berdel, D., Von Berg, A., Bauer, C. P., Koletzko, S., Wichmann, H.-E., Brunekreef, B., & Heinrich, J. (2011). Respiratory health in children, and indoor exposure to (1,3)- β -D-glucan, EPS mould components and endotoxin. *European Respiratory Journal*, *37*(5), 1050–1059. <https://doi.org/10.1183/09031936.00091210>
- Tsai, C.-F., Chen, J.-H., & Yeh, W.-L. (2019). Pulmonary fibroblasts-secreted CXCL10 polarizes alveolar macrophages under pro-inflammatory stimuli. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *380*, 114698. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2019.114698>
- Upadhyay, S., & Palmberg, L. (2018). Air-Liquid Interface: Relevant In Vitro Models for Investigating Air Pollutant-Induced Pulmonary Toxicity. *Toxicological Sciences*, *164*(1), 21–30. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfy053>
- Valavanidis, A., Vlachogianni, T., Fiotakis, K., & Loidas, 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), Article 9. <https://doi.org/10.3390/ijerph10093886>
- Van Schilfgaarde, M., van Alphen, L., Eijk, P., Everts, V., & Dankert, J. (1995). Paracytosis of Haemophilus influenzae through cell layers of NCI-H292 lung epithelial cells. *Infection and Immunity*, *63*(12), 4729–4737.
- Visentin, M., Pagnoni, A., Sarti, E., & Pietrogrande, M. C. (2016). Urban PM_{2.5} oxidative potential: Importance of chemical species and comparison of two spectrophotometric cell-free assays. *Environmental Pollution*, *219*, 72–79. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.09.047>
- VITROCELL. (n.d.). VITROCELL Cloud Alpha MAX [Internet]. [Cité 23 juin 2020]. Disponible sur : <https://www.vitrocell.com/inhalation-toxicology/exposure-systems/vitrocell-cloud-system/vitrocell-cloud-max>

- Wages, P. A., Cheng, W.-Y., Gibbs-Flournoy, E., & Samet, J. M. (2016). Live-cell imaging approaches for the investigation of xenobiotic-induced oxidant stress. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1860(12), 2802–2815. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2016.05.017>
- Wang, G., Zhang, X., Liu, X., & Zheng, J. (2020). Co-culture of human alveolar epithelial (A549) and macrophage (THP-1) cells to study the potential toxicity of ambient PM2.5: A comparison of growth under ALI and submerged conditions. *Toxicology Research*, 9(5), 636–651. <https://doi.org/10.1093/toxres/tfaa072>
- Wang, W., Lin, Y., Yang, H., Ling, W., Liu, L., Zhang, W., Lu, D., Liu, Q., & Jiang, G. (2022). Internal Exposure and Distribution of Airborne Fine Particles in the Human Body: Methodology, Current Understandings, and Research Needs. *Environmental Science & Technology*, 56(11), 6857–6869. <https://doi.org/10.1021/acs.est.1c07051>
- Whitlock, N. C., & Baek, S. J. (2012). The anticancer effects of resveratrol – Modulation of transcription factors. *Nutrition and Cancer*, 64(4), 493. <https://doi.org/10.1080/01635581.2012.667862>
- Whitsett, J. A. (2018). Airway Epithelial Differentiation and Mucociliary Clearance. *Annals of the American Thoracic Society*, 15(Suppl 3), S143–S148. <https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.201802-128AW>
- Widdicombe, J. H., & Wine, J. J. (2015). Airway Gland Structure and Function. *Physiological Reviews*, 95(4), 1241–1319. <https://doi.org/10.1152/physrev.00039.2014>
- Wu, W., Jin, Y., & Carlsten, C. (2018). Inflammatory health effects of indoor and outdoor particulate matter. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 141(3), 833–844. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.12.981>
- Xu, X., Li, Q., Li, L., Zeng, M., Zhou, X., & Cheng, Z. (2021). Endoplasmic reticulum stress/XBP1 promotes airway mucin secretion under the influence of neutrophil elastase. *International Journal of Molecular Medicine*, 47(5), 81. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2021.4914>
- Yaghi, A., & Dolovich, M. B. (2016). Airway Epithelial Cell Cilia and Obstructive Lung Disease. *Cells*, 5(4), 40. <https://doi.org/10.3390/cells5040040>

- Yang, Y., Liu, L., Xiong, Y., Zhang, G., Wen, H., Lei, J., Guo, L., & Lyu, Y. (2016). A comparative study on physicochemical characteristics of household dust from a metropolitan city and a remote village in China. *Atmospheric Pollution Research*, 7(6), 1090–1100. <https://doi.org/10.1016/j.apr.2016.06.009>
- Zavala, J., Freedman, A. N., Szilagy, J. T., Jaspers, I., Wambaugh, J. F., Higuchi, M., & Rager, J. E. (2020). New Approach Methods to Evaluate Health Risks of Air Pollutants: Critical Design Considerations for In Vitro Exposure Testing. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(6), Article 6. <https://doi.org/10.3390/ijerph17062124>
- Zhang, C., Asif, H., Calcagno, T. M., Kumar, N., Fregien, N. L., & Mirsaeidi, M. (2020). *Indoor PM10 Upregulates Pro-inflammatory Mediators in Bronchial Epithelial Cells* (2020080315). Preprints. <https://doi.org/10.20944/preprints202008.0315.v1>
- Zhang, J., Abou-Elwafa Abdallah, M., Williams, T. D., Harrad, S., Chipman, J. K., & Viant, M. R. (2016). Gene expression and metabolic responses of HepG2/C3A cells exposed to flame retardants and dust extracts at concentrations relevant to indoor environmental exposures. *Chemosphere*, 144, 1996–2003. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.10.014>
- 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>

Annexes

Annexe 1

<https://doi.org/10.3390/atmos13111818>



Article

Intrinsic Characteristics and Biological Effects of Standard Reference Indoor Dust SRM[®] 2585 and Its Inhalable Subfractions PM₁₀ and PM_{2.5}

Carine El Hajjar, Tiphaine Rogez-Florent, Virginie Seguin, Anthony Verdin, David Garon, Ivannah Pottier and Véronique André

