

THÈSE DE DOCTORAT

Présentée par

Yara SALEH

En vue de l'obtention du grade de
Docteur d'Université

Mention : « Sciences de la Vie et de la Santé »

Spécialité : Pharmacie en sciences du médicament et des autres produits de
santé

Etude de la pathogénicité pulmonaire des polluants atmosphériques nanoparticulaires

Soutenue publiquement le 3 Juillet 2019
A la Faculté de médecine de l'Université de Lille

Devant le jury composé de :

Rapporteurs : Pr. Françoise PONS
Pr. Laurent VERNHET

Examineurs : Pr. Christelle MONTEIL
Pr. Guillaume GARCON
Dr. Sophie ACHARD

Directeur de thèse : Dr. Jean-Marc LO-GUIDICE

Résumé

Etude de la pathogénicité pulmonaire des polluants atmosphériques nanoparticulaires

Introduction : Des études épidémiologiques montrent que les polluants atmosphériques particulaires augmentent le risque de morbidité et de mortalité liées à des maladies respiratoires. La toxicité des particules dépend de leur composition chimique, leur conférant des propriétés mutagènes et/ou cancérogènes, mais également de leur granulométrie qui va conditionner leur pénétration et rétention dans les voies respiratoires.

Les particules fines (PF<2,5µm) et surtout les particules ultrafines (PUF<0,1µm) peuvent ainsi atteindre les voies aériennes les plus profondes où leur épuration s'effectuera lentement par clairance macrophagique. Bien que les PUF possèdent une réactivité de surface et donc une toxicité potentielle plus élevées que les PF, leur impact toxicologique réel reste à déterminer.

Matériels et méthodes : Pour ce projet, nous avons comparé l'impact sur la santé respiratoire d'une exposition prolongée à des PF et PUF collectées sur un même site urbano-industriel. Après caractérisation physico-chimique des particules (granulométrie, composition surfacique, élémentaire, en HAP), nous avons exposé des souris BALB/c par voie intranasale de manière aiguë à des doses uniques croissantes de PF ou de PUF (10, 50 ou 100 µg) et de manière subchronique pendant 1 mois ou 3 mois, à raison de 3 doses de 10 µg de particules par semaine. Les souris ont été ensuite sacrifiées, des lavages broncho-alvéolaires (LBA) ont été réalisés et différents tissus (sang, poumons, foie, fémurs) ont été prélevés pour effectuer des analyses toxicologiques.

Résultats : La composition chimique élémentaire des PF et PUF n'a pas montré de différences majeures mais atteste leur origine industrielle par leur richesse en certains métaux. Par ailleurs, une teneur légèrement supérieure en HAP a été détectée dans les PF par rapport aux PUF. Pour toutes les conditions expérimentales, aucun effet génotoxique et/ou mutagène in vivo n'a été mis en évidence (tests des comètes, des micronoyaux, Pig-A négatifs). En revanche, l'étude de la cellularité des LBA, la quantification de l'expression génique des cytokines et l'analyse histologique des tissus pulmonaires suggèrent la survenue d'une inflammation chronique chez les souris exposées. L'apparition de zones lésionnelles étendues

est cependant plus précoce et plus marquée dans les poumons des souris exposées aux PUF. Des analyses transcriptomiques ont montré d'une part que le nombre de gènes dérégulés croît avec la dose et le temps d'exposition, et d'autre part que ce nombre est largement supérieur chez les souris exposées aux PUF par rapport à celles exposées aux PF. L'identification des principales voies de signalisation les plus significativement impactées confirme que les PUF induisent une réponse des tissus pulmonaires plus intense et plus précoce que les PF.

En ce qui concerne les études épigénétiques, une dérégulation de la méthylation de l'ADN, des modifications d'histones et de l'expression génique de certains miARN était plus prononcée chez les souris exposées aux PUF. L'analyse fonctionnelle en cours des miARN spécifiquement dérégulés par les PUF, ou dérégulés communément par les PUF et les PF, devrait permettre l'identification de leurs ARNm cibles.

Conclusion : Les résultats issus de ce projet suggèrent que les PUF ont un impact plus nocif sur la santé respiratoire que les PF, et devraient permettre l'identification de nouveaux biomarqueurs d'atteintes tissulaires. Les informations issues de ce projet pourront être transmises aux différents organismes en charge des polluants atmosphériques et de leurs effets sur la santé, aux instances chargées de leur réglementation ainsi qu'aux industriels afin de contribuer à une meilleure prise de décision quant à la réduction des émissions des polluants particulaires les plus préoccupants. Ils contribueront ainsi à une réactualisation des informations nécessaires à la gestion des risques inhérents aux fractions particulaires ultrafines pour lesquelles il n'existe aucune réglementation.

Mots clés : particules ultrafines, souris, poumons, toxicité, transcriptome, inflammation

Abstract

Effect of atmospheric nanoparticles on the respiratory system in mice

Background: Air pollution is one of the leading causes of premature death worldwide. Among air pollutants, particulate matter (PM) is a major health risk factor, through the development of pulmonary diseases. The toxicity of PM depends on their chemical composition and size which increases their mutagenic and/or carcinogenic properties and determine their penetration and retention in the respiratory tract. Fine particles (FP <2,5 μ m) and ultrafine particles (UFP <0,1 μ m) can thus reach the deepest airways where their purification will be carried out slowly by macrophage clearance. Compared to FP, less is known about the toxicological impact of UFP.

Methods: We first compared the impact of prolonged exposure to PF and PUF collected on the same urban-industrial site on the respiratory health in mice. After physicochemical characterization of the particles (granulometry, surface composition, elementary composition, PAH), BALB/c mice were intranasally exposed to increasing single doses of PF or PUF (10, 50 or 100 μ g) and subchronically for 1 month or 3 months, to 3 doses of 10 μ g of particles per week. Mice were then sacrificed, bronchoalveolar lavages (BAL) were performed and different samples (blood, lungs, liver, femurs) were taken for toxicological analyses.

Results: The elemental chemical composition of FP and UFP did not show any major differences but highlights their industrial origin due to their high content of metals. On the other hand, a slightly higher PAH content was detected in FP compared to PUF. For all experimental conditions, no in vivo genotoxic and / or mutagenic effects were detected (comet, micronucleus, Pig-A negative tests). However, the study of the cellularity of BAL, the quantification of cytokine gene expression and histological analysis of lung tissue suggest the occurrence of chronic inflammation in exposed mice lungs. More extended lesioned areas were, however, observed in the UFP-exposed mice. Transcriptomic analyses have shown, on the one hand, that the number of deregulated genes increases with the dose and the time of exposure, and on the other hand that this number is much higher in mice exposed to UFP compared to those exposed to FP. The identification of the main signalling pathways most

significantly impacted confirms that UFP induce greater and earlier lung tissue response than PF. Concerning the epigenetic analyses, deregulation of DNA methylation, histone modifications, and gene expression of some miRNAs was more pronounced in PUF-exposed mice. The ongoing functional analysis of miRNAs specifically deregulated by PUFs, or commonly deregulated by PUFs and PFs, should allow the identification of their target mRNAs.

Conclusion: The results of this study suggest that UFP have greater impact on the respiratory system than FPs which would allow the identification of new biomarkers of tissue damage. The information resulting from this project can be transmitted to the different organizations in charge of air pollutants and their effects on health, to the concerned authorities and to the industries in order to contribute to make better decisions regarding the reduction of emissions of particulate pollutants of greatest concern. They will thus help to update the current regulations in order to include UFP and limit their emissions.

Keywords: ultrafine particles, mice, lungs, toxicity, transcriptome, inflammation

Abréviations

5-hmC	5-hydroxyméthyle cytosine
8-OHdG	8-hydroxy-2'-deoxyguanosine
AhR	Aryl hydrocarbon receptor
AM	Macrophages alvéolaires
ANTH	Anthanthrene
AP-1	Activator protein-1
ARNT	AhR nuclear translocator
BaA	Benzo(a)anthracene
BaP	Benzo(a)pyrene
BbF	Benzo(b)fluoranthene
BcPHE	Benzo(c)phenanthrene
BeP	Benzo(e)pyrene
BghiP	Benzo(g,h,i)perylene
BjF	Benzo(j)fluoranthene
BkF	Benzo(k)fluoranthene
BPCO	Bronchopneumopathie chronique obstructive
CD	Cellules dendritiques
CFP	Champs de forte puissance
CHR	Chrysene
CIRC	Centre international de recherche sur le cancer
CITEPA	Centre International de Recherche sur le Cancer
Cyp1a1	Cytochromes p450 1a1
DAE	Diamètre aérodynamique équivalent
DaeP	Dibenzo(a,e)pyrene
DahA	Dibenzo(a,h)anthracene
DaP	Dibenzo(a,l)pyrene
DLS	Diffusion dynamique de la lumière
DNMT	ADN méthyltransférases
DRE	Dioxin response elements
E	Erythrocyte
EDTA	EthyleneDiamineTetraacetic Acid
ENU	Ethyl nitroso urée
ERK	Extracellular signal-regulated kinases
ERO	Espèces réactives de l'oxygène
ERN	Espèces réactives de l'azote
FLA	Fluoranthene
GM-CSF	Granulocyte/macrophage colony stimulating factor
HAP	Hydrocarbures aromatiques polycycliques
HAT	Histone acétyltransférase
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HDAC	Histone désacétylase
HE	Coloration hématoxyline et éosine
HMT	Histone méthyltransférases
HPLC	Chromatographie liquide à haute performance

HVIS	High Volume Impactor Sampler
ICP-MS	Inductively coupled plasma mass spectrometry
IL-10	InterLeukines-10
IL-1 β	InterLeukines-1 β
IL-6	InterLeukines-6
IL-8	InterLeukines-8
IP	Indeno(1,2,3-c,d)pyrene
IPA	Ingenuity pathway analysis
KDM	Histone lysine deméthylases
Kyst	Lésions kystiques
LBA	Lavage broncho-alvéolaire
LINE-1	Long interspersed element-1
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinases
MCP	Macrophages contenant des particules
MGG	May–Grünwald–Giemsa
miRNAs	micro-ARNs
MMS	Methylmethane Sulfonate
MNPCE	Nombre de micronoyau dans les érythrocytes polychromatiques
NADPH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
NF-kB	Nuclear Factor-Kappa B
NOX4	NADPH oxydase-4
NRC	US National Research Council
OCDE	Organisation de Coopération et de Développement Économiques
OMS	Organisation mondiale de la santé
PC	Polycarbonate
PCE/NCE	Nombre d'érythrocytes polychromatiques / nombre d'érythrocytes normo-chromatiques
PF	Particules fines
PM	Matières particulaires
PNN	Polynucléaires neutrophiles
PUF	Particules ultrafine
PYR	Pyrene
RISC	RNA-induced silencing complex
RT	Rétrotranscription
SERPINE1	Serpin Family B Member 1
SNC	Système nerveux central
TET	Ten-eleven translocation
TNF α	Tumor Necrosis Factor α
UTR	Untranslated Transcribed Region
XRE	Xenobiotique Response Element

Table des matières

Liste des figures	11
Liste des tableaux.....	14
INTRODUCTION.....	16
1. Généralités sur la pollution de l'air.....	18
2. Sources, caractéristiques physico-chimiques des PM et réglementations.....	20
a. Sources des particules.....	20
(i) Sources primaires.....	20
(ii) Particules secondaires.....	22
b. Caractérisations chimiques des PM.....	23
(i) Les particules sont un mélange complexe	23
(ii) Métaux	24
(iii) Hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP)	24
c. Taille des PM.....	28
d. Règlementation européenne et mondiale.....	29
3. Pénétrance et déposition des particules dans le système respiratoire.....	30
a. Structure du système respiratoire	30
b. Dépôt des particules dans les poumons	33
c. Mécanismes de clairance.....	34
(i) Clairance mucociliaire	34
(ii) Clairance macrophagique	35
(iii) La clairance des particules dépend de leur taille.....	36
4. Etudes épidémiologique de l'effet des PM sur la santé	38
a. Mortalité	38
b. Morbidité	40
5. Mécanismes d'action toxiques des PM _{2,5} et des PM _{0,1}	42
a. Différents modèles utilisés pour étudier la toxicité des particules	42
(i) Etudes humaines en milieu contrôlé	42
(ii) Modèles in vivo	43
(iii) Modèles in vitro	45
b. Effet des PM _{2,5} et des PM _{0,1} sur l'inflammation	46
(i) Inflammation pulmonaire	46
(ii) Inflammation systémique	49
c. Effet des PM _{2,5} et des PM _{0,1} sur le stress oxydant	51
d. Génotoxicité des PM _{2,5} et des PM _{0,1}	53

e.	Epigénétique	56
(i)	Effet des PM _{2,5} et des PM _{0,1} sur la méthylation de l'ADN	57
(ii)	Effet des PM _{2,5} et des PM _{0,1} sur les modifications d'histones.....	60
(iii)	Dérégulation des miRNA par les PM _{2,5} et les PM _{0,1}	62
6.	Biomarqueurs et santé environnementale	66
	Problématique de la thèse	68
	MATERIELS ET METHODES	72
1.	Prélèvement des PM	74
2.	Répartition granulométrique des PM	75
3.	Analyse qualitative et quantitative des HAP et des éléments traces dans les particules fines et ultrafines	75
4.	Hébergement des animaux.....	77
5.	Exposition des souris aux particules	77
6.	Prélèvement des échantillons biologiques	78
7.	Numération cellulaire du LBA	78
8.	Evaluation du potentiel génotoxique <i>in vivo</i> des PF et PUF	79
(i)	Test d'altérations primaires de l'ADN <i>in vivo</i> : Test des Comètes	79
(ii)	Test de mutation chromosomique <i>in vivo</i> : Test du Micronoyau	80
(iii)	Test de mutation génique <i>in vivo</i> : Test Pig-A.....	81
9.	Extraction de l'ADN génomique.....	81
10.	Dosage de 8-hydroxy-2-deoxyguanosine (8-OHdG) dans les poumons de souris.....	81
11.	Analyse histologique des poumons	82
12.	Analyse de la méthylation de l'ADN.....	82
(i)	Mesure de l'activité de l'ADN méthyltransférase (DNMT)	82
(ii)	Analyse de la méthylation globale de l'ADN	82
13.	Analyse des modifications des histones	83
14.	Analyses transcriptomiques.....	83
(i)	Extraction des ARN.....	83
(ii)	RT- PCR quantitative en temps réel	83
(iii)	Analyses transcriptomiques pangénomiques	83
(iv)	Analyse de l'expression des miARN	84
15.	Analyse des voies de signalisation dérégulées par l'exposition aux PF ou PUF.....	85
16.	Analyse fonctionnelle des miARN candidats	86
17.	Analyses statistiques	86
	RESULTATS	87
1.	Caractérisation physico-chimique des particules	89

2.	Internalisation des PF et PUF dans les poumons des souris	91
3.	Analyse de la génotoxicité des particules	93
	(i) Exposition aiguë	93
	(ii) Exposition subchronique de 1 mois	94
	(iii) Exposition subchronique de 3 mois	95
4.	Evaluation du stress oxydant dans les poumons des souris	95
5.	Analyse de l'inflammation dans le LBA.....	96
6.	Remodelage tissulaire des poumons	98
7.	Modifications épigénétiques dues à l'exposition aux PF et PUF	101
	(i) Méthylation de l'ADN	101
	(ii) Modifications d'histones.....	102
	(iii) Dérégulation de l'expression des miARN.....	104
8.	Analyses transcriptomiques.....	104
	(i) Exposition aiguë.....	105
	(ii) Exposition sub-chroniques de 1 mois et de 3 mois.....	107
	DISCUSSION.....	113
	CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	128
	REFERENCES	133
	ARTICLE	153
	ANNEXE	156