Special Issue

Chemical Composition and Toxicology of Indoor Particulate Matter

Edited by

Dr. Cátia Gonçalves and Dr. Ana Margarida Vicente



<https://doi.org/10.3390/atmos13111818>

Annexe 2

Les formules utilisées pour évaluer l'efficacité du dépôt au niveau de la microbalance :

$$C_{fluo.théorique.QCM} (\mu g/mL) = \frac{C_{fluo.néb} (\mu g/mL) \times V_{fluo.néb} (mL) \times S_{QCM} (cm^2)}{V_{QCM} (mL) \times S_{chambre} (cm^2)} \quad (1)$$

$$F_{dépôt.QCM} (\mu g/mL) = 100 \times \frac{C_{fluo.mesurée.QCM} (\mu g/mL)}{C_{fluo.théorique.QCM} (\mu g/mL)} \quad (2)$$

Les formules utilisées pour évaluer l'efficacité du dépôt au niveau des inserts :

$$C_{fluo.théorique.insert} (\mu g/mL) = \frac{C_{fluo.néb} (\mu g/mL) \times V_{fluo.néb} (mL) \times S_{insert} (cm^2)}{V_{insert} (mL) \times S_{chambre} (cm^2)} \quad (3)$$

$$F_{dépôt.insert} (\mu g/mL) = 100 \times \frac{C_{fluo.mesurée.insert} (\mu g/mL)}{C_{fluo.théorique.insert} (\mu g/mL)} \quad (4)$$