Liste des figures

- Figure 1 : Le "The great smog" à Londres en 1952. Le smog désigne un mélange de brouillard et de fumées formant une nappe épaisse, grisâtre ou jaunâtre, irrespirable. 18
- Figure 2 : Distribution des sources primaires d'émission de PM₁₀, PM_{2,5} et PM₁. D'après CITEPA 2018 [22]. 22
- Figure 3 : La formation d'aérosol secondaire. La taille des particules augmente et leur composition devient plus complexe suivant les 3 étapes suivantes : nucléation, condensation et agglomération [19]. 23
- Figure 4 : Induction des gènes du cytochrome P450 après activation de AHR : AHR forme initialement un complexe avec des protéines chaperons (HSP90), une sous-unité appelée (XAP2) et une protéine accessoire p23. Les ligands des HAP se lient à AhR et le dissocient de HSP90, XAP2, et p23. Ensuite, AhR se déplace vers le noyau et forme un hétérodimère avec AhR nuclear translocator (ARNT) et se lie au dioxin response elements (DRE) pour activer ou inhiber l'expression de gènes comme CYP1A1 et CYP1B1, etc [45]. 26
- Figure 5 : les mécanismes à travers lesquels les HAP induisent un cancer de poumons [47]. 28
- Figure 6 : Comparaison de la taille de PUF et PF par rapport au diamètre d'un cheveux [50]. 29
- Figure 7 : Principaux types cellulaires constituant l'épithélium du système respiratoire. La structure de l'épithélium se modifie au fur et à mesure de la stratification du système respiratoire où les cellules ciliées, les cellules caliciformes, les cellules de Clara et les cellules basales présentes dans les voies respiratoires sont remplacées par les pneumocytes de type I et II au niveau des alvéoles [53]. 30
- Figure 8 : La composition cellulaire des voies respiratoires varie selon le diamètre des voies respiratoires [54]. 31
- Figure 9 : Figure représentant la structure tissulaire des voies aériennes (trachée, bronches et bronchioles) et les alvéoles dans le parenchyme pulmonaire. Le tissu muqueux des grandes voies aériennes est constitué de cellules ciliées et de cellules caliciformes sécrétant du mucus qui permet d'éliminer les antigènes inhalés par la clairance mucociliaire. Au niveau du parenchyme pulmonaire, les échanges gazeux avec le sang sont assurés par les alvéoles. Ces derniers sont dotés de cellules immunitaires leur permettant d'éliminer les antigènes : ce sont les macrophages alvéolaires. Adapté de [58]. 32
- Figure 10 : Comportement et déposition des particules dans le système respiratoire selon leur taille. Les grandes particules sont déposées par impaction ou sédimentation, par contre les particules de plus petite taille sont déposées par diffusion brownienne. Les PUF passent dans la circulation et atteignent d'autres tissus [19]. 33
- Figure 11 : Schéma représentant les événements physiologiques et toxicologiques après exposition aux PM_{2,5} et aux PUF. Les PM_{2,5} sont déposées principalement aux niveaux des voies respiratoires supérieures où elles sont éliminées par clairance mucociliaire. Le reste des PM_{2,5} qui réussissent à atteindre les alvéoles sont éliminés par les macrophages résidents. Par contre, la majorité des PUF atteint les alvéoles. A ce niveau, leur prise en charge par les macrophages peut être insuffisante, ce qui prolonge leur élimination et leur résidence dans les alvéoles, et génère un stress oxydatif et une inflammation. De plus, leur présence en très grand nombre dans les alvéoles leur permet aussi de passer dans la circulation. D'après [78]. 37
- Figure 12 : Carte du monde comparant les concentrations en PM_{2,5} en 2017 aux recommandations de l'OMS [85]. 39
- Figure 13 : La résolution de l'inflammation. La première phase de l'inflammation est caractérisée par une infiltration importante en PNN dans le site inflammatoire, ainsi que par une production importante de médiateurs pro-inflammatoires par les différents types cellulaires présents. Lors de la résolution de la réaction inflammatoire, la génération de médiateurs pro-inflammatoires diminue mais celle des médiateurs anti-inflammatoires augmente ; la migration de PNN diminue et l'arrivée de macrophages et de monocytes augmente. De plus, les PNN présents dans le site inflammatoire meurent par apoptose et sont éliminés par les macrophages par efferocytose. Au cours de ce processus, les macrophages pro-inflammatoires (M1) modifient leur phénotype en macrophages anti-inflammatoires (M2) puis en macrophages de phénotype pro-résolutif (Mres) leur permettant de produire des médiateurs anti-inflammatoires pour résoudre l'inflammation et recruter les lymphocytes. Ces phénomènes ensemble conduisent à une résolution de l'inflammation aiguë; cependant, un échec de ce processus peut amener à une inflammation chronique [162]. 48
- Figure 14 : Diagramme récapitulatif des réponses immunitaires des macrophages alvéolaires induites par l'exposition aux PM. Les PM interagissent avec les macrophages alvéolaires soit par activation des voies de signalisation intracellulaires, soit

par endocytose des PM via les voies opsonine ou non opsonines dépendantes. La stimulation de la voie TLR4-Myd88-IRAK4 entraîne l'activation de NF- κ B/AP-1 qui est ensuite activée et maintenue par les ERO intracellulaires. L'activation de la voie Myd88 favorise la maturation des cellules présentatrices d'antigène, y compris la production d'IL-12 (un facteur puissant de la polarisation Th1). En parallèle, le stress oxydant généré dans les macrophages entraîne une augmentation des cytokines de la polarisation Th2 comme IL-4 et IL-10. L'activation de la voie Myd88 est associée aussi à la production de cytokine qui favorise la production de monocytes par la moelle osseuse. Ces monocytes seront recrutés dans les poumons où ils se différencient en macrophages alvéolaires. Les flèches rouges indiquent une stimulation [165]. 49

Figure 15 : Voies toxicologiques reliant l'exposition aux PM et les accidents vasculaires cardiaques ou cérébraux. La première ligne de défense contre les PM est le poumon, où les particules peuvent induire ou exacerber des maladies pulmonaires. Les PUF pourraient passer dans la circulation sanguine et provoquer une inflammation systémique et un stress oxydatif ayant un impact négatif sur le sang, les vaisseaux sanguins, la fonction cardiaque et le cerveau [78]. 50

Figure 16 : les mécanismes d'induction d'un stress oxydant et des dommages de l'ADN causés par les PM et leurs rôles dans la cancérogénèse [174]. 51

Figure 17 : Changements épigénétiques associés à l'exposition aux PM. La taille des PM_{2,5} leur permet de pénétrer dans les alvéoles. A ce niveau-là, Les particules sont pris en charge par les macrophages ou peuvent passer dans la circulation sanguine. Elles peuvent donc induire des modifications épigénétiques au niveau local mais également au niveau systémique. Elles peuvent par exemple altérer l'activité des enzymes DNMT, HAT et HDAC impliqués dans la méthylation de l'ADN et les modifications d'histones. L'exposition aux PM est aussi associée à des altérations au niveau de l'expression des microRNA (miRNA) [197]. 57

Figure 18 : Les modifications d'histones. Selon l'état de transcription « activé » ou « inhibé » des gènes, la chromatine peut exister sous forme d'euchromatine (déroulée) ou d'hétérochromatine (compacte). L'euchromatine est caractérisée par une hypo-méthylation des promoteurs de gènes et plusieurs modifications post-traductionnelles d'histones, en particulier les modifications H3K4me3, H3K27ac et H3K36me3 de H3 : cela entraîne une activation de la transcription. Concernant l'hétérochromatine, elle est caractérisée par une hyper-méthylation des promoteurs et les modifications H3K27me3 et H3K9me3 qui entraînent une inhibition de la transcription. Abréviations : DNMT, ADN méthyltransférases ; HAT, histone deacetylases ; HMT, histone méthyltransférases ; KDM, histone lysine deméthylases [195]. 60

Figure 19 : La biogénèse des miARN. Les gènes des miARN sont en général transcrits par l'ARN polymérase II pour produire les pri-miARN. Ceux-ci sont par la suite clivés par un complexe enzymatique formé par la protéine DGCR8 et DROSHA pour donner les pre-miARN qui ont une structure d'épingle à cheveux. Ces pre-miARN sont par la suite transportés du noyau vers le cytoplasme à l'aide du complexe Ran/GTP/Exportin 5 où ils sont pris en charge par une autre enzyme RNase III Dicer pour les transformer en un duplex miARN/miARN. Une fois ces 2 miARN séparés, le miARN mature s'incorpore dans le complexe protéique RISC. Un miARN mature peut inhiber l'expression de gènes cibles via la dégradation ou l'inhibition de la traduction des ARNm correspondants. En outre, les miARN peuvent se lier directement aux récepteur TLR et déclencher des voies de signalisation en aval [219]. 63

Figure 20 : Schéma présentant une proposition de mécanisme de l'effet de la pollution atmosphérique sur la libération de microvésicules et la communication entre les cellules [222]. 64

Figure 21 : Protocoles expérimentaux d'expositions aiguë et sub-chronique des souris aux PF et PUF. Les particules ont été mises en suspension dans 40 μ l d'HBSS. Pour l'exposition aiguë, les souris ont été sacrifiées (S) 24h après avoir reçu une dose unique de particules (10, 50 ou 100 μ g). Pour les expositions sub-chroniques, les souris ont été exposées 3 fois par semaine pendant 1 ou 3 mois à 10 μ g de particules ; elles ont été sacrifiées 24h après la dernière exposition. Les souris témoins ont reçu HBSS sans particules. 77

Figure 22 : Distribution en taille et en nombre de PF et PUF suspendues dans une solution d'HBSS. (a) Solution de PF (n=3). (b) Solution de PUF (n=3). L'analyse de la solution de PF montre la présence de particules ayant une taille de 1265 \pm 239 nm. Par contre, 2 pics apparaissent dans l'analyse de la solution de PUF. Le premier correspond à la présence de particules ultrafines de 188.0 \pm 39.9 nm. Le deuxième (1078 \pm 305 nm) est associé à la formation d'agrégats dans la solution. 89

Figure 23 : Classification hiérarchique des sources de particules collectées sur le site urbano-industriel de Grande-Synthe. . 90

Figure 24 : Internalisation des particules dans les poumons. (a) photos représentant les cellules présentes dans le LBA des souris et histogramme montrant le comptage des macrophages contenant des particules dans le LBA. M = macrophage, MCP = macrophages contenant des particules, PNN = polynucléaires neutrophiles. (b) Photos représentant les coupes histologiques des poumons de souris (40 x) ; les flèches indiquent les MCP. *p \leq 0,05 vs Control ; **p \leq 0,01 vs Control ; ***p \leq 0,001 vs Control ; #p \leq 0,05 vs PF. 92

Figure 25 : Expression génique de Cyp1a1 (a) et Cyp1b1 (b) dans les poumons des souris exposées pendant 24h, 1 mois et 3 mois aux PF ou PUF. ; n=5 par condition ; *p ≤ 0,05 vs Control ; **p ≤ 0,01 vs Control ; #p ≤ 0,05 vs PF.....	93
Figure 26 : Tests de génotoxicité in vivo après exposition aiguë. (a) Test des comètes sur le foie. (b) Test des comètes sur le poumon. PM _{2.5} =PF; groupe contrôle positif traité par MMS: Methyl-methane Sulfonate [(100 mg/kg/day) x 2] ; % DNA in tail : % d'ADN dans la queue (% de fragmentation de l'ADN) ; ** p<0,01 (Mann-Whitney).....	94
Figure 27 : Tests de génotoxicité in vivo après 1 mois d'exposition ; (a) Test des comètes sur le foie. (b) Test des comètes sur le poumon. (c) Test du micronoyau sur moelle osseuse. (d) Test de mutation génique in vivo (test Pig-A) sur sang. PM _{2.5} = PF ; groupe contrôle positif traité par MMS: Methylmethane Sulfonate [(100 mg/kg/day) x 2] ; groupe contrôle positif traité par ENU: Ethyl nitroso urée [(40 mg/kg/day) x 3] ; % DNA in tail : % d'ADN dans la queue ; MNPCE/1000 cells : Nombre de micronoyau dans les érythrocytes polychromatiques / 1000 cellules analysées ; PCE/NCE : nombre d'érythrocytes polychromatiques / nombre d'érythrocytes normo-chromatiques ; % RET: % de réticulocytes ; ** p<0,01 (Mann-Whitney) ; * p<0,05 (Dunnet).....	94
Figure 28 : Tests de génotoxicité in vivo après 3 mois d'exposition. (a) Test du micronoyau sur moelle osseuse. (b) Test de mutation génique (Pig-A) sur sang. PM _{2.5} = PF ; groupe contrôle positif traité par CPA: Cyclophosphamide [(50 mg/kg/day) x 1] ; groupe contrôle positif traité par ENU: Ethyl nitroso urée [(40 mg/kg/day) x 3] ; MNPCE/1000 cells : Nombre de micronoyau dans les érythrocytes polychromatiques / 1000 cellules analysées ; PCE/NCE : nombre d'érythrocytes polychromatiques / nombre d'érythrocytes normochromatiques ; % RET: % de réticulocytes ; ** p<0,01 (Mann-Whitney) ; * p<0,05 (Dunnet).....	95
Figure 29 : Quantification du taux de 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) par ELISA compétitive dans les poumons des souris exposées pendant 24h, 1 mois et 3 mois aux PF ou PUF ; n=5 par condition ; *p ≤ 0,05 vs Contrôle.....	96
Figure 30 : Analyse de la réponse inflammatoire dans le LBA des souris exposées aux PF et PUF. Histogrammes montrant le comptage cellulaire des LBA des souris exposées aux PF ou PUF après 24h, 1 mois ou 3 mois d'exposition : cellularité totale du LBA, nombre total de PNN et nombre total de macrophages dans le LBA ; n=5 par condition ; *p ≤ 0,05 vs Contrôle.	97
Figure 31 : remodelage tissulaire des poumons après exposition de 1 mois et 3 mois aux PF et PUF. (a-f) Coupes histologiques pulmonaires (coloration hématoxyline-éosine) montrant l'épaississement de la paroi alvéolaire dans les poumons des souris ; Kyst : lésions kystiques ; grossissement 10 x. (g-l) Marquage immunohistochimique des coupes avec l'anticorps F4/80 (les macrophages sont colorés en marron) ; grossissement 40 x.	100
Figure 32 : (a) Activité enzymatique de la DNMT et (b) pourcentage du taux de méthylation globale de l'ADN dans les poumons des souris exposées pendant 1 mois ou 3 mois aux PF ou PUF ; n=5 par condition ; *p ≤ 0.05 vs Contrôle.	101
Figure 33 : Modifications d'histones induites par l'exposition des souris aux PF ou PUF pendant 1 mois ou 3 mois.....	103
Figure 34 : Comparaison de l'expression génique de Nr1d1, Arntl, et Per2 entre les 2 expériences d'exposition aiguë : (a) aiguë 1 et (b) aiguë 2. Expression génique exprimée en fold-change par rapport au groupe contrôle de souris exposées à de l'HBSS pour les 2 séries d'exposition ; (n = 5 par groupe) *p ≤ 0.05 contre l'exposition à l'HBSS ; # contre l'exposition aux PF.	106
Figure 35 : Diagramme de Venn montrant à 1 mois et à 3 mois le nombre de gènes dérégulés de manière commune entre les expositions subchroniques aux PF et aux PUF.....	108
Figure 36 : Diagramme de Venn illustrant le nombre de gènes dérégulés simultanément à 1 mois et à 3 mois chez les souris exposées aux PF d'une part et les souris exposées aux PUF d'autre part.	108
Figure 37 : : Figure représentant le lien entre les gènes faisant partie du Network 1.....	110
Figure 38 : Analyse par western blot de NF-κB et de p-NF-κB dans l'homogénat des poumons de souris exposées aux PF ou PUF pendant 3 mois. n=3 pour chaque groupe de souris.	110
Figure 39 : Figure représentant le lien entre les gènes faisant partie du Network 2.....	111
Figure 40 : Analyse par western blot de p-38 MAPK, p-GSK-3b, p-MAPKAPK, et p-MKK 3/6, p-ERK 42/44, pAkt thr308, pAkt ser473 et p-c-fos dans l'homogénat des poumons des souris exposées aux PF ou PUF pendant 3 mois. n=3 pour chaque groupe de souris.....	112

Liste des tableaux

Tableau 1. Exemples d'hydrocarbures aromatiques polycycliques retrouvés dans la composition des PM (adapté de [44]).	25
Tableau 2. Modifications post-traductionnelles d'histones induites par l'exposition aux PM.	61
Tableau 3. miARN dérégulés après exposition aux PM.	65
Tableau 4. Anticorps primaires et secondaires utilisés dans les analyses par western blot	85
Tableau 5. Composition élémentaire des PF et PUF quantifiée par ICP-MS (n=3)	90
Tableau 6. Quantification de la composition en HAP des PF et PUF par HPLC (n=3)	91
Tableau 7. L'expression génique de Nqo1, Nrf2 et Ho-1 dans les poumons des souris exposées aux PF ou PUF après 24h, 1 mois et 3 mois d'exposition. **p ≤ 0,01.	95
Tableau 8. L'expression génique d'il-6, il-1b et il-10 dans les poumons des souris exposées aux PF ou PUF après 24h, 1 mois et 3 mois d'exposition. *p ≤ 0,05.	98
Tableau 9. Récapitulatif des modifications histologiques pulmonaires observées après exposition sub-chronique de 1 mois et de 3 mois aux particules. Scores d'évaluation de l'inflammation péri-bronchique et des lésions kystiques : aucun = 0, léger = 1, modéré = 2, marqué = 3, sévère = 4. Les macrophages totaux ont été comptés dans 10 champs de forte puissance (CFP) pour chaque souris. L'épaississement des parois alvéolaires a été évalué en comparant l'épaisseur de la paroi des alvéoles à la taille d'un érythrocyte (E) : <1 E =0; 1 to 2 E =1; 3 to 5 E =2; 6 to 10 E =3; and >10 E =4. Le pourcentage des surfaces lésées représente la distribution de la surface de parenchyme épaissi par rapport à la surface totale du poumon. CFP : champs de forte puissance = 400.	99
Tableau 10. Nombre de gènes dont l'expression pulmonaire est significativement dérégulés d'un facteur supérieur à 2 (p < 0,05) chez les souris exposées ux PF ou aux PUF par rapport aux souris contrôles (HBSS). Pour chaque lot de souris, n = 5.	104
Tableau 11. Nombre de gènes dont l'expression pulmonaire est significativement dérégulés d'un facteur supérieur à 2 (p < 0,05) chez les souris exposées aux PF ou aux PUF pendant 24h par rapport aux souris contrôles (HBSS). Pour chaque lot de souris, n = 5.	105
Tableau 12. Nombre de gènes dont l'expression pulmonaire est significativement dérégulés d'un facteur supérieur à 2 (p < 0,05) chez les souris exposées aux PF ou aux PUF pendant 1 mois ou 3 mois par rapport aux souris contrôles (HBSS). Pour chaque lot de souris, n = 5.	107
Tableau 13. Top 5 des networks les plus dérégulés dans les poumons de souris exposées pendant 3 mois aux PUF.	109

INTRODUCTION

1. Généralités sur la pollution de l'air

Les polluants atmosphériques constituent un mélange hétérogène complexe de substances composées de gaz (ozone, dioxyde de soufre, dioxyde d'azote, monoxyde de carbone, dioxyde de carbone, etc), de composés organiques volatiles (benzène, toluène, xylènes, etc.), et de matières particulaires (PM). Ces polluants peuvent avoir des effets délétères sur la santé ; ils constituent ainsi un risque environnemental considérable. Historiquement, plusieurs épisodes majeurs de pollution de l'air se sont produits dans le monde au début du XXe siècle avec des conséquences graves sur la santé. Le plus tragique, le « The great smog » de Londres en 1952 a entraîné 12 000 décès, une augmentation du nombre d'hospitalisation liées à des problèmes cardiaques et respiratoires, et de graves effets à long terme sur la santé, comme l'augmentation du risque de développement de l'asthme chez les sujets exposés [1,2] (Figure 1).



Figure 1 : Le «The great smog» à Londres en 1952. Le smog désigne un mélange de brouillard et de fumées formant une nappe épaisse, grisâtre ou jaunâtre, irrespirable.

Les catastrophes dues à cet épisode de pollution, aussi bien que celles survenues dans la Vallée de la Meuse en 1930 et à Donoroa en Pennsylvanie en 1948, ont clairement montré que des niveaux extrêmement élevés de smog à base de particules pouvaient augmenter considérablement le taux quotidien de mortalité. La mise en évidence d'une association causale entre l'exposition à un air pollué et l'augmentation du nombre de décès a contribué

à la mise en place, par les autorités concernées, de directives visant à limiter l'émission des polluants qui participent à la dégradation de la qualité de l'air.

La survenue de différents épisodes de pollution a suscité la mise en œuvre de nombreuses études épidémiologiques montrant à chaque fois que l'exposition à un air de mauvaise qualité influence négativement la santé. Les effets peuvent donc être observés immédiatement suite à des pics de pollution ou après exposition à long terme [3]. En effet, une augmentation de la mortalité et du nombre d'hospitalisation pour des raisons respiratoires a été observée après exposition à des pics de pollution [4–8]. Différentes études épidémiologiques réalisées montrent que les expositions à long terme à un air pollué touchent le plus souvent les systèmes respiratoire et circulatoire [9]. La pollution de l'air constitue en effet un des facteurs de risques de la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO), l'asthme, et les allergies respiratoires [10]. Elle a également été associée à des maladies cardiovasculaires comme l'athérosclérose, ainsi qu'à des maladies inflammatoires de l'intestin et au diabète [11]. Plus récemment, d'autres études ont montré que les particules présentes dans l'air pouvaient entraîner des dommages au niveau du système nerveux central (SNC). Plus particulièrement, Maher et ses collaborateurs ont observé des particules de magnétite dans des coupes histologiques de cerveaux de patients atteints de la maladie d'Alzheimer provenant de Manchester et Mexico. Ces types de particules sont retrouvées normalement dans une atmosphère polluée, ce qui suggère que la pollution de l'air contribue au développement de maladies neurodégénératives [12]. La pollution de l'air peut également provoquer des malformations congénitales, ainsi que des effets sur le système immunitaire [10,13,14].

La variabilité des effets de la pollution de l'air sur la santé peut être attribuable à la différence de composition chimique des aérocontaminants et à la différence de dose ou de temps d'exposition à ces composés, ou encore au fait que les personnes sont souvent exposées à un mélange de polluants plutôt qu'à des substances isolées.

2. Sources, caractéristiques physico-chimiques des PM et réglementations

a. Sources des particules

Plusieurs types de PM peuvent être retrouvés dans l'air. Si les PM sont émises directement dans l'atmosphère, elles seront considérées comme PM primaires ; mais si elles sont formées dans l'air suite à des interactions avec d'autres substances, elles seront nommées particules secondaires.

(i) Sources primaires

Même si une grande partie de la pollution de l'air résulte des activités humaines, les particules primaires peuvent être également d'origine naturelle contribuant à la dégradation de la qualité de l'air et l'exposition de l'homme à un air de mauvaise qualité. Parmi les sources naturelles de PM, on peut retrouver : 1) l'aérosol marin contenant des particules de sel de mer, 2) les cendres émises lors des éruptions volcaniques et des activités sismiques, 3) les particules émises par les incendies de forêts, 4) les particules provenant des déserts, et 5) l'aérosol biologique constitué d'endotoxines, de pollens, de champignons et/ou de microorganismes vivants ou non, etc. [15]. Une étude menée par Bauer et ses collaborateurs a montré que les champignons présentes dans l'air constituent environ 5% des PM₁₀ [16]. Une autre étude montre que les particules fines contiennent également des éléments d'origine biologique [17]. Les effets des PM issues de ces secteurs naturels peuvent aggraver les allergies respiratoires et les maladies pulmonaires chez l'homme [18].

Puisque les émissions naturelles ne peuvent pas être contrôlées, les directives visant à réduire la concentration des polluants dans l'air, proposent aux gouvernements d'envisager toutes les mesures appropriées pour réduire l'exposition excessive à ces polluants [19]. Comme annoncé précédemment, les sources anthropogéniques participent d'une manière plus importante à la pollution de l'air. En effet, les différentes activités humaines quotidiennes engendrent des quantités importantes de polluants d'origines diverses. La mise en place de directives visant à réduire les émissions de PM et d'autres polluants atmosphériques a permis

ces dernières années de diminuer leur concentration dans l'air. Parmi les sources qui émettent le plus de PM dans l'air [19–21], on retrouve (Figure 2):

- Les activités urbaines qui participent à l'émission de particules résultant de la combustion de carburants comme le bois, le charbon ou le fioul pour le chauffage, la cuisine, etc. Cette source d'émission représente plus de la moitié de celles qui génèrent des PM_1 (68%). Par ailleurs, 35% et 51% des PM_{10} et des $PM_{2,5}$ sont respectivement issues de cette source.
- L'agriculture, avec essentiellement, le travail du sol, la fermentation entérique, la gestion des déchets vétérinaires, et la consommation de combustibles fossiles ; les activités agricoles représentent respectivement 21%, 9% et 3% des sources d'émission de PM_{10} , $PM_{2,5}$ et PM_1 .
- L'industrie manufacturière : Ce secteur regroupe plusieurs activités, notamment la construction, les sources de combustion, la métallurgie, etc. Elle occupe une partie importante des sources d'émission avec une proportion respective de 28%, 21% et 12% des PM_{10} , $PM_{2,5}$ et PM_1 .
- Le transport : le trafic routier représente la source qui génère la partie la plus importante de PM émis par les activités de transport. D'autres sources comme le transport aérien, ferroviaire ou maritime produisent aussi des PM. Le transport représente environ 15% des sources d'émission anthropogéniques de PM_{10} , $PM_{2,5}$ et PM_1 .

L'OMS propose plusieurs mesures à prendre en considération pour réduire la pollution de l'air émis par les sources citées ci-dessus : 1) l'utilisation de sources d'énergie non nuisibles à l'environnement, par exemple des carburants ayant une teneur réduite en soufre ; 2) la réduction de la consommation énergétique en construisant des villes plus écologiques ; 3) la mise en place de stratégies pour réduire les déchets et les recycler ; ainsi que 4) une meilleure gestion des déchets biologiques [22].

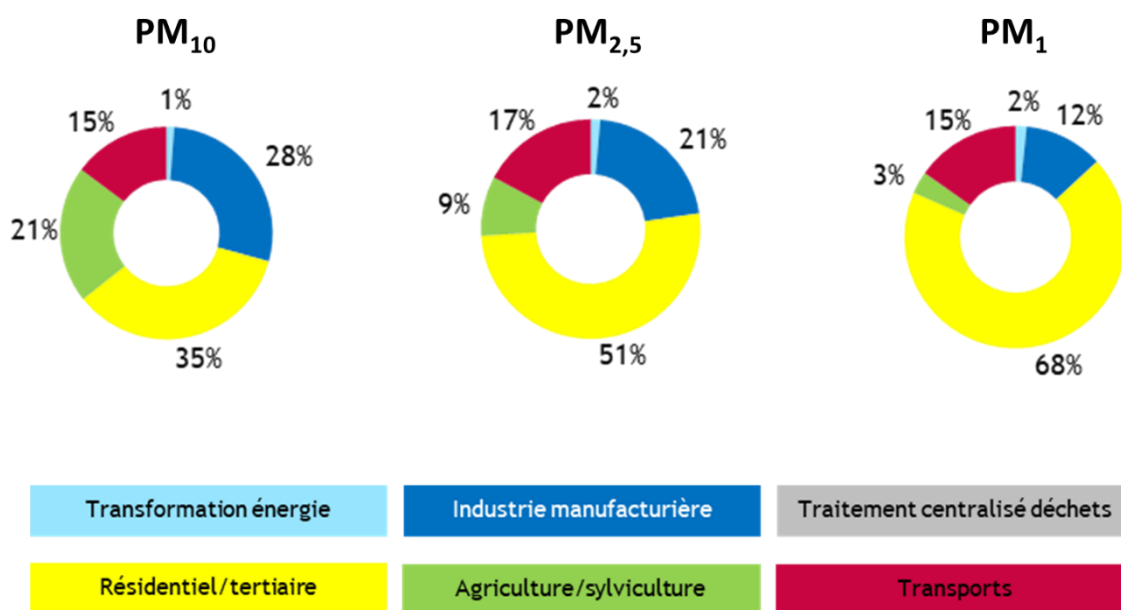


Figure 2 : Distribution des sources primaires d'émission de PM₁₀, PM_{2,5} et PM₁. D'après CITEPA 2018 [23].

(ii) Particules secondaires

Les PM sont considérées secondaires lorsqu'elles sont formées dans l'atmosphère suite à une interaction entre des substances chimiques gazeuses (sulfates, nitrates, ou des composés organiques) [24]. La formation de nouvelles particules consiste en un ensemble de 3 processus complexes : la nucléation, la condensation et la coagulation (Figure 3) [25]. Ces processus sont influencés par les conditions météorologiques, le mélange des gaz présents dans l'air et la localisation géographique [26]. Par exemple, les particules secondaires de soufre sont formées par oxydation du dioxyde de soufre gazeux émis par la combustion du charbon ou du pétrole, tandis que les particules secondaires de nitrates sont formées suite à une oxydation du dioxyde d'azote émis par les véhicules [26].

La nucléation est la première étape de la formation de particules secondaires. Elle consiste en la transition d'un état gazeux en état liquide ou solide par condensation ou suite à une réaction chimique entre différents gaz, formant un nouveau noyau ou une nouvelle particule dans l'atmosphère. Les particules néoformées sont des PUF du fait de leur petite taille. Ensuite, deux autres étapes sont possibles pour former des particules de plus grande taille par condensation et coagulation [27]. Les aérosols formés dans les étapes précédentes commencent à s'agglomérer par mouvement brownien et contact entre les particules [19].

Ce phénomène permet de former des particules de tailles et de compositions différentes (Figure 3).

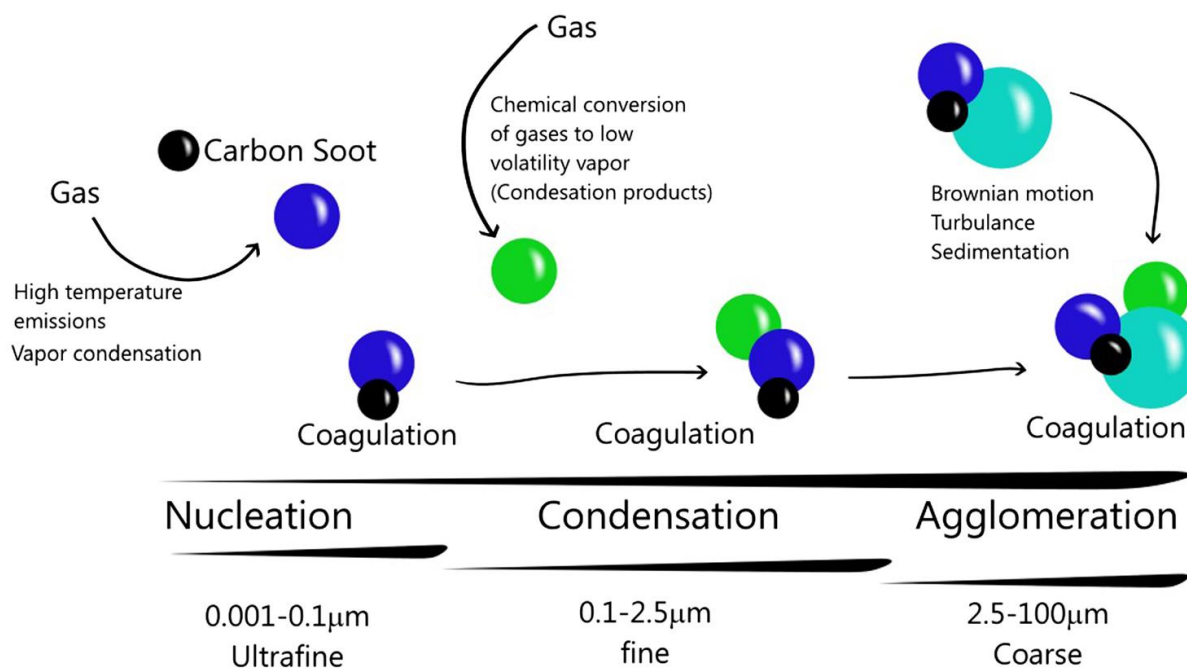


Figure 3 : La formation d'aérosol secondaire. La taille des particules augmente et leur composition devient plus complexe suivant les 3 étapes suivantes : nucléation, condensation et agglomération [19].

b. Caractérisations chimiques des PM

(i) Les particules sont un mélange complexe

Les PM constituent un mélange hétérogène et complexe de composants contenant des métaux, des composés organiques (mesurés en tant que carbone organique), des matières d'origine biologique, des matières carbonées inorganiques (le carbone noir et le carbone élémentaire), des sulfates, des nitrates, de l'ammonium et d'autres ions. La source et la composition des PM diffèrent en fonction de la taille des particules. Les PM₁₀ sont constituées en grande partie de minéraux insolubles, de substances d'origine biologique (pollen, endotoxines, champignons et bactéries) et du sel de mer. Par contre, les PM_{2,5} et les PM_{0,1} proviennent principalement de sources liées à la combustion et comprennent donc des particules avec un noyau de carbone (sur lequel sont adsorbés des HAP et des métaux), et des particules secondaires formées à partir d'oxydes de soufre et d'azote [26,28,29].

Différentes études toxicologiques ont montré que les PM constituent les composants de la pollution de l'air ayant les effets les plus néfastes pour la santé. Il a été établi que les PM entraînent un certain nombre d'effets biologiques qui permettent d'expliquer les conséquences sanitaires observés pendant les épisodes de pollution. En particulier, les métaux et les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) présents sur les PM sont associés à des effets néfastes sur la santé respiratoire [30].

(ii) Métaux

Les éléments-traces métalliques sont présents dans pratiquement toutes les fractions de PM. Différents métaux comme le Mn, le Pb, le Ni, le Cd, le Cu, le Cr, le V et le Zn ont été retrouvés dans les PM [31]. La combustion des hydrocarbures, le soudage, et le traitement des métaux à haute température sont parmi les activités à l'origine de l'émission des métaux dans l'air [32]. Les sources d'émission des métaux présents dans les différentes fractions de PM ont été analysées dans plusieurs études. Par exemple deux études menées à Shanghai et en Mexique, ont montré que les métaux présents dans les fractions fine et ultrafine sont principalement émis par l'industrie et le trafic [33,34].

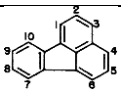
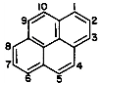
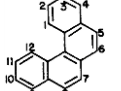
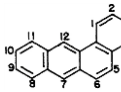
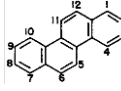
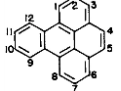
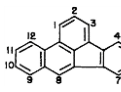
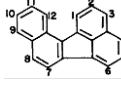
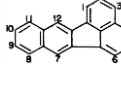
L'inhalation des PM à travers le système respiratoire constitue la principale voie d'entrée des métaux chez l'homme. Même en faible quantité, les métaux peuvent induire des effets néfastes sur la santé. Plusieurs études épidémiologiques ont montré que l'exposition à des PM adsorbant des métaux à leur surface peut aggraver les effets négatifs de ces métaux sur la santé [35,36]. Il est intéressant de noter que les métaux représentent les éléments majeurs des PM induisant la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) [19]. Il a été montré que le Cu, le Zn et le V sont liés à des effets cardiovasculaires [37]. D'autre part, l'As, le Cd, le Cr, et le Ni ont été associés au développement de certains cancer chez l'homme [16,38].