Avec,

$$C_{fluo.néb} = 15 \mu g/mL$$

$$V_{fluo.néb} = 0.02 \text{ mL}$$

$$S_{insert} = 0.336 \text{ cm}^2$$

$$V_{insert} = 0.15 \text{ mL}$$

$$S_{QCM} = 3.8 \text{ cm}^2$$

$$V_{QCM} = 0.4 \text{ mL}$$

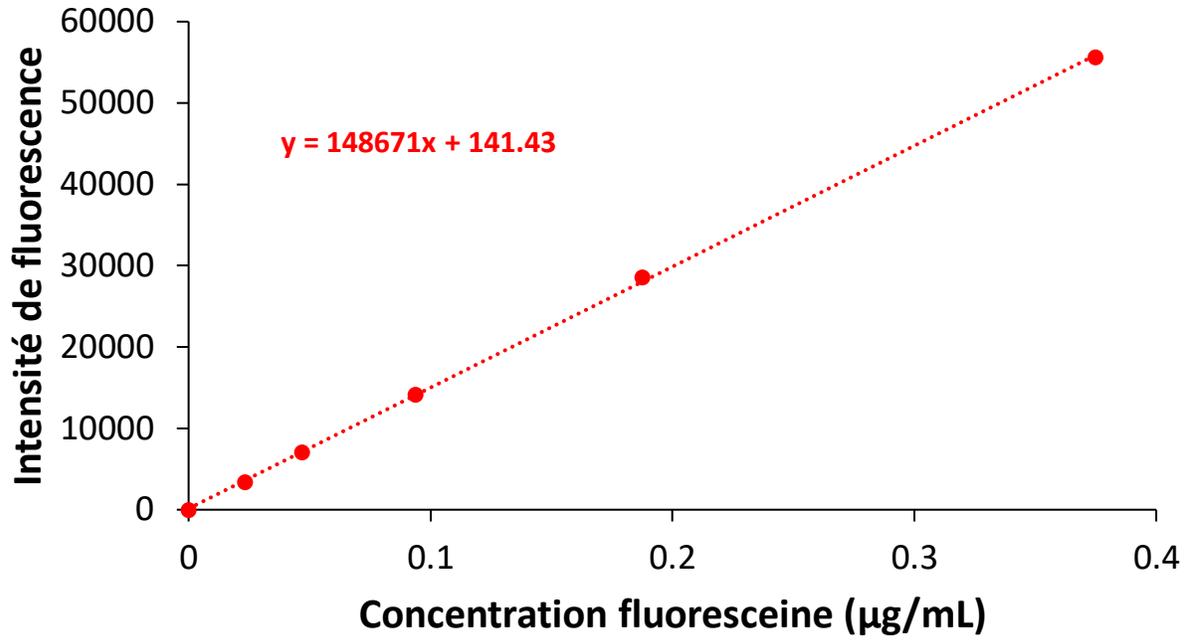
$$S_{chambre} = 4.71 \text{ cm}^2$$

$$C_{fluo.théorique.QCM} = 0.6051 \mu g/mL$$

$$C_{fluo.théorique.insert} = 0.1427 \mu g/mL$$

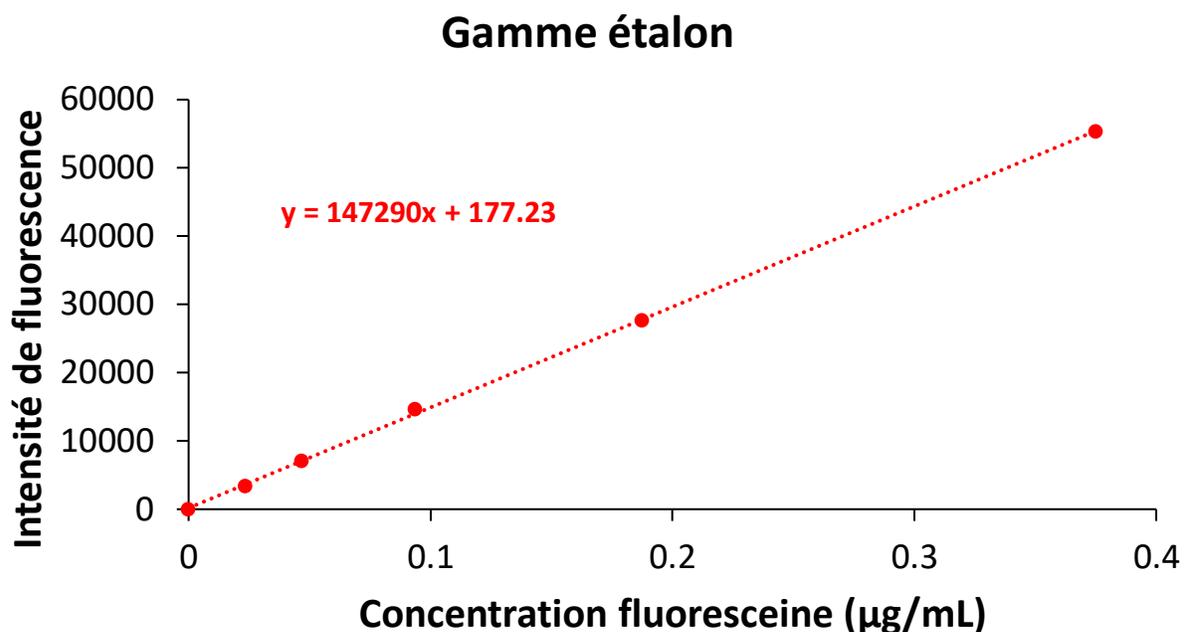
A

Gamme étalon



Support	Nébuliseur	Concentration fluo.mesurée (µg/mL)	ET conc.	Efficacité du dépôt moyenne (%) (F _{dépôt})	ET F _{dépôt}
Insert	W1	0.0453	0.0119	32	7
	W2	0.0374	0.0046	26	3
	W3	0.0724	0.0078	51	4
QCM	W1	0.2368	0.0536	39	7
	W2	0.2514	0.1054	42	14
	W3	0.2428	0.1000	40	13

B



Support	Nébuliseur	Concentration fluo.mesurée (µg/mL)	ET conc.	Efficacité du dépôt moyenne (%) ($F_{\text{dépôt}}$)	ET $F_{\text{dépôt}}$
Insert	W1	0.0573	0.0162	40	11
	W2	0.0716	0.0189	50	13
	W3	0.0822	0.0354	59	25
QCM	W1	0.1625	0.0110	26	2
	W2	0.2607	0.0701	43	12
	W3	0.1884	0.0649	31	11

Figure. Calcul de l'efficacité du dépôt du VITROCELL® Cloud MAX à l'aide d'un traceur fluorescent, la fluorescéine. La nébulisation de la fluorescéine a été répétée 3 ou 6 fois pour chaque nébuliseur et chaque support (QCM ou insert). L'efficacité du dépôt (%) des trois nébuliseurs (W1, W2 et W3) ont été calculé à partir de la concentration de fluorescence mesurée par spectrophotométrie. (A) : Première analyse. (B) : Deuxième analyse.

Annexe 4

Tableau. Calcul de la dose réelle déposée chaque suspension particulaire de PM₁₀ préparée testée et chaque nébuliseur mis en route à partir des valeurs enregistrées à l'aide du logiciel « Vitrocell® Monitor » pendant 30 secondes après stabilisation du signal. Elle correspond à la différence entre la dose de particules réellement déposée et celle de la solution saline diluée obtenues à partir des acquisitions. Les résultats ont été exprimés en dose moyenne ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) \pm SD d'au moins trois nébulisations pour chaque suspension et nébuliseur testés.

W : nébuliseur. PBS : solution saline diluée au 80^{ème} dans de l'eau ultra pure supplémenté avec des antibiotiques (100 unités/ml de pénicilline, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de streptomycine) et antifongiques (0,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Amphotéricine B®).

Volume nébulisé : 30 μL .

Jour d'analyse	Nébuliseur	Echantillon testé	Dose déposée attendue $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	Numéro de la suspension testée	Mesures						Moyenne des mesures ng/cm^2	Ecart Type	Dose réelle déposée $\mu\text{g}/\text{cm}^2$
					1 ng/cm^2	2 ng/cm^2	3 ng/cm^2	4 ng/cm^2	5 ng/cm^2	6 ng/cm^2			
12/03/21	W 1	PBS			431	482	327	489			432	65	
		PM ₁₀	0.1	1	696	499	442	529	606	642	569	87	0.137
13/03/21	W 1	PBS			398	259	366	446			367	69	
		PM ₁₀	0.1	2	370	539	537	419	443	669	496	98	0.129
12/03/21	W 2	PBS	-		188	386	368	572	414	395	387	112	
		PM ₁₀	1.0	3	1169	1569	1277	1114	1452	1143	1287	169	0.900
12/03/21	W 3	PBS	-		524	644	401	543	747	513	562	109	
		PM ₁₀	10.0	4	7118	6773	6054	5658	7679	8593	6979	980	5.938
31/03/21	W 4	PBS	-		318	430	344	292	420	388	365	51	
		PM ₁₀	0.1	2	382	543	434	420	391	563	456	71	0.090
25/05/21	W 5	PBS	-		1170	820	973	1014	922	1051	992	108	
		PM ₁₀	0.1	2	1108	977	1137	1321	1193	991	1121	118	0.129
25/05/21	W 6	PBS	-		691	506	802	673	784	679	689	97	
		PM ₁₀	10.0	4	9170	8952	7241	7241	-	-	8151	913	7.462
		PM ₁₀	10.0	5	6894	6536	7524	5484	7066	9395	7150	1183	6.461
13/10/21	W 7	PBS	-		994	1102	1149	945	1016	-	1041	74	
		PM ₁₀	10.0	6	8295	8919	8613	8744	8744	-	8663	208	7.622
14/10/21	W 8	PBS	-		501	435	435	580	581	793	554	122	
		PM ₁₀	1.0	7	1514	2134	1798	1420	1085	-	1590	355	1.036
01/12/21	W 9	PBS	-		734	711	421	519	659	-	609	120	
		PM ₁₀	10.0	8	4833	5348	4696	-	-	-	4959	281	4.350
		PM ₁₀	10.0	5	5991	5811	5252	-	-	-	5685	314	5.076
08/04/22	W 10	PBS	-		1028	749	1451	-	-	-	1076	289	
		PM ₁₀	10.0	8	6619	7531	7075	-	-	-	7075	456	5.999

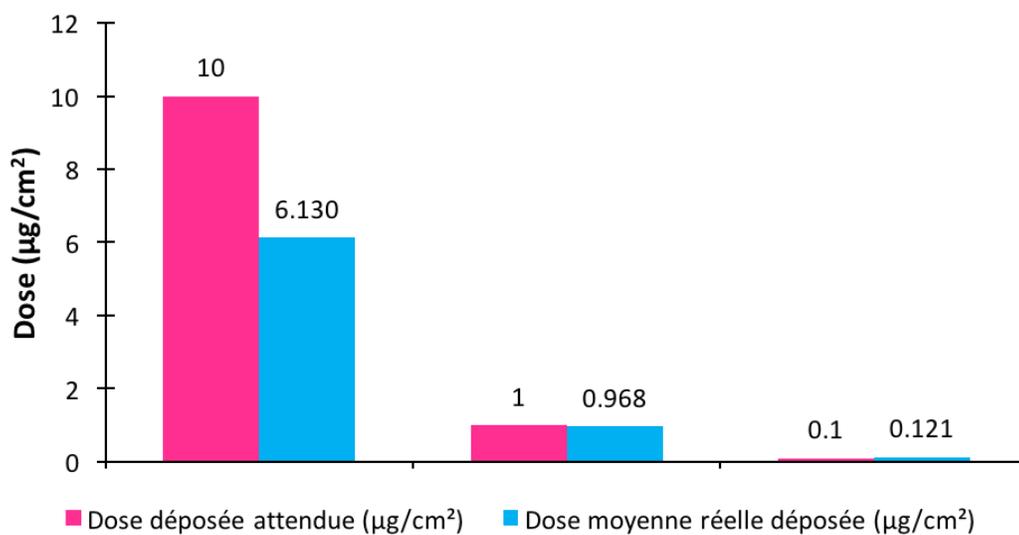


Figure. Comparaison entre la dose déposée attendue ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) et la dose moyenne réelle déposée ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) sur la microbalance QCM intégrée sur le socle du VITROCELL® Cloud MAX.

Annexe 5



Epithelix' Protocol for Mucin quantification (Sandwich Enzyme Linked Lectin Assay ELLA)

Version: 2021

Materials :

- PBS without Ca^{2+} / Mg^{2+} (ref. D8537, Sigma)
- Lectin from *Triticum vulgare* at 250 $\mu\text{g/ml}$ (ref. L0636, Sigma)
- Mucin from porcine stomach at 1 mg/ml (ref. 2378, Sigma)
- Lectin from *Glycin max* (soybean) peroxidase conjugate at 100 $\mu\text{g/ml}$ pH 7.4 (ref. L2650, Sigma)
- Tween 20 (ref. A1389, Applichem)
- Sodium Chloride (ref. S5629, Sigma)
- BSA for ELISA (ref. A7030, Sigma)
- TMB substrate reagent set (ref. 555214, BD OptEIA™)
- 96 wells plate (ref. 442404, NUNC Maxisorp)
- H_2SO_4 2N
- 0.9 % NaCl solution (ref. 1000090, Bichsel)
- CaCl_2 (Ref. A1873, Applichem)
- HEPES (ref. 15630, Gibco)

Solutions :

Coating solution at 6 $\mu\text{g/ml}$ (for 1 plate): dilute 144 μl of Lectin from *Triticum vulgare* (stock solution 250 $\mu\text{g/ml}$) in 6 ml of PBS without Ca^{2+} / Mg^{2+} (**pH previously adjust to 6.8 with HCl 1N**).

HSPBS washing solution (High Salt Phosphate Buffered Saline):

PBS without Ca^{2+} / Mg^{2+} - 0.5 M NaCl- 0.1% Tween 20 pH 7.4
(ex: 500 ml PBS out Ca^{2+} / Mg^{2+} + 14,5 g NaCl +500 μl Tween 20)
Washing solution volume = 20 ml x 9 washes x number of plate

Saline Solution (0.9% NaCl - 1.25mM CaCl_2 - 10mM HEPES):

(ex : for 100 ml saline solution : 12.5 μl 1M CaCl_2 + 1 ml 1M HEPES + 98.875 ml of 0.9 % NaCl)

Range of standards: Dilute at 1 mg/ml in Saline Solution the Mucin from porcine stomach.
Make a range with 10 000 – 5 000 – 2 500 – 1 250 - 625 – 312.5 – 156.3 – 78.1 ng/ml

Detection solution: dilute at 1 $\mu\text{g/ml}$ the *Glycin max* soybean lectin-Horseradish Peroxidase conjugated, in 0.1 % BSA- PBS without Ca^{2+} / Mg^{2+} (**pH previously adjust to 7.4 with NaOH 1N**).

Protocol :

1. Coat the 96 well plate with 60µl/well of coating solution pH 6.8.
2. Cover the plate and incubate 1h at 37°C.
3. Wash the plates 3 times with 200 µl/well of HSPBS washing solution.
4. To the coated plate apply 50 µl/well of standards in duplicate and 50µl/well of samples (pure) in triplicate. Ensure that each plate used has a set of standards.
5. Cover the plate and incubate 30 min at 37°C.
6. Wash the plates 3 times with 200 µl/well of HSPBS washing solution.
7. Add 50 µl/well of Detection solution pH 7.4.
8. Cover the plate and incubate 30 min at 37°C.
9. Wash the plates 3 times with 200 µl/well of HSPBS washing solution.
10. Add 100 µl/well of TMB substrate reagent : mix A and B (1:1)
11. Cover the plate and incubate 10 min at room temperature in the dark.
12. Add 50 µl/well of 2N H₂SO₄ to stop the reaction, mix gently before reading.
13. Read the plates at 450 nm.

For more information, please send an email directly to: epithelix@epithelix.com



Figure. Protocole ELLA pour le dosage du mucus sécrété par les cellules (Epithelix, 2021)

Dans ce protocole, la lectine Glycin max (soybean) conjuguée à la peroxydase (Réf. L2650, Sigma) a été remplacée par la **lectine Ulex europaeus conjuguée à la peroxydase** (Réf. L8146, Sigma Aldrich) préparée dans du PBS 1X dépourvu de calcium et magnésium (1 mg/mL). Pour le dosage, cette solution de détection a été diluée au 10^{ème} dans du PBS 1X à 0.1 % de BSA (soit concentration finale égale à 100 µg/mL).

Annexe 6

Tableau 1. Liste des gènes quantifiés impliqués dans le stress oxydant du kit « RT² Profiler PCR Array Human Oxidative Stress Plus » (PAHS-065YA, Qiagen).