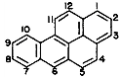
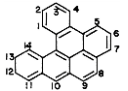
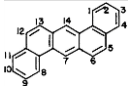
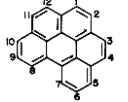
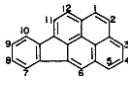
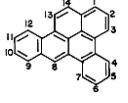
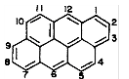
(iii) Hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP)

Les HAP sont des composés ayant des structures diverses et une toxicité variée (Tableau 1). Les sources d'émission des HAP sont nombreuses, mais la combustion incomplète de matières organiques d'origine naturelle ou anthropogénique telle que le charbon, le pétrole ou le bois en constitue la source principale [39]. Cependant les HAP sont parfois

utilisés pour des fins commerciales. Ils sont par exemple utilisés dans les produits agricoles (pesticides), les produits pharmaceutiques, les colorants, et dans d'autres industries chimiques (Fluorene, Fluoranthene, Pyrene, Anthracene, etc.) [40]. Les HAP sont retrouvés en concentrations plus importantes dans les zones urbaines que dans les zones rurales, car leurs sources d'émission se situent principalement dans les zone urbaines [39]. Ils sont constamment émis dans l'air ce qui favorise leur accumulation dans l'environnement. Le centre international de recherche sur le cancer (CIRC) classe certains HAP comme cancérigènes pour l'homme (groupes 1 : benzo[a]pyrene, groupe 2A : dibenz[a,h]anthracene, ou groupe 2B : benzo[k]fluoranthene) ; d'autres sont classés tératogènes (ex: benzo[a]pyrene) et constituent donc des substances dangereuses qui menacent la santé [41–43]. Par conséquent, ils sont soumis à plusieurs réglementations dans le monde pour limiter leur émission dans l'environnement [39].

Tableau 1. Exemples de HAP retrouvés dans la composition des PM (adapté de [44]).

HAP (nom)	Formule chimique	Structure chimique	Cancérigènes CIRC
Fluoranthene (FLA)	C ₁₆ H ₁₀		3
Pyrene (PYR)	C ₁₆ H ₁₀		3
Benzo(c)phenanthrene (BcPHE)	C ₁₈ H ₁₂		2B
Benzo(a)anthracene (BaA)	C ₁₈ H ₁₂		2B
Chrysene (CHR)	C ₁₈ H ₁₂		2B
Benzo(e)pyrene (BeP)	C ₂₀ H ₁₂		
Benzo(b)fluoranthene (BbF)	C ₂₀ H ₁₂		2B
Benzo(j)fluoranthene (BjF)	C ₂₀ H ₁₂		2B
Benzo(k)fluoranthene (BkF)	C ₂₀ H ₁₂		2B

Benzo(a)pyrene (BaP)	C ₂₀ H ₁₂		1
Dibenzo(a,l)pyrene (DaIP)	C ₂₀ H ₁₄		2A
Dibenzo(a,h)anthracene (DahA)	C ₂₂ H ₁₄		2A
Benzo(g,h,i)perylene (BghiP)	C ₂₂ H ₁₂		3
Indeno(1,2,3-c,d)pyrene (IP)	C ₂₂ H ₁₂		2B
Dibenzo(a,e)pyrene (Daep)	C ₂₄ H ₁₄		
Anthanthrene (ANTH)	C ₂₂ H ₁₂		

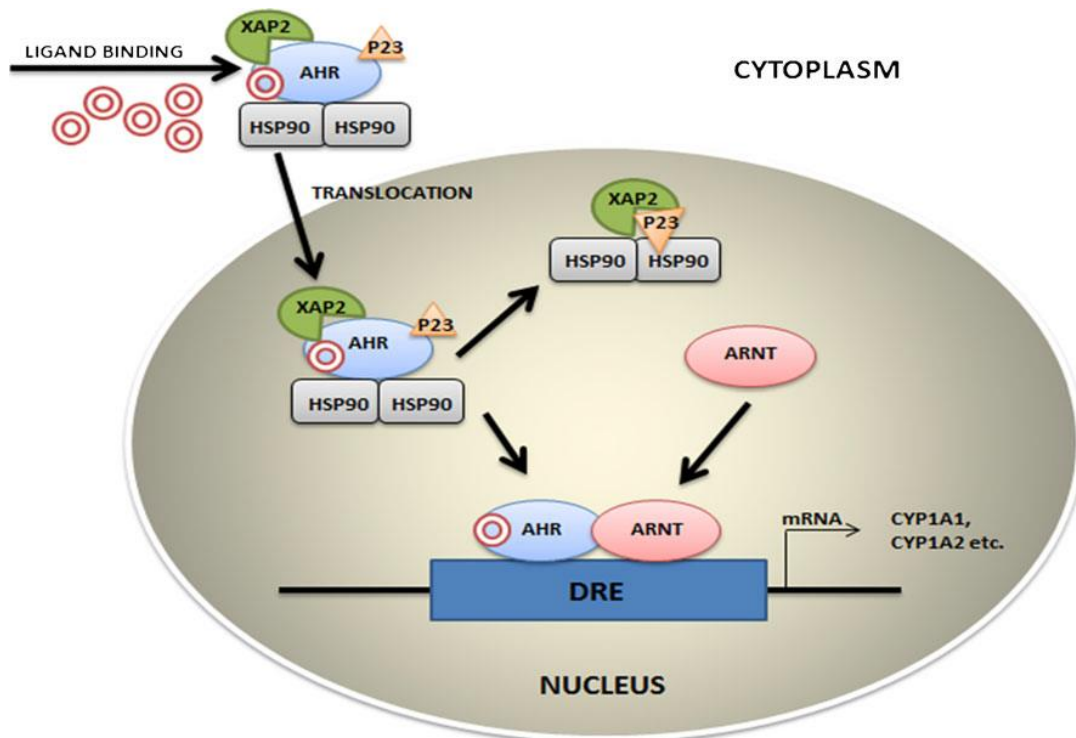


Figure 4 : Induction des gènes du cytochrome P450 après activation de AhR : AhR forme initialement un complexe avec des protéines chaperons (HSP90), une sous-unité appelée (XAP2) et une protéine accessoire p23. Les ligands des HAP se lient à AhR et le dissocient de HSP90, XAP2, et p23. Ensuite, AhR se déplace vers le noyau et forme un hétérodimère avec AhR nuclear translocator (ARNT) et se lie au dioxin response elements (DRE) pour activer ou inhiber l'expression de gènes comme CYP1A1 et CYP1B1, etc [45].

Un air pollué est l'un des facteurs principaux d'exposition de l'homme aux HAP. Par conséquent, le système respiratoire est en contact direct avec ces molécules constituant un facteur de risque réel de cancérogénèse pulmonaire [46]. Une fois que les HAP sont en contact avec les cellules pulmonaires, ils activent le récepteur AhR (Aryl hydrocarbon receptor) qui forme par la suite un hétérodimère avec la protéine ARNT (AhR nuclear translocator) pour interagir avec des éléments de réponse spécifiques aux xénobiotiques (XRE ou Xenobiotique Response Element) que l'on retrouve dans la région promotrice de nombreux gènes de protéines impliquées dans la biotransformation des xénobiotiques telles que les cytochromes P450 (Figure 4). Le métabolisme du benzo(a)pyrène dans le poumon constitue un exemple représentatif d'un processus de bioactivation qui aboutit à la production de métabolites intermédiaires génotoxiques. Le benzo(a)pyrène, formé lors de la combustion incomplète de composés organiques, se trouve dans les gaz d'échappement de moteur diesel, la fumée de cigarette et dans l'atmosphère de certains lieux de travail exposés. Le métabolisme du benzo(a)pyrène par le *CYP1A1* aboutit dans le poumon à la production du benzopyrène-7,8-diol-9,10-époxyde, un composé extrêmement réactif qui, s'il n'est pas pris en charge par d'autres enzymes dites de phase II, peut se lier d'une manière covalente à l'ADN, aboutissant à des mutations et, éventuellement, à une altération de la croissance cellulaire et au développement de tumeurs (figure 5). Il est important aussi de signaler qu'au cours de chaque cycle catalytique des CYPs, il y a production supplémentaire d'espèces réactives de l'oxygène.

Le récepteur AhR est fortement exprimé dans les cellules épithéliales bronchiques chez l'homme. Il joue donc un rôle physiologique important dans les poumons notamment sur la prolifération et la différenciation cellulaire, l'adhésion cellulaire, l'expression des cytokines, la production de mucus et le métabolisme des xénobiotiques. Plusieurs études montrent que ce récepteur est impliqué dans la tumorigénèse pulmonaire, via son interaction avec certains ligands cancérogènes comme le BaP et le DahA et leur bioactivation en métabolites génotoxiques par les cytochromes P450 (Figure 5) [47].

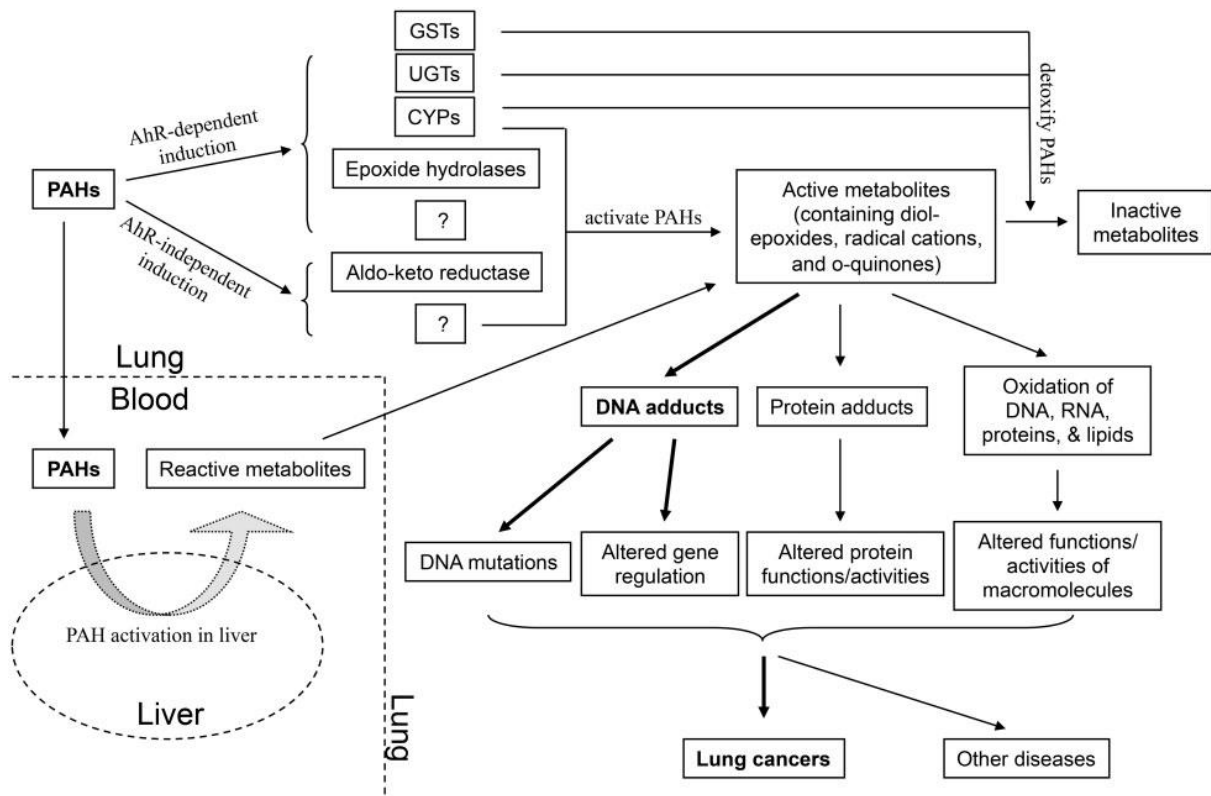


Figure 5 : les mécanismes à travers lesquels les HAP induisent un cancer de poumons [47].

c. Taille des PM

La toxicité des PM est influencée par leur composition chimique mais également par leurs caractéristiques physiques et, en particulier, par leur taille. Les PM ont souvent une forme non-sphérique correspondant à des agrégats de plusieurs particules, ce qui complexifie la mesure de leur taille et de leur concentration [48]. De ce fait, les PM sont classées selon leur diamètre aérodynamique équivalent (DAE) et non pas selon leur diamètre géométrique. Le DAE équivalent est défini comme le diamètre que pourrait avoir une sphère ayant les mêmes caractéristiques physico-chimiques que les particules de forme irrégulière [48]. Le DAE des PM détermine le mécanisme de leur déposition dans les poumons et dans l'environnement ; c'est pour cela qu'il joue un rôle très important dans leur comportement et leurs effets sur la santé [49]. Par conséquent, les PM sont classés selon leur DAE en 3 catégories : les particules grossières ou PM_{10} ($DAE \leq 10 \mu m$), les particules fines (PF) ou $PM_{2,5}$ ($DAE \leq 2,5 \mu m$) et les particules ultrafines (PUF) ou $PM_{0,1}$ ($DAE \leq 0,1 \mu m$) (Figure 6).

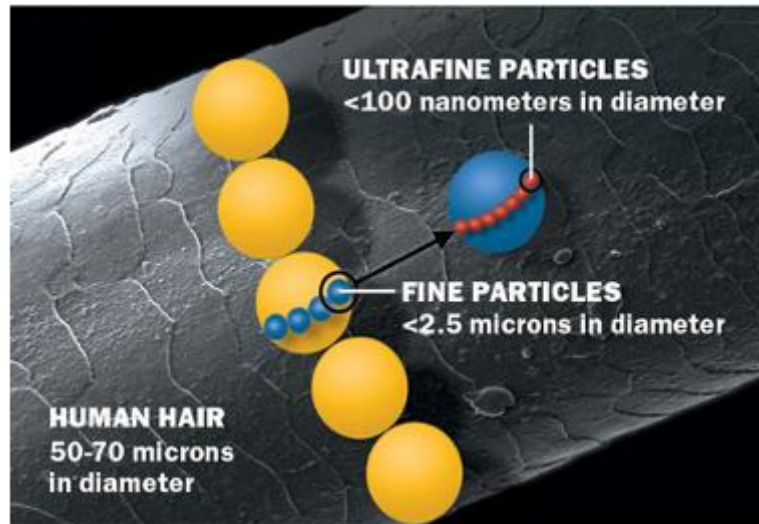


Figure 6 : Comparaison de la taille de PUF et PF par rapport au diamètre d'un cheveux [50].

d. Règlementation européenne et mondiale

La pollution de l'air est l'une des préoccupations politiques de l'Europe depuis la fin de l'année 1970. La politique de l'Union européenne en matière de qualité de l'air vise à développer et mettre en œuvre des instruments appropriés pour améliorer la qualité de l'air. Les principaux instruments sont une série de directives fixant des normes pour assurer une protection contre les concentrations excessives de polluants présents dans l'air ambiant, en se basant sur les dernières recherches sur les effets de la pollution atmosphérique sur la santé.

La mise en place de la directive 2008/50/EC a permis d'établir des normes pour limiter l'émission de plusieurs polluants dont les PM. En conséquence, la moyenne annuelle en PM_{10} ne doit pas excéder $40 \mu\text{g}/\text{m}^3$, et une concentration journalière de $50 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ne doit pas être dépassée plus de 35 fois par an. En ce qui concerne les $PM_{2,5}$, la directive a imposé une concentration annuelle moyenne limitée à $25 \mu\text{g}/\text{m}^3$ à atteindre en 2015. Le prochain objectif est de réussir à réduire la concentration annuelle moyenne à une valeur de $20 \mu\text{g}/\text{m}^3$ au premier Janvier 2020. De plus, le contrôle des émissions provenant de sources mobiles, l'amélioration de la qualité des carburants et l'intégration d'exigences de protection de l'environnement dans le secteur de transport et de l'énergie font partie des objectifs de cette directive [15].

Cependant les recommandations de l'organisation mondiale de la santé (OMS) sont plus restrictives. Elles suggèrent qu'une concentration annuelle moyenne n'excédant pas $20 \mu\text{g}/\text{m}^3$ pour les PM_{10} et $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$ pour les $\text{PM}_{2,5}$ permettrait de réduire les décès liés à la pollution de l'air d'environ 15% [51].

3. Pénétrance et déposition des particules dans le système respiratoire

a. Structure du système respiratoire

Le système respiratoire est divisé en deux parties : les voies respiratoires et le parenchyme pulmonaire. Les voies respiratoires sont constituées de la trachée qui se divise en bronches. Ces dernières se ramifient en bronchioles puis en alvéoles qui sont les plus petites structures du système respiratoire et qui donnent aux poumons l'aspect d'une éponge. Les bronchioles et les alvéoles se retrouvent dans le parenchyme pulmonaire où ont lieu les échanges gazeux avec le sang. Chez l'homme : le poumon droit est divisé en 3 lobes et le poumon gauche en 2 lobes [52].

Dans les grandes voies aériennes, l'épithélium est pseudostratifié ; au fur et à mesure de la subdivision de ces voies, la structure de l'épithélium se modifie. Il devient cylindrique puis cubique dans les petites voies aériennes (figure 7).

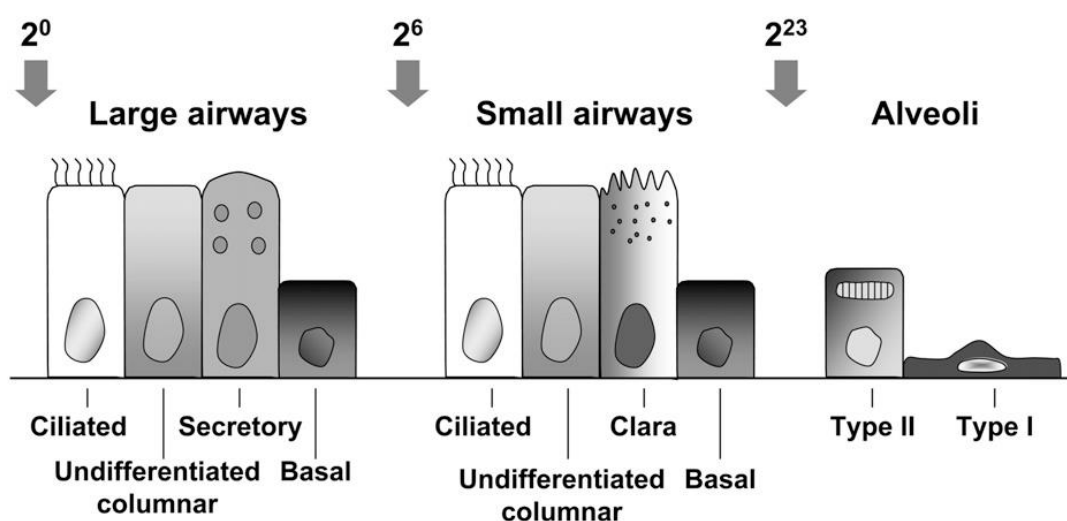


Figure 7 : Principaux types cellulaires constituant l'épithélium du système respiratoire. La structure de l'épithélium se modifie au fur et à mesure de la stratification du système respiratoire où les cellules ciliées, les cellules caliciformes, les cellules de Clara et les cellules basales présentes dans les voies respiratoires sont remplacées par les pneumocytes de type I et II au niveau des alvéoles [53].

Les quatre principaux types cellulaires de l'épithélium des bronches assurant une barrière physique et chimique contre les substances environnementales sont : 1) les cellules ciliées, 2) les cellules caliciformes produisant du mucus, 3) les cellules de Clara qui sécrètent des composés antimicrobiens et 4) les cellules basales. Les cellules de Clara et les cellules basales servent aussi de cellules progénitrices des autres types cellulaires [54–56]. La proportion de chaque type cellulaire dépend du diamètre des voies aériennes (Figure 8). Dans les grandes voies aériennes, les cellules ciliées et les cellules caliciformes créent une barrière de défense ; en parallèle, dans les petites voies aériennes les cellules caliciformes deviennent moins fréquentes et les cellules de Clara et sécrétoires deviennent prédominantes [54]. Dans les alvéoles, les cellules alvéolaires de type 1 assurent les échanges gazeux, et les cellules alvéolaires de type 2 sécrètent le surfactant pulmonaire. Une dérégulation de la fonction des cellules épithéliales peut entraîner des maladies respiratoires chroniques [53]. Par exemple, dans la BPCO et l'asthme, une métaplasie des cellules muqueuses dans les petites voies respiratoires se produit suite à une inflammation et entraîne une obstruction de ces voies [54].

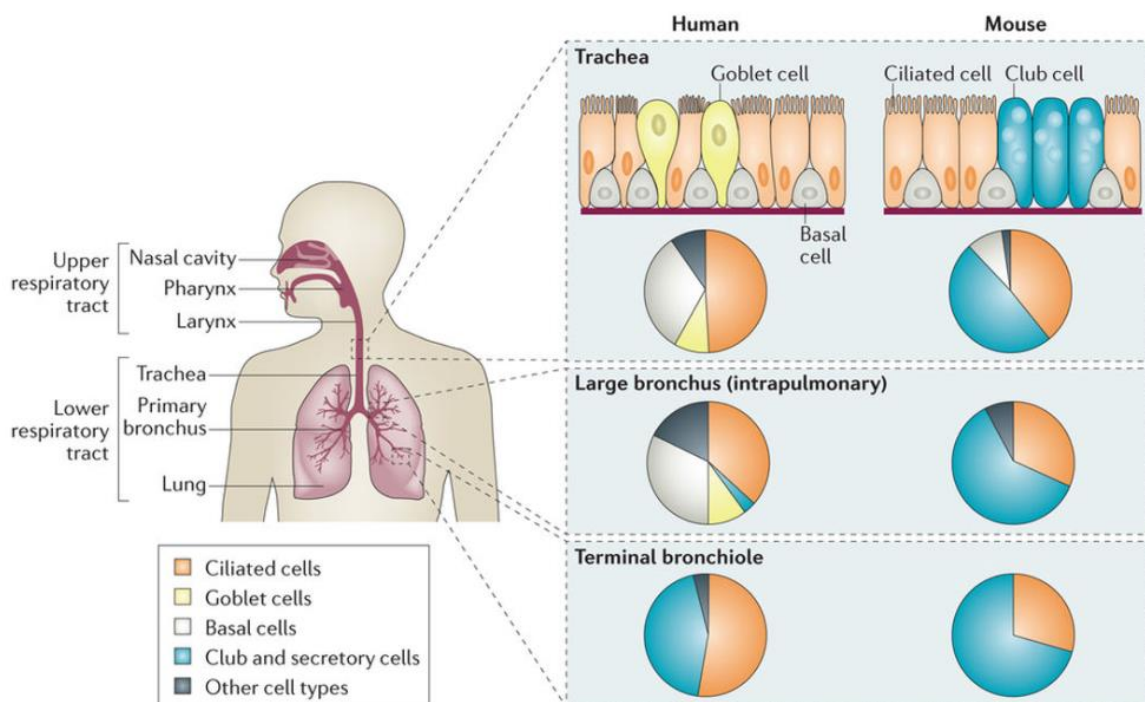


Figure 8 : La composition cellulaire des voies respiratoires varie selon le diamètre des voies respiratoires [54].

Les différentes cellules épithéliales coopèrent entre elles et interagissent avec d'autres cellules présentes dans le tissu pulmonaire comme les cellules endothéliales,

mésenchymateuses, ou avec la matrice extracellulaire afin d'assurer une lutte efficace contre les agents extérieurs [54]. De plus, Les cellules épithéliales respiratoires orchestrent l'immunité innée pulmonaire ; elles secrètent une diversité de protéines de défense contre les agents extérieurs afin d'améliorer leur reconnaissance et leur destruction par les cellules immunitaires [57]. Les macrophages alvéolaires (AM) sont parmi les cellules immunitaires qui interviennent dans cette réponse ; ils constituent l'une des premières lignes de défense contre l'invasion microbienne dans les voies respiratoires. Ils résident dans le mucus des voies aériennes et dans les alvéoles pulmonaires [58] (Figure 9). Ensuite, les cellules dendritiques pulmonaires sont activées (CD). Ce sont des cellules présentatrices d'antigènes et sont responsables du lien entre l'immunité innée et l'immunité adaptative. Elles transportent donc les antigènes vers les ganglions lymphatiques locaux et les présentent aux lymphocytes B et T qui vont mener une réponse spécifique contre ces antigènes [58]. Il a été démontré que les PM peuvent participer directement à la maturation des cellules myéloïdes CD1c+ qui sont des précurseurs des CD présentes dans la muqueuse et la sous-muqueuse pulmonaire. Les PM peuvent ainsi favoriser la maturation des CD en stimulant les cellules épithéliales pulmonaires pour produire du O,1 (granulocyte/macrophage colony stimulating factor), un facteur essentiel à la survie et à la différenciation des CD myéloïdes pulmonaires [59].

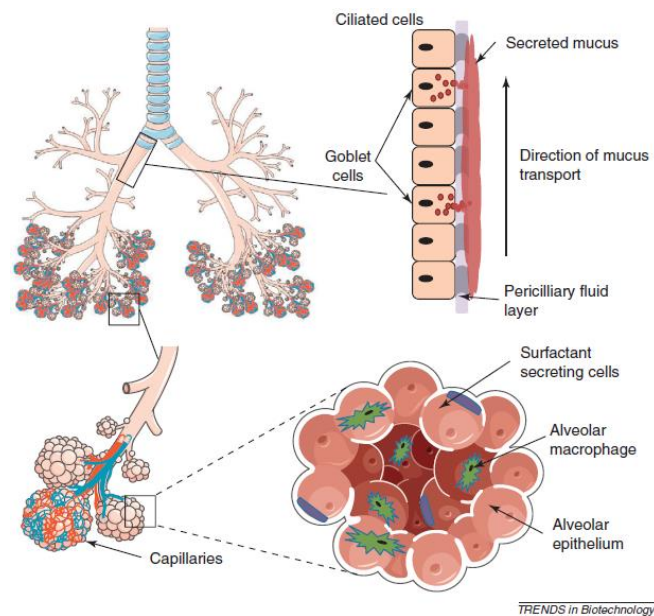


Figure 9 : Figure représentant la structure tissulaire des voies aériennes (trachée, bronches et bronchioles) et les alvéoles dans le parenchyme pulmonaire. Le tissu muqueux des grandes voies aériennes est constitué de cellules ciliées et de cellules caliciformes sécrétant du mucus qui permet d'éliminer les antigènes inhalés par la clairance mucociliaire. Au niveau du parenchyme pulmonaire, les échanges gazeux avec le sang sont assurés par les alvéoles. Ces derniers sont dotés de cellules immunitaires leur permettant d'éliminer les antigènes : ce sont les macrophages alvéolaires. Adapté de [58].

b. Dépôt des particules dans les poumons

La connaissance des sites de dépôt et de la quantité de particules de tailles différentes inhalées dans les voies respiratoires, est nécessaire pour déterminer et comprendre les effets sanitaires associés à l'exposition à ces particules. La déposition des particules dans les voies respiratoires dépend de plusieurs paramètres : la taille et la morphologie des particules, le volume d'air inspiré, la fréquence respiratoire ainsi que la morphologie des voies respiratoires [60]. La taille des particules joue un rôle très important dans leur déposition, puisqu'elle détermine la profondeur de leur pénétration. Cette caractéristique permet donc de les localiser et de déduire leurs mécanismes de clairance et de translocation [19,49,58].

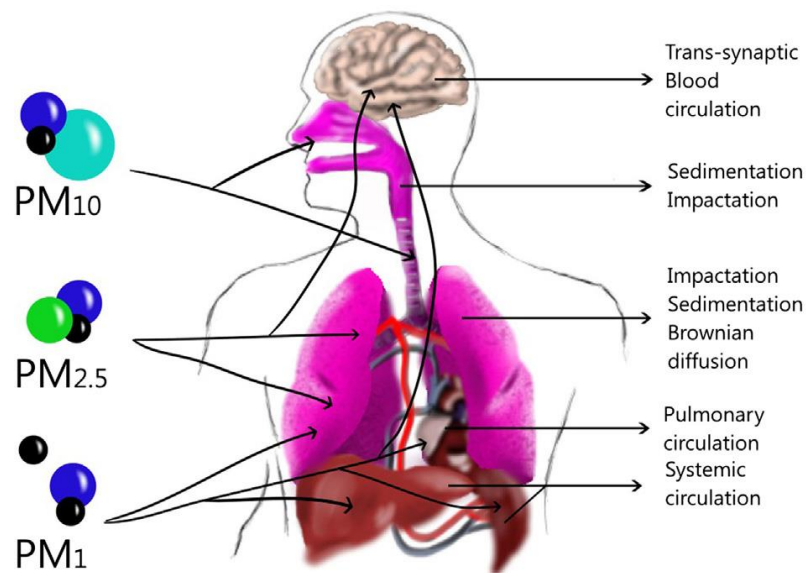


Figure 10 : Comportement et déposition des particules dans le système respiratoire selon leur taille. Les grandes particules sont déposées par impaction ou sédimentation, par contre les particules de plus petite taille sont déposées par diffusion brownienne. Les PUF passent dans la circulation et atteignent d'autres tissus [19].

Une particule est considérée déposée lorsqu'elle se déplace de la lumière vers la paroi d'une voie respiratoire [60]. La déposition des particules dans les poumons se produit donc par impaction, sédimentation et diffusion brownienne [49]. En effet, les particules grossières peuvent pénétrer les voies respiratoires supérieures [58] et sont déposées par impaction ou sédimentation. Les particules fines (PF) peuvent atteindre les bronchioles et les alvéoles, et se déposent par sédimentation et diffusion brownienne. Les particules ultrafines (PUF) peuvent atteindre les régions les plus profondes du système respiratoire et sont déposées dans les poumons par diffusion brownienne. Leur petite taille leur permet de traverser la barrière épithéliale très rapidement ce qui leur permet de passer dans la circulation

systémique puis vers d'autres organes comme le cœur, le foie, le cerveau, etc. [19,58,61,62] (Figure 10).

c. Mécanismes de clairance

(i) Clairance mucociliaire

L'épithélium des voies respiratoires est exposé quotidiennement à des agents pathogènes présents dans l'environnement comme des virus, des bactéries, des gaz ou des particules. Différents systèmes de défense ont évolué chez l'homme pour protéger le tractus respiratoire et le maintenir dans un état le plus stérile possible [63,64]. L'un de ces mécanismes les plus importants est la clairance mucociliaire. Elle constitue la première ligne de défense et possède trois fonctions principales : 1) elle sert de barrière mécanique en piégeant les particules dans le mucus visqueux qui recouvre l'épithélium respiratoire et ensuite, grâce aux battements synchronisés des cils des cellules ciliées sous-jacentes, en propulsant le mucus et les substances piégées vers le pharynx où l'ensemble sera dégluti [65] ; 2) le mucus a des propriétés chimiques lui permettant de neutraliser les particules engluées ; 3) le mucus constitue aussi une barrière biologique en interagissant avec les microorganismes et en les empêchant d'atteindre l'épithélium [63]. Ce sont les cellules ciliées, les cellules caliciformes de l'épithélium respiratoires ainsi que les cellules sécrétoires des glandes sous-muqueuses qui contribuent directement à la clairance mucociliaire [64].

Les constituants le mucus, i.e. mucines et mucopolysaccharides, sont sécrétés par les cellules caliciformes de l'épithélium et les cellules sécrétoires des glandes sous-muqueuses. La viscosité du mucus est un paramètre important qui peut influencer l'efficacité de la clairance mucociliaire [55]. Il a été démontré que la vitesse de transport du mucus par les cellules ciliées est indirectement proportionnelle à la viscosité du mucus [63]. En moyenne, le temps nécessaire pour éliminer des particules déposées dans le tractus respiratoire varie de moins d'une heure à 2 jours. Les particules déposées dans les voies respiratoires proximales sont éliminées plus rapidement en raison de la courte distance avec le pharynx et la faible viscosité du mucus à ce niveau [66].

Plusieurs facteurs sont à l'origine d'un déficit de la clairance mucociliaire. D'une part, les traumatismes physiques (insertion d'une bronchoscope, chirurgie, etc.) peuvent

directement léser l'épithélium respiratoire [63]. D'autre part, les battements ciliaires peuvent être altérés du fait d'anomalies génétiques comme dans le cas de la dyskésie ciliaire primitive où les patients atteints souffrent d'une maladie respiratoire chronique des voies respiratoires supérieures et inférieures. Enfin, une surproduction et une augmentation de la sécrétion de mucus peuvent également affecter la clairance mucociliaire et aboutir à une obstruction chronique ; c'est une caractéristique de nombreuses maladies chroniques des voies respiratoires comme la BPCO, la mucoviscidose et l'asthme [64]. Les conséquences de l'altération de la clairance mucociliaire montrent que cette première ligne de défense joue un rôle fondamental pour la protection du système respiratoire.

(ii) Clairance macrophagique

En plus de la clairance mucociliaire, la protection des poumons contre les agents pathogènes est assurée par la clairance macrophagique. En effet, l'épithélium des voies respiratoires et les macrophages constituent une première et deuxième ligne de défense essentielle contre les pathogènes. Dans les conditions normales, les macrophages alvéolaires résidant dans les poumons fonctionnent comme des sentinelles en surveillant l'environnement pulmonaire afin de détecter les agents pathogènes inhalés, et empêcher efficacement leur accumulation dans les poumons, sans induire une inflammation qui pourrait endommager les structures délicates impliquées dans les échanges gazeux [67].

Lorsqu'un agent pathogène échappe à la clairance mucociliaire, il peut atteindre les alvéoles où il doit être éliminé le plus rapidement possible par les macrophages. Cependant, le mécanisme de clairance macrophagique est un processus relativement long. Les particules arrivant dans les alvéoles peuvent donc y résider des centaines de jours voire plus [66]. Selon leur localisation dans les poumons, les bronches, le tissu interstitiel ou les alvéoles, on distingue plusieurs populations de macrophages ayant des phénotypes et fonctions spécifiques [68]. Le rôle de ces macrophages est de phagocyter les agents pathogènes, d'éliminer les cellules mortes et de maintenir l'homéostasie alvéolaire. En absence de maladie, ces phagocytes se renouvellent dans les poumons tout au long de la vie. Cependant, dans le cas d'inflammation, les macrophages alvéolaires prolifèrent localement et une autre population de phagocytes apparaît. En effet, des monocytes provenant de la circulation migrent vers le tissu enflammé où ils se différencient en macrophages [69].