Position	RefSeq Number	Symbol	Description
A01	NM_000477	ALB	Albumin
A02	NM_000697	ALOX12	Arachidonate 12-lipoxygenase
A03	NM_001159	AOX1	Aldehyde oxidase 1
A04	NM_000041	APOE	Apolipoprotein E
A05	NM_004045	ATOX1	ATX1 antioxidant protein 1 homolog (yeast)
A06	NM_004052	BNIP3	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3
A07	NM_001752	CAT	Catalase
A08	NM_002985	CCL5	Chemokine (C-C motif) ligand 5
A09	NM_005125	CCS	Copper chaperone for superoxide dismutase
A10	NM_000397	CYBB	Cytochrome b-245, beta polypeptide
A11	NM_134268	CYGB	Cytoglobin
A12	NM_014762	DHCR24	24-dehydrocholesterol reductase
B01	NM_175940	DUOX1	Dual oxidase 1
B02	NM_014080	DUOX2	Dual oxidase 2
B03	NM_004417	DUSP1	Dual specificity phosphatase 1
B04	NM_001979	EPHX2	Epoxide hydrolase 2, cytoplasmic
B05	NM_000502	EPX	Eosinophil peroxidase
B06	NM_021953	FOXM1	Forkhead box M1
B07	NM_002032	FTH1	Ferritin, heavy polypeptide 1
B08	NM_001498	GCLC	Glutamate-cysteine ligase, catalytic subunit
B09	NM_000581	GPX1	Glutathione peroxidase 1
B10	NM_002083	GPX2	Glutathione peroxidase 2 (gastrointestinal)
B11	NM_002084	GPX3	Glutathione peroxidase 3 (plasma)
B12	NM_002085	GPX4	Glutathione peroxidase 4 (phospholipid hydroperoxidase)
C01	NM_001509	GPX5	Glutathione peroxidase 5 (epididymal androgen-related protein)
C02	NM_000637	GSR	Glutathione reductase
C03	NM_000178	GSS	Glutathione synthetase
C04	NM_000852	GSTP1	Glutathione S-transferase pi 1
C05	NM_001513	GSTZ1	Glutathione transferase zeta 1
C06	NM_005345	HSPA1A	Heat shock 70kDa protein 1A
C07	NM_006121	KRT1	Keratin 1
C08	NM_006151	LPO	Lactoperoxidase
C09	NM_005368	MB	Myoglobin
C10	NM_000242	MBL2	Mannose-binding lectin (protein C) 2, soluble
C11	NM_000250	MPO	Myeloperoxidase
C12	NM_002437	MPV17	MpV17 mitochondrial inner membrane protein
D01	NM_012331	MSRA	Methionine sulfoxide reductase A
D02	NM_005954	MT3	Metallothionein 3
D03	NM_000265	NCF1	Neutrophil cytosolic factor 1
D04	NM_000433	NCF2	Neutrophil cytosolic factor 2
D05	NM_000625	NOS2	Nitric oxide synthase 2, inducible
D06	NM_016931	NOX4	NADPH oxidase 4
D07	NM_024505	NOX5	NADPH oxidase, EF-hand calcium binding domain 5
D08	NM_002452	NUDT1	Nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 1
D09	NM_020992	PDLIM1	PDZ and LIM domain 1
D10	NM_002574	PRDX1	Peroxiredoxin 1
D11	NM_005809	PRDX2	Peroxiredoxin 2
D12	NM_006793	PRDX3	Peroxiredoxin 3

E01	NM_006406	PRDX4	Peroxiredoxin 4
E02	NM_181652	PRDX5	Peroxiredoxin 5
E03	NM_004905	PRDX6	Peroxiredoxin 6
E04	NM_183079	PRNP	Prion protein
E05	NM_000962	PTGS1	Prostaglandin-endoperoxide synthase 1 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)
E06	NM_000963	PTGS2	Prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)
E07	NM_014245	RNF7	Ring finger protein 7
E08	NM_203472	SELENOS	Selenoprotein S
E09	NM_001085486	SELENOP	Selenoprotein P
E10	NM_003019	SFTPD	Surfactant protein D
E11	NM_012237	SIRT2	Sirtuin 2
E12	NM_000454	SOD1	Superoxide dismutase 1, soluble
F01	NM_000636	SOD2	Superoxide dismutase 2, mitochondrial
F02	NM_003102	SOD3	Superoxide dismutase 3, extracellular
F03	NM_003900	SQSTM1	Sequestosome 1
F04	NM_080725	SRXN1	Sulfiredoxin 1
F05	NM_000547	TPO	Thyroid peroxidase
F06	NM_003319	TTN	Titin
F07	NM_006440	TXNRD2	Thioredoxin reductase 2
F08	NM_003355	UCP2	Uncoupling protein 2 (mitochondrial, proton carrier)
F09	NM_001354	AKR1C2	Aldo-keto reductase family 1, member C2 (dihydrodiol dehydrogenase 2; bile acid binding protein; 3-alpha hydroxysteroid dehydrogenase, type III)
F10	NM_004282	BAG2	BCL2-associated athanogene 2
F11	NM_001450	FHL2	Four and a half LIM domains 2
F12	NM_002061	GCLM	Glutamate-cysteine ligase, modifier subunit
G01	NM_000169	GLA	Galactosidase, alpha
G02	NM_002133	HMOX1	Heme oxygenase (decycling) 1
G03	NM_001017963	HSP90AA1	Heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class A member 1
G04	NM_022126	LHPP	Phospholysine phosphohistidine inorganic pyrophosphate phosphatase
G05	NM_181782	NCOA7	Nuclear receptor coactivator 7
G06	NM_000903	NQO1	NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1
G07	NM_012212	PTGR1	Prostaglandin reductase 1
G08	NM_014331	SLC7A11	Solute carrier family 7 (anionic amino acid transporter light chain, xc- system), member 11
G09	NM_003122	SPINK1	Serine peptidase inhibitor, Kazal type 1
G10	NM_024108	TRAPPC6A	Trafficking protein particle complex 6A
G11	NM_003329	TXN	Thioredoxin
G12	NM_003330	TXNRD1	Thioredoxin reductase 1
H01	NM_001101	ACTB	Actin, beta
H02	NM_004048	B2M	Beta-2-microglobulin
H03	NM_002046	GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
H04	NM_000194	HPRT1	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1
H05	NM_001002	RPLP0	Ribosomal protein, large, P0
H06	SA_00105	HGDC	Human Genomic DNA Contamination
H07	SA_00104	RTC	Reverse Transcription Control
H08	SA_00104	RTC	Reverse Transcription Control
H09	SA_00104	RTC	Reverse Transcription Control
H10	SA_00103	PPC	Positive PCR Control
H11	SA_00103	PPC	Positive PCR Control
H12	SA_00103	PPC	Positive PCR Control

Tableau 2. Liste des gènes quantifiés impliqués dans la génotoxicité du kit « RT² Profiler PCR Array Human DNA Damage Signaling Pathway » (PAHS-0292A, Qiagen).