La phagocytose est le processus d'endocytose principal par lequel les macrophages ingèrent leurs cibles. Il s'agit d'un réarrangement du cytosquelette qui permet d'internaliser rapidement les cibles et de former un phagosome. Une fois la cible internalisée, l'intérieur du phagosome devient acide après fusion avec des lysosomes et des endosomes contenant des enzymes hydrolytiques et des ERO nécessaires à la destruction de la cible [70,71]. La fonction phagocytaire des macrophages peut être dérégulée sous différentes conditions. Dans les maladies inflammatoires chroniques comme la BPCO, l'asthme et la mucoviscidose, l'homéostasie est perturbée ce qui contribue à un cercle vicieux d'inflammation. Le nombre de macrophages dans ces maladies augmente, alors que leur fonction est altérée [72,73]. Il a été décrit qu'un dysfonctionnement des macrophages alvéolaires est corrélé à la sévérité et à l'exacerbation de l'inflammation chronique [74,75]. Les étiologies sont différentes d'une maladie à l'autre, mais les raisons de l'altération de la phagocytose sont communes entre ces maladies. Elles comprennent une altération de l'expression des récepteurs phagocytaires, une diminution de la destruction lysosomale des cibles phagocytées, et une augmentation de la production de médiateurs inflammatoires qui peuvent aggraver l'inflammation et entraîner des dommages dans les tissus environnants. Par conséquent, les perturbations au niveau des tissus du système respiratoire, notamment par les PM internalisés dans les poumons, semblent avoir un effet majeur sur la fonction des macrophages alvéolaires dans ces maladies [67].

(iii) La clairance des particules dépend de leur taille

Le site de dépôt des particules dans le système respiratoire pourrait révéler en partie leurs différents effets sur la santé. Par exemple, le mode et la vitesse de clairance de ces particules est déterminé en fonction de la voie respiratoire au niveau de laquelle elles sont déposées. Les $PM_{2,5}$ et les PM_{10} , sont majoritairement déposées dans les voies respiratoires supérieures et sont éliminées par la clairance mucoiliaire (quelques heures à 2 jours en moyenne). Les $PM_{2,5}$ qui parviennent à traverser les voies supérieures et arriver dans les alvéoles peuvent être éliminées par les macrophages. Par contre pour les PUF, la majorité d'entre elles atteignent les alvéoles où elles sont pris en charge par les macrophages [76,77].

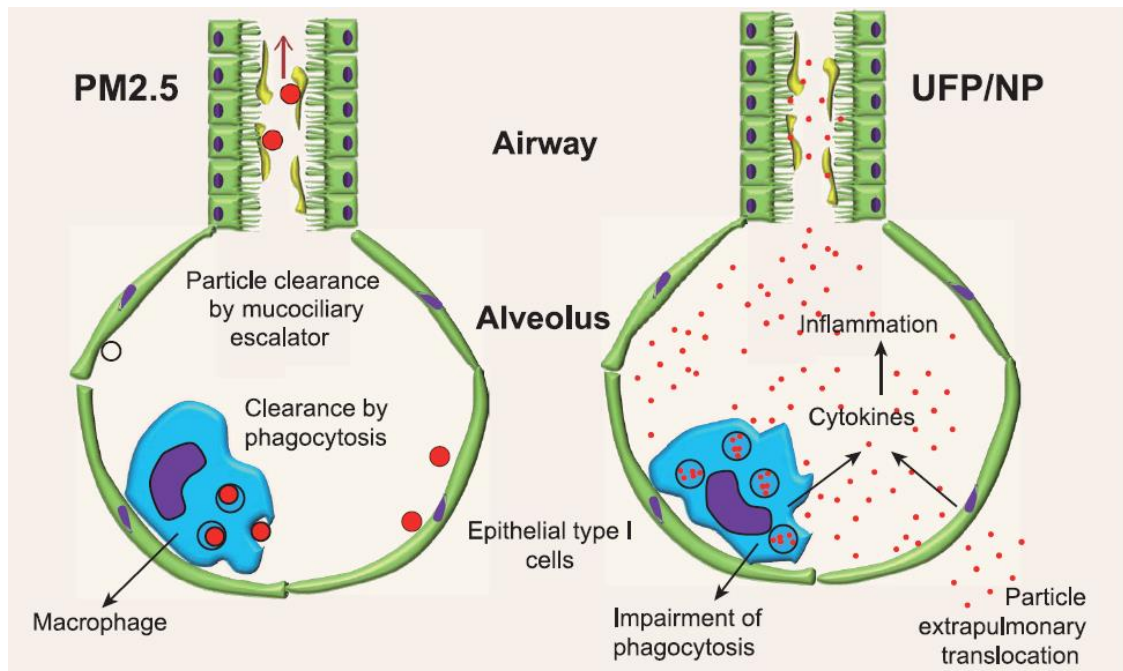


Figure 11 : Schéma représentant les événements physiologiques et toxicologiques après exposition aux $PM_{2,5}$ et aux PUF. Les $PM_{2,5}$ sont déposées principalement aux niveaux des voies respiratoires supérieures où elles sont éliminées par clairance mucociliaire. Le reste des $PM_{2,5}$ qui réussissent à atteindre les alvéoles sont éliminés par les macrophages résidents. Par contre, la majorité des PUF atteint les alvéoles. A ce niveau, leur prise en charge par les macrophages peut être insuffisante, ce qui prolonge leur élimination et leur résidence dans les alvéoles, et génère un stress oxydatif et une inflammation. De plus, leur présence en très grand nombre dans les alvéoles leur permet aussi de passer dans la circulation. D'après [78].

Au niveau des alvéoles, la clairance macrophagique est un processus généralement long [66,68]. Les particules insolubles peuvent donc rester dans les alvéoles des semaines voire des mois [66]. Par ailleurs, une « redistribution » des particules peut arriver suite à une mort cellulaire ou exocytose des macrophages. Les particules relarguées sont par conséquent pris en charge par d'autres macrophages et persistent donc dans les alvéoles [68].

Plusieurs études montrent que les PUF pourraient être plus toxiques que les particules ayant une taille plus grande parce qu'elles peuvent arriver jusqu'aux régions les plus profondes du système respiratoire [76,77,79,80]. Du fait de leur petite taille et plus grand nombre, les PUF ne peuvent pas être phagocytées efficacement par les macrophages [77,79]. Leur interaction prolongée avec les cellules épithéliales et les macrophages pourraient générer un stress oxydatif et une inflammation dans les poumons [78]. Il est connu que la surcharge en particules peut réduire la motilité des macrophages et leur capacité à phagocyter d'autres molécules. De plus, les ERO générés détruisent le surfactant, ce qui prolonge encore le temps de résidence des PUF dans les poumons [68]. En outre, du fait de leur taux d'élimination faible et leur rétention prolongée dans les poumons, les PUF

pourraient également traverser les cellules épithéliales et passer dans la circulation ; ce qui leur permettrait d'être déposées dans d'autres organes et tissus et, par conséquent, d'avoir des effets néfastes sur la santé [78] (Figure 11).

4. Etudes épidémiologique de l'effet des PM sur la santé

Les études épidémiologiques jouent un rôle essentiel dans l'évaluation des risques de l'exposition à un air de mauvaise qualité. Un nombre important d'études épidémiologiques a permis de comprendre le lien entre la pollution de l'air et ses différents effets néfastes sur la santé, ce qui a permis aux autorités de mettre en place des directives visant à améliorer la qualité de l'air. Dans le but d'évaluer les risques, ces études permettent d'abord de déterminer les populations à risque, de savoir l'état de santé de base de ces populations et d'établir le lien entre le changement de la qualité de l'air et les conséquences sanitaires (mortalité et morbidité, etc.) observées suite à une exposition à des pics de pollution ou après exposition à long terme à des polluants dangereux pour la santé [81,82].

a. Mortalité

La pollution de l'air est un tueur invisible. Selon l'OMS, 91% de la population mondiale vit dans des endroits où l'air est de mauvaise qualité et ne respecte pas les limites fixées par l'OMS. L'exposition aux polluants atmosphériques survient principalement dans les zones industrielles et urbaines en raison de la présence de différentes sources d'émission [83]. De nombreuses études épidémiologiques ont mis en évidence le lien entre l'exposition aux PM (à court et à long terme) et une augmentation de la mortalité. Les PM_{2,5} sont parmi les polluants les plus surveillés et étudiés (Figure 12), mais en raison de la difficulté de tracer l'exposition aux PUF, les effets de ces particules de très petite taille sur la santé sont peu étudiés [84].

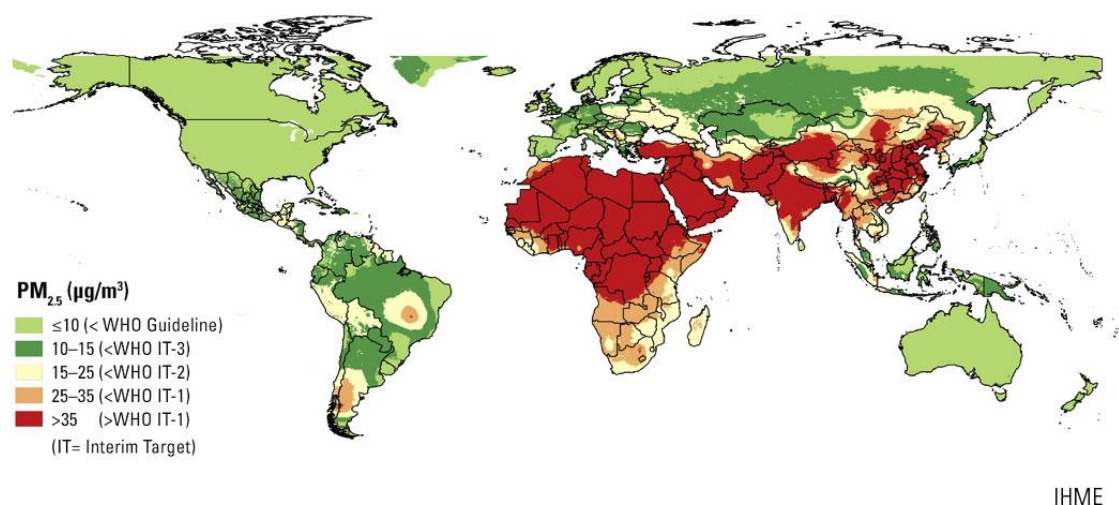


Figure 12 : Carte du monde comparant les concentrations en PM_{2,5} en 2017 aux recommandations de l’OMS [85].

L'exposition chronique aux polluants atmosphériques urbains favorise notamment le développement de cancers du poumon et de maladies cardiovasculaires et respiratoires, entraînant une mortalité prématurée [86–89]. Dans les pays de l’Union Européenne, il a été montré que les PM_{2,5} ont diminué l’espérance de vie de 8,6 mois [90]. Par conséquent, la pollution de l’air est devenue une cause environnementale majeur de décès prématuré [29]. Plusieurs études ont mis en évidence que les PM_{2,5} augmentent le nombre de décès prématurés qui sont dues à des causes respiratoires et/ou cardiovasculaires [91–93]. D’après l’OMS, 7 millions de personnes meurent chaque année de l’exposition aux PM_{2,5} mais d’après une étude très récente publiée par Lelieveld et ses collaborateurs, la pollution de l’air causerait 8.8 millions décès en excès dans le monde [29,94].

En France, la première étude nationale de l’effet de la pollution sur la mortalité, a estimé que les PM₁₀ sont à l’origine de 32 000 de décès prématurés par an [95]. Ensuite, une autre étude a montré que 42 000 de décès prématurés étaient liés à des expositions à des PM_{2,5} d’origine anthropogénique [96]. En 2010, il a été estimé que 16 900 décès prématurés pouvaient être évités si les concentrations en PM_{2,5} dans l’air ne dépassaient pas les limites recommandées par l’OMS (10 µg/m³) [83]. Et finalement, une étude réalisée par Santé Publique France en 2016 montre que 48 000 décès par an en France sont liés à la pollution de l’air par les PM_{2,5} [97].

En outre, il existe moins de données épidémiologiques sur l'effet des PUF parce qu'elles ne sont pas prises en compte par les directives visant à améliorer la qualité de l'air ; ce qui fait qu'elles ne sont pas mesurées et tracées de la même manière que les PM_{2,5}. Cependant, en raison de leur abondance et de leur petite taille, les PUF présentent une réactivité de surface plus importante que celle des particules de plus grande taille et, par conséquent, elles peuvent avoir des effets néfastes sur la santé [98]. A l'heure actuelle, quelques études ont établi des liens entre l'exposition aux PUF et la mortalité. Lazinger et Ostro et leurs collaborateurs montrent chacun une association positive entre l'exposition aux PUF et la mortalité due à des maladies respiratoires et à des ischémies cardiaques, respectivement [84,93].

b. Morbidité

De nombreuses études épidémiologiques établissent le lien entre l'exposition aux PM et le développement et l'exacerbation de différentes maladies qui menacent la vie. Même à des concentrations relativement faibles dans l'atmosphère, les PM entraînent des effets négatifs sur la santé, avec une augmentation des admissions à l'hôpital, une exacerbation des maladies respiratoires et cardiovasculaires ainsi que d'autres effets sur la santé [99]. Cependant, cet impact sanitaire est difficile à quantifier parce que l'état de santé de populations exposées et la composition des PM diffèrent d'un endroit à un autre [100].

Une association positive entre l'exposition aux PM_{2,5} et la morbidité respiratoire a été mise en évidence par plusieurs études épidémiologiques [101]. En effet, il a été montré que la prévalence des maladies respiratoires croît de 2,07 % lorsque les concentrations quotidiennes en PM_{2,5} augmentent de 10 µg/m³ [102]. Ainsi, des concentrations élevées en PM_{2,5} sont associées à des symptômes de maladies respiratoires comme une diminution de la fonction respiratoire, surtout chez les femmes enceintes, les personnes âgées, les enfants et les patients déjà atteints de maladies respiratoires (asthme, BPCO) ou cardiovasculaires [102–105]. Le développement d'un asthme et d'une inflammation pulmonaire sont aussi parmi les conséquences d'une exposition aux PM_{2,5}. De plus, des études épidémiologiques réalisées sur plusieurs cohortes aux Etats Unis et en Europe montrent que les PM_{2,5} sont responsables d'une augmentation significative du nombre de cas de cancer du poumon [106,107].

[108,109]. Pour l'ensemble de ces raisons, l'étude de l'effet des PM sur la santé respiratoire est un sujet de préoccupation mondial.

La pollution atmosphérique particulaire est également un facteur de risque important de morbidité cardiovasculaire [110,111]. Un lien étroit a été établi entre l'exposition aux PM_{2,5} et l'augmentation des maladies cardiovasculaires telles que l'athérosclérose [112], l'hypertension [113], l'infarctus de myocarde [110,114], les accidents vasculaires cérébraux [115] et l'arythmie cardiaque [116]. De nombreuses études ont montré que, même une exposition de courte durée (quelques heures à quelques semaines), peut induire des événements liés au risque de maladies cardiovasculaires surtout chez les personnes âgées et les patients déjà atteints par ces maladies [117]. Plusieurs mécanismes expliquent le lien entre les maladies cardiovasculaires et l'exposition aux PM. Ces mécanismes peuvent être soit directe, à travers la translocation des particules (surtout les PUF) dans le sang, soit indirecte suite à l'induction d'un stress oxydatif et d'une inflammation systémique aboutissant à des lésions cardiovasculaires [118].

D'autres études ont suggéré qu'une exposition à des concentrations élevées de PM pouvait entraîner des conséquences sanitaires diverses comme un poids faible à la naissance chez les nourrissons, des accouchements prématurés ou même la mort de fœtus [119]. De plus, une forte corrélation a été établie entre l'exposition aux PM_{2,5} et le diabète chez l'adulte, surtout chez les femmes obèses ou des patients atteints de maladies cardiaques [120,121]. Une étude récente montre aussi une forte association entre l'exposition à long terme à ces PM et un risque accru d'atteinte de démence, de la maladie d'Alzheimer, de la maladie de Parkinson et de l'autisme [122].

Le potentiel toxique des PUF est sous-estimé. Bien que ces particules ne soient pas tant étudiées et tracées que les particules plus grosses, plusieurs études ont estimé qu'elles représentent un risque sanitaire plus important [19,84,123]. Ces études suggèrent une corrélation entre l'exposition aux PUF et une augmentation des risques de maladies respiratoires et cardiovasculaires; mais à ce jour ces études sont controversées [124–129]. La faiblesse ou parfois l'absence de lien entre les PUF et la morbidité respiratoire ou cardiovasculaire ne signifie pas que les PUF ne sont pas toxiques, mais reflète plutôt le fait qu'il n'existe pas encore de techniques standardisées de mesures de PUF d'un endroit à un autre [123,129].

5. Mécanismes d'action toxiques des PM_{2,5} et des PM_{0,1}

a. Différents modèles utilisés pour étudier la toxicité des particules

(i) Etudes humaines en milieu contrôlé

Les expositions humaines contrôlées sont utilisées pour justifier l'association entre l'exposition aux particules et les impacts sanitaires observés dans les études épidémiologiques. Dans ce type d'études, des sujets sont placés dans une chambre où ils sont exposés d'une manière contrôlée aux particules. Au fil des ans, les études d'exposition humaine contrôlées ont permis, d'une part, de mieux comprendre l'impact des particules sur la santé, en particulier l'effet spécifique des différents constituants des particules, et, d'autre part, d'identifier certains mécanismes de toxicité. De plus, ce genre d'étude permet de cibler des populations spécifiques, par exemple de choisir un groupe de personne du même âge, sexe, ou atteints de la même maladie (asthme, BPCO, ou maladie cardiovasculaire), dans des conditions idéales pour effectuer des évaluations physiologiques. Cependant, ces études, où un nombre restreint de sujets est exposé à des particules pendant de courtes durées (quelques heures), sont limitées pour des raisons éthiques et ne reflètent pas des expositions sur le long terme à l'échelle d'une vie. Par conséquent, les effets biologiques observés peuvent être faibles avec un bruit de fond et une variabilité importante [130].