Position	RefSeq Number	Symbol	Description
A01	NM_005157	ABL1	C-abl oncogene 1, non-receptor tyrosine kinase
A02	NM_080649	APEX1	APEX nuclease (multifunctional DNA repair enzyme) 1
A03	NM_000051	ATM	Ataxia telangiectasia mutated
A04	NM_001184	ATR	Ataxia telangiectasia and Rad3 related
A05	NM_032166	ATRIP	ATR interacting protein
A06	NM_000489	ATRX	Alpha thalassemia/mental retardation syndrome X-linked
A07	NM_000465	BARD1	BRCA1 associated RING domain 1
A08	NM_004324	BAX	BCL2-associated X protein
A09	NM_014417	BBC3	BCL2 binding component 3
A10	NM_000057	BLM	Bloom syndrome, RecQ helicase-like
A11	NM_007294	BRCA1	Breast cancer 1, early onset
A12	NM_032043	BRIP1	BRCA1 interacting protein C-terminal helicase 1
B01	NM_001789	CDC25A	Cell division cycle 25 homolog A (S. pombe)
B02	NM_001790	CDC25C	Cell division cycle 25 homolog C (S. pombe)
B03	NM_001799	CDK7	Cyclin-dependent kinase 7
B04	NM_000389	CDKN1A	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)
B05	NM_001274	CHEK1	CHK1 checkpoint homolog (S. pombe)
B06	NM_007194	CHEK2	CHK2 checkpoint homolog (S. pombe)
B07	NM_006384	CIB1	Calcium and integrin binding 1 (calmyrin)
B08	NM_004075	CRY1	Cryptochrome 1 (photolyase-like)
B09	NM_001896	CSNK2A2	Casein kinase 2, alpha prime polypeptide
B10	NM_001923	DDB1	Damage-specific DNA binding protein 1, 127kDa
B11	NM_000107	DDB2	Damage-specific DNA binding protein 2, 48kDa
B12	NM_004083	DDIT3	DNA-damage-inducible transcript 3
C01	NM_001983	ERCC1	Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 1 (includes overlapping antisense sequence)
C02	NM_000400	ERCC2	Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 2
C03	NM_130398	EXO1	Exonuclease 1
C04	NM_000135	FANCA	Fanconi anemia, complementation group A
C05	NM_033084	FANCD2	Fanconi anemia, complementation group D2
C06	NM_004629	FANCG	Fanconi anemia, complementation group G
C07	NM_004111	FEN1	Flap structure-specific endonuclease 1
C08	NM_001924	GADD45A	Growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha
C09	NM_006705	GADD45G	Growth arrest and DNA-damage-inducible, gamma
C10	NM_002105	H2AFX	H2A histone family, member X
C11	NM_004507	HUS1	HUS1 checkpoint homolog (S. pombe)
C12	NM_000234	LIG1	Ligase I, DNA, ATP-dependent
D01	NM_002969	MAPK12	Mitogen-activated protein kinase 12
D02	NM_003925	MBD4	Methyl-CpG binding domain protein 4
D03	NM_024596	MCPH1	Microcephalin 1
D04	NM_014641	MDC1	Mediator of DNA-damage checkpoint 1
D05	NM_000249	MLH1	MutL homolog 1, colon cancer, nonpolyposis type 2 (E. coli)
D06	NM_014381	MLH3	MutL homolog 3 (E. coli)
D07	NM_002434	MPG	N-methylpurine-DNA glycosylase
D08	NM_001330347	MRE11	MRE11 homolog, double strand break repair nuclease
D09	NM_000251	MSH2	MutS homolog 2, colon cancer, nonpolyposis type 1 (E. coli)
D10	NM_002439	MSH3	MutS homolog 3 (E. coli)
D11	NM_002485	NBN	Nibrin
D12	NM_002528	NTHL1	Nth endonuclease III-like 1 (E. coli)
E01	NM_002542	OGG1	8-oxoguanine DNA glycosylase
E02	NM_001618	PARP1	Poly (ADP-ribose) polymerase 1

E03	NM_182649	PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
E04	NM_000534	PMS1	PMS1 postmeiotic segregation increased 1 (<i>S. cerevisiae</i>)
E05	NM_000535	PMS2	PMS2 postmeiotic segregation increased 2 (<i>S. cerevisiae</i>)
E06	NM_007254	PNKP	Polynucleotide kinase 3'-phosphatase
E07	NM_003620	PPM1D	Protein phosphatase, Mg ²⁺ /Mn ²⁺ dependent, 1D
E08	NM_014330	PPP1R15A	Protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 15A
E09	NM_006904	PRKDC	Protein kinase, DNA-activated, catalytic polypeptide
E10	NM_002853	RAD1	RAD1 homolog (<i>S. pombe</i>)
E11	NM_002873	RAD17	RAD17 homolog (<i>S. pombe</i>)
E12	NM_020165	RAD18	RAD18 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)
F01	NM_006265	RAD21	RAD21 homolog (<i>S. pombe</i>)
F02	NM_005732	RAD50	RAD50 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)
F03	NM_002875	RAD51	RAD51 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)
F04	NM_133509	RAD51B	RAD51 homolog B (<i>S. cerevisiae</i>)
F05	NM_004584	RAD9A	RAD9 homolog A (<i>S. pombe</i>)
F06	NM_002894	RBBP8	Retinoblastoma binding protein 8
F07	NM_016316	REV1	REV1 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)
F08	NM_152617	RNF168	Ring finger protein 168
F09	NM_183078	RNF8	Ring finger protein 8
F10	NM_002945	RPA1	Replication protein A1, 70kDa
F11	NM_012238	SIRT1	Sirtuin 1
F12	NM_006306	SMC1A	Structural maintenance of chromosomes 1A
G01	NM_003352	SUMO1	SMT3 suppressor of mif two 3 homolog 1 (<i>S. cerevisiae</i>)
G02	NM_007027	TOPBP1	Topoisomerase (DNA) II binding protein 1
G03	NM_000546	TP53	Tumor protein p53
G04	NM_005657	TP53BP1	Tumor protein p53 binding protein 1
G05	NM_005427	TP73	Tumor protein p73
G06	NM_003362	UNG	Uracil-DNA glycosylase
G07	NM_000380	XPA	Xeroderma pigmentosum, complementation group A
G08	NM_004628	XPC	Xeroderma pigmentosum, complementation group C
G09	NM_006297	XRCC1	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 1
G10	NM_005431	XRCC2	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 2
G11	NM_005432	XRCC3	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 3
G12	NM_001469	XRCC6	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 6
H01	NM_001101	ACTB	Actin, beta
H02	NM_004048	B2M	Beta-2-microglobulin
H03	NM_002046	GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
H04	NM_000194	HPRT1	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1
H05	NM_001002	RPLP0	Ribosomal protein, large, P0
H06	SA_00105	HGDC	Human Genomic DNA Contamination
H07	SA_00104	RTC	Reverse Transcription Control
H08	SA_00104	RTC	Reverse Transcription Control
H09	SA_00104	RTC	Reverse Transcription Control
H10	SA_00103	PPC	Positive PCR Control
H11	SA_00103	PPC	Positive PCR Control
H12	SA_00103	PPC	Positive PCR Control

Annexe 7

Tableau. Concentration d'ARN purifiés à l'aide du kit « RT² First Strand » (Réf. 330404, Qiagen), concentration d'ADN_c synthétisés à l'aide du kit « QuantiTect® Whole Transcriptome » (Réf. 207043, Qiagen) et les différentes dilutions effectuées pour les analyses de PCR classique et qPCR en temps réelle.

Echantillon	ARN (ng/μL) « RT ² First Strand kit »	ADN _c (ng/μL) « QuantiTect® Whole Transcriptome kit »	ADN _c (ng/μL) pour PCR classique (F = 250)	Facteur de dilution (F) de l'ADN _c pour PCR quantitative en temps réel (14 ng/μL soit 2 μL)
J4 ALI	65	2113	8,45	150
J4 PBS	141	2103	8,41	150
J4 D2	127	2228	8,9	160
J4 D3	143	2408	9,63	170
J4 ALI/RPMI	203	2221	8,9	157
J4 PBS/M0	312	2310	9,24	165
J4 D2/D2	132	2178	8,7	155
J4 D3/D3	151	2225	8,9	158
J4 LPS 100 μg/mL 24 h	251	2500	9,95	178
J4 TBHP 750 μM 24 h	114	2130	8,52	152

Formations

Le nombre total d'heures de formation retenu par l'école doctorale est de 177 h validées. Les formations suivies sont présentées dans les tableaux suivants.

Formations spécifiques proposées par l'EDnBISE	Nombre d'heures suivies
Imagerie cellulaire	13
Spectrométrie	7
Méthodes biostatistiques pour l'analyse de données	12

Formations transversales	Nombre d'heures suivies
Parcours Recherche et Enseignement supérieur INSPE Module 01 : Pédagogies pour apprendre dans l'enseignement supérieur	12
Parcours Recherche et Enseignement supérieur INSPE Module 02 : Construire, conduire et évaluer un CM et un TD	12
Parcours Recherche et Enseignement supérieur INSPE Module 03 : Voix, corps et communication professionnelle	6
Savoir créer des figure et illustrations pour publier des articles et rédiger sa thèse : initiation au logiciel libre GIMP	12
Zotéro : un outil libre pour stocker/organiser des bibliographies	6
Règles et usages de publication d'un article scientifique	6
Développer une stratégie de présence numérique sur internet)	4
CYTOFLEX-S (Cytométrie en flux)	6
Intégrité Scientifique (MOC)	3
Animer une web conférence avec Big Blue Button	1
Formation PSC1 (secourisme)	7
Formation Hygiène et Sécurité	18
Conduite à l'autoclave	7

Manifestation scientifique	Nombre d'heures suivies
Ecole thématique Qualité de l'air 2021 : DIM Qi ² , Ile-de-France. Juillet 2021.	40
Vulgarisation scientifique	5

Mission d'enseignement

Composante	Formation	Enseignement	Type	Année universitaire		
				2020-2021	2021-2022	2022-2023
				Nombre d'heure		
UFR des Sciences	Master 1A Nutrition Sciences Aliments P. Qualité des Aliments et Innovation Santé	CM EXP8D - pharmacologie toxicologie et drug design	CM	3	-	-
		CM ALI7B - toxicologie	CM	-	6	6
		CM PHS65	CM	-	9	-
UFR Santé	Diplôme de Formation Approfondie en Sciences Pharmaceutiques 4A Internat	M1S14 - Toxicologie clinique	TP + CM	48	58 + 1,5	60 + 1,5
		M1S23 - Cancérologie et médicaments anticancéreux B	TD	4,5	4,5	4,5
	Diplôme de Formation Générale en Sciences 3A Pharmacie	PHS65 - Iatrogènes et Toxicité	CM	-	9	-

Encadrement de stagiaires

- Co-encadrement d'un stagiaire (Victor Lecannuet) : stage de Diplôme Universitaire de Technologie (DUT) du département « Génie Biologique » d'une durée de 3 mois avec le Dr Véronique André. Avril-Juin 2021.
- Encadrement de deux stagiaires : stage d'observation d'une durée d'une semaine. Février 2020 et Janvier 2021.