Des techniques bien caractérisées sont utilisées pour mener les protocoles d'exposition ; soit les sujets sont exposés directement par le nez et/ou la bouche à l'aide d'un masque, soit ils sont placés dans une chambre d'exposition pour une exposition du corps entier [130,131]. En outre, les critères d'évaluation des effets induits suite à l'exposition des sujets sélectionnés sont limités à des échantillons facilement accessibles, par exemple des prélèvements de sang, une mesure de la fonction pulmonaire, un bilan cardiaque, un lavage broncho-alvéolaire (LBA), et parfois une biopsie [130,132]. A ce jour, plusieurs études en milieu contrôlé chez l'homme ont permis de mettre en évidence les effets néfastes sur la santé de l'exposition aux PM. Un stress oxydant et une inflammation caractérisée par une infiltration de neutrophiles dans les voies respiratoires ont été observés chez des individus sains exposés pendant 2 heures à 200 µg/m³ de PM₁₀ [133]. Une autre étude montre une hypométhylation de l'ADN dans le sang d'individus exposés pendant 130 minutes à des PM₁₀

ou des PM_{2,5} [134]. D'autres études observent également des modifications au niveau du système cardiovasculaire chez des sujets sains ou des patients atteints de syndromes métaboliques exposés respectivement à des concentrations élevées de particules fines ou ultrafines ambiantes [135,136]. Cependant, les résultats obtenus par ces études peuvent parfois être difficiles à extrapoler à ceux qui sont obtenus dans les études épidémiologiques [137].

(ii) Modèles in vivo

Les animaux ont été utilisés depuis longtemps pour prédire la toxicité de nombreuses substances chimiques qui se trouvent dans l'environnement et qui constituent un danger pour la santé de l'homme. Les expositions humaines contrôlées et les expositions *in vitro* présentent des limites parce qu'elles sont principalement à court terme [138]. Par conséquent, l'expérimentation animale est importante pour l'évaluation du risque de l'exposition aux PM sur le développement de pathologies chroniques liées à des expositions prolongées à ces polluants. Elle fournit une vue globale de la façon dont une substance interagit avec un organisme complet [139].

Afin d'être capable d'extrapoler les résultats obtenus à l'homme, il est nécessaire de choisir un modèle animal approprié et une dose de PM adéquate en tenant compte des différences génétiques et anatomiques entre l'homme et les animaux. Les deux modèles animaux les plus couramment utilisés dans les études toxicologiques des PM sont les souris et les rats. Dans la suite de ce chapitre consacré aux modèles *in vivo*, je ne décrirais que les données concernant les modèles murins. Ces animaux présentent de nombreux avantages : ils sont petits, faciles à manipuler et possèdent un génome « similaire » à celui de l'homme [138]. Cependant, bien qu'elles soient largement utilisées dans les études de la toxicité des PM sur le système respiratoire, elles présentent parfois quelques limites. En effet, il existe des différences entre leur système respiratoire et celui de l'homme. Les souris n'ont pas de bronchioles ce qui pourrait modifier les mécanismes de dépôt et de clairance des PM. Par conséquent, l'effet de ces polluants ou de quelques composants de PM pourrait être différent de ce qui est observé chez l'homme [138,140].

Plusieurs espèces de souris sont utilisées dans les études toxicologiques des PM. Le choix de l'espèce dépend de la problématique et de l'objectif de l'étude. Par exemple, il existe

des espèces plus sensibles que d'autre à l'induction chimique de cancer pulmonaire. Les souris A/J font partie des souches les plus sensibles, tandis que d'autres souches comme les O20 et les BALB/c ont une sensibilité intermédiaire et d'autres encore comme les C57BL/6 et les DBA ont une résistance presque complète [141]. Des modèles de souris transgéniques sont également utilisés ; ils sont considérés comme outils puissants pour mieux comprendre la régulation et la fonction de gènes impliquées dans le développement de pathologies. Ces modèles de souris sont utilisés dans le domaine de la toxicologie afin d'élucider, par exemple, le potentiel mutagène et cancérigène et de caractériser les mécanismes d'actions de toxicité de substances qui constituent un risque potentiel sur la santé [142].

La technique d'administration des PM dans les poumons peut avoir des effets significatifs sur leur dépôt dans les voies respiratoires, leur clairance, et leur toxicité. Les techniques disponibles sont : l'inhalation par exposition du corps entier dans des chambres d'exposition, l'inhalation par exposition du nez seulement, l'instillation intratrachéale et l'instillation intranasale. Chacune de ces techniques présente des points forts et des points faibles. L'inhalation des PM dans une chambre d'exposition constitue la technique la plus proche de la réalité mais elle nécessite des quantités importantes de PM ce qui peut être contraignant pour la réalisation de ce type d'études sur le long terme (de plus, il est difficile de contrôler dans ce cas les doses réellement absorbées) [40]. L'exposition directe du nez par inhalation nécessite moins de PM, mais la manipulation accrue des animaux peut générer un stress et influencer les résultats obtenus. Concernant l'exposition par voie intratrachéale, elle permet d'administrer les PM directement dans les poumons mais cette technique est invasive puisqu'elle nécessite l'insertion d'un cathéter dans la trachée [40,143,144]. L'exposition par voie intranasale est plus simple à réaliser et elle est considérée comme une voie d'administration de PM plus pertinente sur le plan toxicologique que l'exposition par voie intratrachéale parce que les particules administrées traversent le tractus respiratoire dans son ensemble, depuis le nez jusqu'aux poumons. Pour ces raisons, elle est de plus en plus utilisée pour ce type d'études [144–147].

Les études *in vivo* fournissent la possibilité d'étudier de nombreux mécanismes d'action toxique dans l'organisme entier. Elles permettent en particulier d'étudier la toxicité des PM dans et au-delà du système respiratoire sachant que les particules les plus fines peuvent passer dans la circulation et atteindre d'autres organes [62]. Une extrapolation des

résultats obtenus à l'homme pourrait permettre une meilleure compréhension des mécanismes biologiques à l'origine de cette toxicité afin d'améliorer l'évaluation des risques des PM sur la santé humaine [138].

(iii) Modèles in vitro

Les modèles *in vivo* permettent toujours d'améliorer la compréhension de la toxicité des PM parce qu'ils prennent en compte les interactions entre les différents types de cellules présentes dans les poumons. Les réponses complexes dans les organes des animaux exposés sont bien documentées mais les mécanismes d'action spécifiques de chacun de ces types cellulaires sont difficiles à clarifier dans ces modèles d'étude. Pour cela, des modèles *in vitro* sont utilisés comme des outils principaux pour étudier les mécanismes cellulaires impliqués dans la toxicité des particules. Il existe plusieurs approches pour élucider ces mécanismes sur des cellules qui ont été sélectionnées comme étant des cibles des PM. Les principales stratégies utilisées sont : les cultures monocellulaires, les co-cultures de plusieurs types cellulaires, et l'exposition en interface air-liquide [62,148,149].

Le choix du type cellulaire et de la stratégie repose sur le mécanisme recherché. L'interaction des particules avec les différents types cellulaires présents dans les poumons peut avoir des implications dans la pathogenèse de maladies respiratoires ou du cancer pulmonaire. La compréhension des mécanismes de toxicité des PM aboutissant au développement ou à l'exacerbation de ces maladies nécessite l'utilisation de modèles cellulaires appropriés [62]. La lignée immortalisée BEAS-2B (cellules épithéliales bronchiques) et la lignée cancéreuse A549 (cellules d'adénocarcinome alvéolaires) sont utilisées pour élucider de nombreux mécanismes comme le stress oxydant, l'inflammation ou la génotoxicité des PM. Cependant, l'utilisation de lignées cancéreuses représente des limites pour l'étude de mécanismes comme l'apoptose et la prolifération cellulaire parce qu'elles sont issues d'une tumeur et, par conséquent, conservent des caractéristiques tumorales [148,150]. Les cultures de cellules immunitaires comme les macrophages sont utilisées pour étudier la phagocytose et les autres mécanismes de prise en charge des PM. Enfin, du fait que les particules les plus fines peuvent passer dans la circulation, les cellules endothéliales sont aussi utilisées [148].

Dans le but de travailler avec des modèles cellulaires plus proches phénotypiquement des cellules présentes dans les tissus, des cultures de cellules primaires prélevées directement chez des sujets sains ou chez des patients ont été développées. Par exemple, les cellules isolées de patients atteints de BPCO ou d'asthme où plusieurs caractéristiques observées *in vivo* sont sauvegardées *in vitro*, notamment une altération de l'expression des cytokines et de la réponse immunitaire, et une sensibilité accrue au stress oxydant [151]. La culture de cellules épithéliales bronchiques primaires en interface air-liquide mime les conditions dans lesquels se trouvent à l'état naturel ces cellules. L'utilisation de ce modèle de culture permet de mieux comprendre la réponse des cellules face à l'exposition aux particules et permet de reconstituer un épithélium différencié en 3D avec des cellules ciliées, des cellules caliciformes et des cellules basales [152]. Enfin, l'utilisation de cocultures permet d'évaluer l'interaction entre différents types cellulaires (par exemple, cellules épithéliales/macrophages ou cellules épithéliales/fibroblastes) et mimer aussi les conditions *in vivo* [153].

Concernant les méthodes d'exposition, les PM ou des composants des PM peuvent être soit suspendus dans le milieu de culture ou dans une solution saline [154], soit dispersées à l'aide d'un générateur d'aérosols dans une chambre d'exposition pour les cellules cultivées en interface air-liquide [155]. L'exposition des cellules à un aérosol de particules nécessite des quantités importantes de particules ce qui est parfois contraignant lorsque les particules sont d'origine environnementale. Ces dernières années, de nouvelles technologies permettent d'une part d'utiliser moins de particules pour générer un aérosol et d'autre part de contrôler la concentration de ces particules et leur mode de déposition sur les cellules en culture [156,157].

b. Effet des PM_{2,5} et des PM_{0,1} sur l'inflammation

(i) Inflammation pulmonaire

L'inflammation est une réponse immunitaire non-spécifique du corps contre une substance exogène. La réponse inflammatoire est complexe et implique une variété de mécanismes de défense. Son objectif principal est de détecter et éliminer les facteurs qui interfèrent avec l'homéostasie au niveau d'un tissu. Dans les poumons, l'inflammation est souvent causée par l'exposition à des agents extérieurs présents dans l'environnement comme les microbes, les allergènes, les toxines, les PM, etc. Durant l'inflammation, de

nombreuses cellules sont activées. Elles libèrent des cytokines et des médiateurs inflammatoires qui recrutent d'autres cellules inflammatoires et agissent sur leur activité [158].

Au cours d'une inflammation aiguë, les macrophages alvéolaires résidents jouent un rôle de sentinelles et fournissent une réponse rapide contre les agents pathogènes. Il s'en suit une infiltration de polynucléaires neutrophiles (PNN), les premières cellules qui s'accumulent dans le site inflammatoire. Ces cellules constituent la première ligne de défense du système immunitaire inné [159]. Elles migrent des capillaires pulmonaires vers les espaces aériens et éliminent les corps étrangers par phagocytose [158]. Au fur et à mesure du développement de l'inflammation, les PNN s'accumulent de plus en plus dans le tissu et finissent par mourir par apoptose. Ensuite, une autre vague de cellules s'infiltré dans le site inflammatoire : les monocytes. La différenciation des monocytes en macrophages (M1, pro-inflammatoires) favorise l'élimination par phagocytose des débris cellulaires et des PNN apoptotiques [160]. Les macrophages qui ont terminé leur tâche sont éliminés aussi du site inflammatoire : soit ils passent dans les vaisseaux lymphatiques, soit ils meurent par apoptose pour être éliminés par la suite par d'autres macrophages (M2, anti-inflammatoires) par un phénomène appelé efferocytose [161]. Ces mécanismes assurent une résolution de l'inflammation (Figure 13). Une dérégulation de ces mécanismes devient nocive pour le tissu et peut aboutir à des maladies inflammatoires chroniques [161].

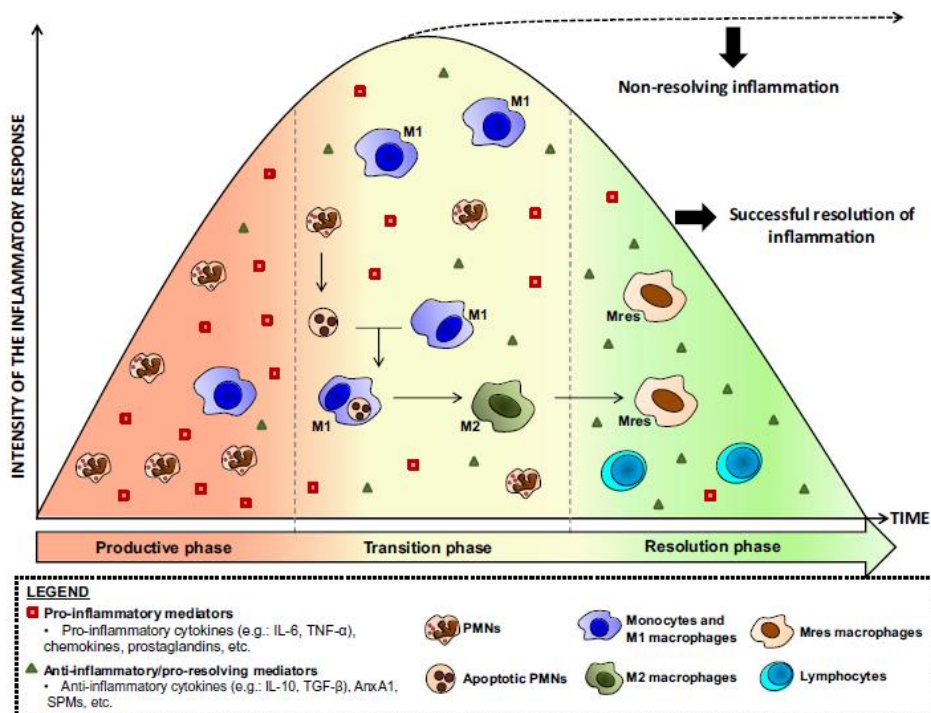


Figure 13 : La résolution de l'inflammation. La première phase de l'inflammation est caractérisée par une infiltration importante en PNN dans le site inflammatoire, ainsi que par une production importante de médiateurs pro-inflammatoires par les différents types cellulaires présents. Lors de la résolution de la réaction inflammatoire, la génération de médiateurs pro-inflammatoires diminue mais celle des médiateurs anti-inflammatoires augmente ; la migration de PNN diminue et l'arrivée de macrophages et de monocytes augmente. De plus, les PNN présents dans le site inflammatoire meurent par apoptose et sont éliminés par les macrophages par efferocytose. Au cours de ce processus, les macrophages pro-inflammatoires (M1) modifient leur phénotype en macrophages anti-inflammatoires (M2) puis en macrophages de phénotype pro-résolutif (Mres) leur permettant de produire des médiateurs anti-inflammatoires pour résoudre l'inflammation et recruter les lymphocytes. Ces phénomènes ensemble conduisent à une résolution de l'inflammation aiguë; cependant, un échec de ce processus peut amener à une inflammation chronique [162].

Plusieurs études épidémiologiques ont montré que les PM peuvent avoir différents effets néfastes sur la santé selon leur source ou leur type, ce qui suggère que les réponses immunitaires contre les PM peuvent être différentes en fonction du type ou de la source des particules inhalées. En effet, certaines études montrent que les PM induisent une inflammation aiguë ou chronique dans les poumons. Ces études ont mis en évidence qu'une exposition à de fortes concentrations de PM atmosphériques entraîne le développement d'une inflammation aiguë [163,164]. D'autre part, une exposition prolongée à ces polluants est corrélée à une inflammation chronique au niveau pulmonaire aboutissant à des maladies inflammatoires chroniques comme la BPCO [164]. Ces réponses immunitaires innées sont caractérisées par une activation de NF- κ B et AP-1 (Activator protein-1) et une production des cytokines pro-inflammatoires *Il-1b*, *il-6* et *TNF-a* (Figure 14)[165]. Comme décrit ci-dessus, les macrophages alvéolaires jouent un rôle important dans la réponse immunitaire innée contre

les PM. De plus, ce sont des cellules présentatrices d'antigènes qui activent les réponses immunitaires adaptatives après avoir endocyté les PM [165]. Les effets des PM sur la réponse inflammatoire sont différents d'un individu à un autre ; par exemple, les personnes âgées, les enfants et les patients atteints de maladies respiratoires ou cardiovasculaires présentent une sensibilité plus importante que les patients sains [166].