Activités administratives

- Participation aux Comités de Suivi Individuel (CSI) de thèse de 4 doctorants :
 - Carine Nassar (Laboratoire BioTICLA)
 - Rima Salma (Laboratoire CIMAP)

- Représentante des doctorants et post-doctorants élue au conseil de gestion de l'unité de recherche ABTE EA4651

- Membre de l'association des doctorants de la région Normandie « Normandie Doc' »

Abstract

While related health effects of inhaled pollutants have been mainly studied from outdoor pollution, the awareness about the impact of indoor air quality has emerged more recently. Indoor air contaminants are complex mixtures that occur at low concentrations but play a role in triggering chronic respiratory diseases. The most severe human health effects of air pollution have been attributed to particulate matter (PM). Settled dust integrates periods of pollution for more or less long durations and constitutes a reservoir of inhalable pollutants through possible resuspension.

This work aims to assess the overall toxic response of settled dust representative of domestic indoor air pollution (SRM[®] 2585) under the most realistic *in vitro* exposure conditions possible. For this purpose, NHBE cells were differentiated at the Air-Liquid Interface (ALI), recreating a functional tracheobronchial pseudo-epithelium. This cell model was exposed repeatedly (4 consecutive days) and cumulatively to the PM₁₀ fraction isolated from SRM[®] 2585 (0.1, 1, and 6 µg/cm²/day) at the ALI using an aerosol-to-cell exposure system (Vitrocell[®] Cloud MAX). Biomarkers were evaluated at D4 and post-exposure (D8 and D11) in order to characterize persistent, transient, or delayed effects. No cytotoxicity is associated with the decrease of the barrier function (TEER) observed on D2, D4 and D8 at the highest dose of exposure. Despite the presence of endotoxins and an inherent pro-oxidant potential (measured using acellular approaches), the pro-inflammatory responses (increase of IL-6 production on D8 and D11, and increase of IL-6 expression on D4) and the pro-oxidant cellular responses (increase of ROS production on D4) are of low amplitude. The responses observed in the differentiated NHBE cells have a smaller amplitude compared to those measured in NHBE grown under conventional submerged conditions. Mutagenic profiles obtained from organic extracts align with the known occurrence of PAH and also indicated the concomitant presence of nitro-PAH. However, the pollutant mixture associated with PM₁₀ leads to a slight modulation of the cellular response to genotoxic stress. Finally, a co-exposure of the pseudo-epithelium simultaneously to PM₁₀ and to media from macrophages previously exposed to PM_{2.5} was conducted to investigate the potential interactions between these two cell models. The pro-oxidant response is modified, and the pro-inflammatory reaction is intensified under these circumstances, emphasizing the importance of including the macrophage response in this model.

These findings highlight the need to use *in vitro* models that are as realistic as possible to obtain more relevant data for establishing guidelines.

Keywords : Indoor Air, particulate matter, settled dust, *in vitro* toxicity, PM₁₀, differentiated NHBE, Air-Liquid Interface, repeated exposures, co-exposure

Résumé

Alors que les effets sanitaires des polluants inhalés ont été principalement étudiés à partir de la pollution extérieure, la prise de conscience de l'impact de la qualité de l'air intérieur est plus récente. Les polluants de l'air intérieur sont des mélanges complexes présents à de faibles concentrations, mais susceptibles de contribuer au développement de pathologies respiratoires chroniques. Les effets les plus néfastes de la pollution de l'air ont été attribués aux particules (PM). Les poussières sédimentées intègrent des périodes de pollution plus ou moins longues et constituent un réservoir de polluants inhalables *via* une possible remise en suspension.

Ce travail se propose d'évaluer la réponse toxique globale de poussières sédimentées représentatives de la pollution de l'air intérieur domestique (SRM[®] 2585), dans des conditions d'exposition *in vitro* les plus réalistes possibles. Pour cela, des cellules NHBE ont été différenciées à l'interface Air-Liquide (IAL), reconstituant un pseudo-épithélium trachéo-bronchique fonctionnel. Ce modèle a été exposé de façon répétée (4 j consécutifs) et cumulée à la fraction PM₁₀ issue du SRM[®] 2585 (0,1 ; 1 et 6 µg/cm²/j) à l'IAL grâce à un système de nébulisation, le Vitrocell[®] Cloud MAX. Les biomarqueurs ont été évalués à J4 et post-exposition (J8 et J11) afin de caractériser les effets pérennes, transitoires ou retardés. Aucune cytotoxicité n'est associée à la baisse de l'effet barrière (TEER) observée à J2, J4 et J8 à la plus forte dose d'exposition. Malgré la présence d'endotoxines et d'un potentiel pro-oxydant intrinsèque (évalués par des approches acellulaires), les réponses cellulaires pro-oxydantes (augmentation de la production d'ERO à J4) et pro-inflammatoires (augmentation de la production d'IL-6 à J8 et J11 et de l'expression d'IL-6 à J4) restent de faible amplitude. Les réponses ainsi obtenues dans le modèle de NHBE différencié sont de plus faible amplitude que celles évaluées parallèlement avec des NHBE cultivées et exposées plus classiquement en immergé. Les profils mutagènes obtenus d'autre part à partir d'extraits organiques sont cohérents avec la présence déjà connue de HAP et ont révélé la présence concomitante de nitro-HAP. Toutefois, le mélange de polluants associés aux PM₁₀ ne conduit qu'à une très faible modulation de la réponse cellulaire à un stress génotoxique. Finalement, une co-exposition du pseudo-épithélium simultanément aux PM₁₀ et à des milieux « conditionnés » issus de l'exposition de macrophages à des PM_{2.5} a été élaboré pour étudier les éventuelles interactions entre ces différents types cellulaires. La réponse pro-oxydante se trouve modifiée et la réponse pro-inflammatoire renforcée dans ces conditions, soulignant l'intérêt d'associer la réponse macrophagique à ce modèle.

Ces résultats mettent en évidence la nécessité d'utiliser des modèles *in vitro* aussi réalistes que possible afin d'obtenir des données plus pertinentes en vue d'établir des lignes directrices.

Mots-clés : Air intérieur, particules, poussières sédimentées, toxicité *in vitro*, PM₁₀, NHBE différenciées, Interface Air-Liquide, expositions répétées, co-exposition