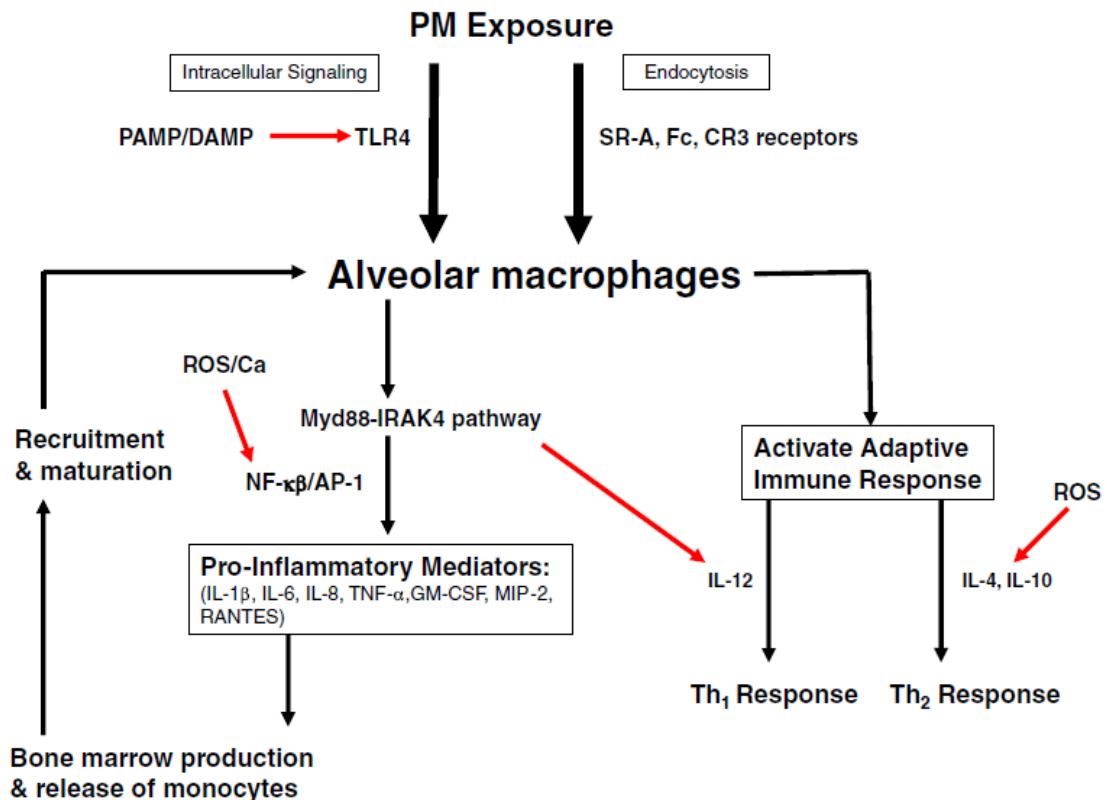


Figure 14 : Diagramme récapitulatif des réponses immunitaires des macrophages alvéolaires induites par l'exposition aux PM. Les PM interagissent avec les macrophages alvéolaires soit par activation des voies de signalisation intracellulaires, soit par endocytose des PM via les voies opsonine ou non opsonine dépendantes. La stimulation de la voie TLR4-Myd88-IRAK4 entraîne l'activation de NF-κB/AP-1 qui est ensuite activée et maintenue par les ERO intracellulaires. L'activation de la voie Myd88 favorise la maturation des cellules présentatrices d'antigène, y compris la production d'IL-12 (un facteur puissant de la polarisation Th1). En parallèle, le stress oxydatif généré dans les macrophages entraîne une augmentation des cytokines de la polarisation Th2 comme IL-4 et IL-10. L'activation de la voie Myd88 est associée aussi à la production de cytokine qui favorise la production de monocytes par la moelle osseuse. Ces monocytes seront recrutés dans les poumons où ils se différencient en macrophages alvéolaires. Les flèches rouges indiquent une stimulation [165].

(ii) Inflammation systémique

Le poumon est en contact direct avec les polluants atmosphériques. Les effets néfastes de l'exposition aux PM observés au niveau pulmonaire entraînent une inflammation systémique et un stress oxydatif aboutissant à une augmentation de la mortalité [165]. Ces effets montrent que les PM déposés au niveau des voies respiratoires ont des effets au-delà des poumons. De nombreuses hypothèses ont été émises pour expliquer les mécanismes par

lesquels les PM peuvent avoir des effets sur le système cardiovasculaire : (1) Les PM déposées dans les poumons passent dans la circulation sanguine à travers les vaisseaux sanguins ou indirectement à travers la circulation lymphatique. Ce mécanisme a été mis en évidence pour les particules ultrafines [167,168] ; (2) les PM déposées dans les voies aériennes se dissolvent partiellement ou totalement et libèrent des composés chimiques nocifs (e.g. métaux, composés organiques, etc.) qui passent par la suite dans la circulation [169] ; (3) les macrophages ou les autres phagocytes ayant phagocyté des PM induisent une inflammation et migrent dans la circulation, transportant les PM avec eux [170] ; (4) les médiateurs inflammatoires libérés lors de l'inflammation induite dans les espaces alvéolaires suite à l'exposition aux PM passent dans la circulation sanguine où ils entraînent une inflammation systémique [112].

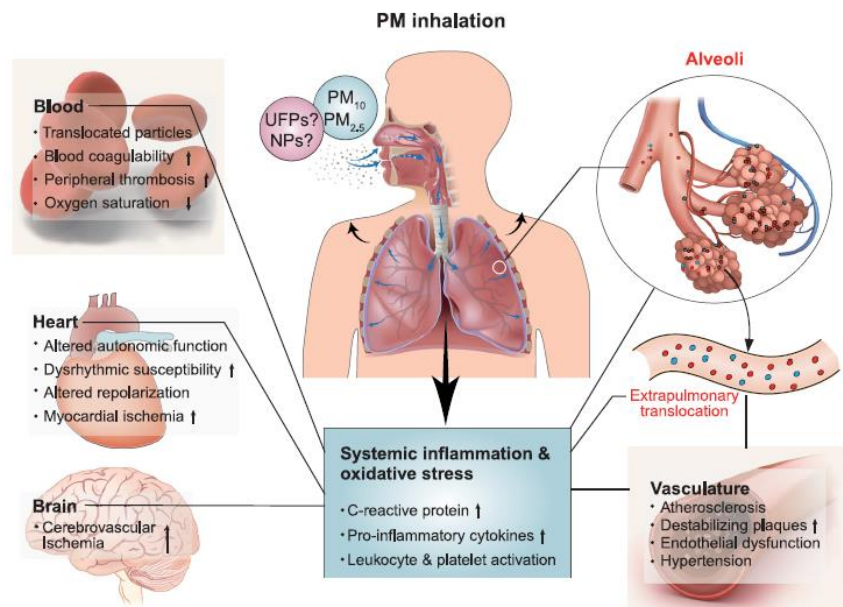


Figure 15 : Voies toxicologiques reliant l'exposition aux PM et les accidents vasculaires cardiaques ou cérébraux. La première ligne de défense contre les PM est le poumon, où les particules peuvent induire ou exacerber des maladies pulmonaires. Les PUF pourraient passer dans la circulation sanguine et provoquer une inflammation systémique et un stress oxydatif ayant un impact négatif sur le sang, les vaisseaux sanguins, la fonction cardiaque et le cerveau [78].

De nombreuses expériences ont mis en évidence des effets des PM sur le système cardiovasculaire. Sun et ses collaborateurs ont montré dans une étude *in vivo* qu'une exposition à long terme à de faibles concentrations de PM_{2.5} induisait une inflammation systémique et favorisait l'athérosclérose [171]. Il a été montré aussi que la toxicité des PM_{2.5} au niveau vasculaire dépendait de leur source d'émission (la combustion de biomasse et le

trafic routier) [172]. Par ailleurs, une exposition chronique aux $PM_{0,1}$ a été associée à divers effets néfastes sur la santé. Il a été montré par exemple que les $PM_{0,1}$ favorisaient la formation de plaques d'athérosclérose chez la souris suite à la production de médiateurs inflammatoires dans le sang [173] (Figure 15).

c. Effet des $PM_{2,5}$ et des $PM_{0,1}$ sur le stress oxydant

Le stress oxydant joue un rôle important dans la toxicité des PM. Il est impliqué dans la pathogenèse de nombreuses maladies, notamment les maladies cardiovasculaires, respiratoires et le cancer. Il est défini de manière générale en tant qu'un déséquilibre de la balance oxydant/anti-oxydant en faveur des oxydants, ce qui peut entraîner des dommages au niveau des biomolécules. Le stress oxydant induit par les PM peut provenir de plusieurs sources : (i) la génération directe d'ERO à partir de la surface des particules ; (ii) les substances solubles comme les métaux et les composés organiques ; (iii) l'altération de la fonction mitochondriale ou de la NADPH-oxydase dans les cellules exposées; et (iv) l'activation des cellules inflammatoires capables de générer des ERO ou des espèces réactives de l'azote (ERN) (Figure 16) [174].

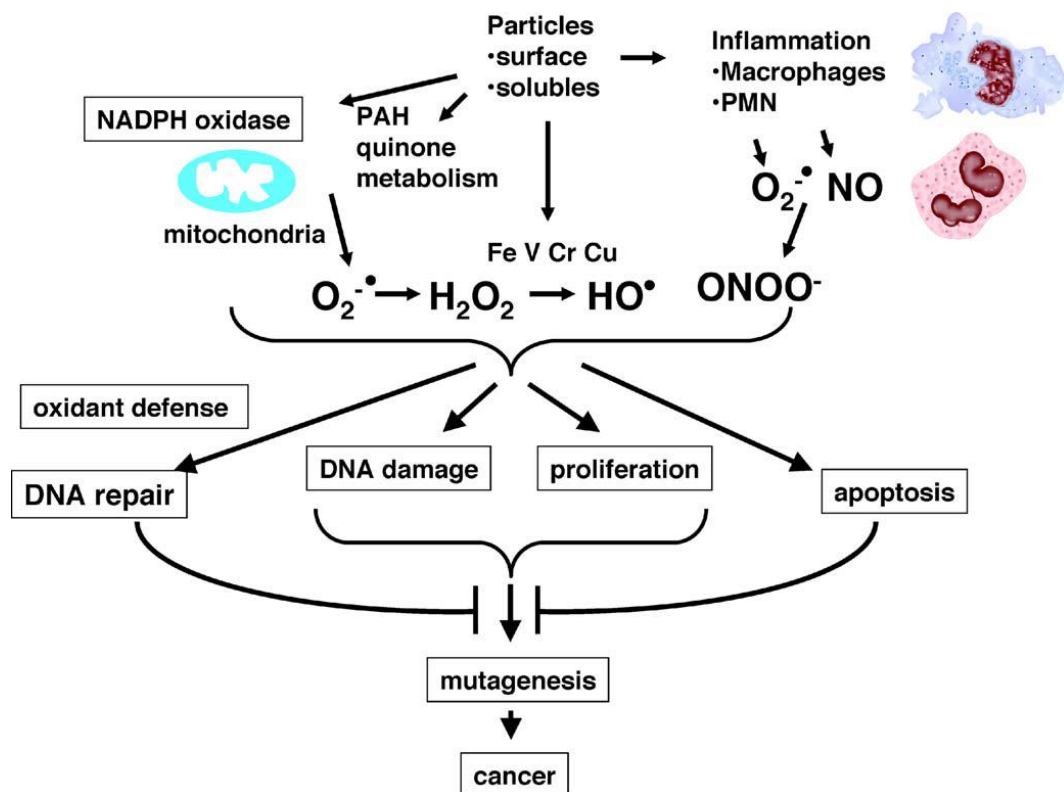


Figure 16 : les mécanismes d'induction d'un stress oxydant et des dommages de l'ADN causés par les PM et leurs rôles dans la cancérogénèse [174].

Plusieurs études ont montré que le fer et d'autres métaux de transition comme le cuivre, le chrome et le vanadium présents dans ou à la surface des PM peuvent générer des ERO et un stress oxydant dans les organes exposés. Par exemple, différentes études suggèrent que les particules de diesel contiennent des groupes fonctionnels à leur surface pouvant réagir avec du fer, ce qui entraîne une accumulation de fer dans ces particules [175,176]. Ces conditions sont favorables pour induire un stress oxydant dans les cellules puisque ces particules peuvent générer des anions superoxydes toxiques et instables entraînant la formation de peroxyde d'hydrogène et des radicaux hydroxyles [174].

D'autre part, les HAP et les autres molécules organiques présentes à la surface des PM peuvent également induire un stress oxydant. Selon une étude publiée par Li et ses collaborateurs, les PM génèrent des ERO d'une manière proportionnelle à leur teneur en HAP [80]. Les HAP sont en général lipophiles et peuvent facilement traverser la membrane cellulaire par diffusion passive après inhalation. Comme déjà dit auparavant, certains HAP sont considérés comme pro-cancérogènes parce qu'ils induisent des dommages à l'ADN d'une manière indirecte via la production de métabolites cancérogènes. Les HAP sont généralement métabolisés par les CYP450 et autres enzymes en phénols, catéchols et quinones. Le cycle redox des quinones peut entraîner la formation d'ERO capables de réagir avec l'ADN et former des adduits comme 8-OHdG (8-hydroxy-2'-deoxyguanosine) potentiellement à l'origine de processus de cancérogenèse [47].

Les mitochondries constituent la source et la cible principale d'ERO générés dans les cellules dans des conditions normales. Il a été démontré que les ERO entraînent une augmentation du nombre de mitochondries dans les cellules dans le but de réduire les dommages et compenser la demande respiratoire accrue requise pour la clairance des ERO. Un nombre plus important de mitochondries aboutit en même temps à une augmentation de la génération d'ERO entraînant un stress oxydant supplémentaire aux mitochondries et d'autres molécules présentes dans les cellules notamment l'ADN, l'ARN, les protéines et les lipides. Le dysfonctionnement des mitochondries est donc un des mécanismes qui pourraient expliquer les effets négatifs des PM sur la santé [177]. En effet, il a été montré en particulier que les mitochondries sont une cible directe de PUF. La petite taille des PUF leur permet de se loger dans les mitochondries des cellules cibles telles que les macrophages et les cellules épithéliales. Cela entraîne une perturbation de l'intégrité mitochondriale et une disparition

des crêtes. Ces changements sont accompagnés d'une perte de potentiel membranaire des mitochondries, une diminution de la masse mitochondriale, une production d'ERO et une mort cellulaire. Au contraire, les PF et les particules grossières ne peuvent pas avoir un accès direct aux mitochondries mais ils agissent sur la fonction mitochondriale indirectement via la génération d'ERO. La taille et la réactivité des particules influencent donc leur potentiel toxique [178].

La relation d'interdépendance entre l'inflammation et le stress oxydant a été confirmée dans plusieurs études [179,180]. Au cours de l'inflammation, les cellules phagocytaires activées, telles que les neutrophiles et les macrophages, produisent de grandes quantités d'ERO et d'ERN, telles que l'anion superoxyde, le peroxyde d'hydrogène, l'oxyde nitrique, etc. afin d'éliminer les substances exogènes, notamment les PM. Dans le cas de maladies inflammatoires, la génération d'espèces réactives est plus importante et certaines de ces espèces réactives diffusent à l'extérieur des cellules phagocytaires, ce qui entraîne un stress oxydant localisé et des lésions tissulaires. D'autre part, les autres cellules non-phagocytaires présentes dans le lieu de l'inflammation peuvent aussi produire des espèces réactives en réponse aux cytokines pro-inflammatoires [181]. Il a été démontré par exemple que l'IL-6 favorise la production d'ERO en augmentant l'expression de la NADPH oxydase 4 (NOX4) dans le cancer du poumon non à petites cellules. Parallèlement, il a été mis en évidence aussi que NOX4 (médiateur du stress oxydant) augmente la libération d'IL-6 (médiateur inflammatoire) [182]. Ainsi, comme l'inflammation peut induire un stress oxydant, ce dernier peut également induire une inflammation via plusieurs voies.

d. Génotoxicité des PM_{2,5} et des PM_{0,1}

La génotoxicité est la capacité d'une substance à interagir avec l'ADN et et/ou la machinerie cellulaire responsable du maintien de l'intégrité du génome. Ces substances sont capables d'induire des dommages primaires de l'ADN, et des mutations géniques, chromosomiques ou génomiques qui peuvent avoir un rôle important dans l'induction d'un cancer. Des tests de génotoxicité ont été développés pour mesurer ces phénomènes en tant qu'outils prédictifs de maladies dues à l'exposition à ces substances [183].

Des lésions directes de l'ADN peuvent survenir suite à l'exposition à des substances génotoxiques, notamment les lésions ou la perte de bases et les cassures simple ou double

brin. Les effets génotoxiques peuvent également comprendre des lésions indirectes de l'ADN qui interagissent avec la machinerie cellulaire responsable du maintien de l'intégrité du génome, comme les enzymes de synthèse ou de réparation de l'ADN et l'appareil mitotique. Ces dommages primaires de l'ADN peuvent entraîner par la suite des mutations de l'ADN. Les principaux types de mutations géniques sont les substitutions de paires de bases et les additions ou délétions.

Les mutations chromosomiques sont représentées par des anomalies chromatidiennes, où une cassure survient au sein d'un seul chromatide, et des aberrations chromosomiques, où la cassure survient au même endroit des deux chromatides sœurs.

Enfin, les mutations génomiques sont des altérations quantitatives qui résultent d'une mauvaise répartition des chromosomes entre les cellules filles [183].

Afin de détecter la génotoxicité d'une substance, il existe des méthodes qui permettent de quantifier les effets génotoxiques survenus suite à l'exposition à cette substance. Le test de comètes est une méthode de détection de lésions primaires de l'ADN permettant de quantifier les cassures de l'ADN sur cellules isolées. De plus, cette méthode peut être réalisée *in vivo* et *in vitro* sur tout type cellulaire ou tissu. L'utilisation de ce test *in vivo* peut aider également à déterminer les organes cibles d'une substance génotoxique [184,185].

Concernant les tests de mutation génique, le test d'Ames est un test biologique largement utilisé qui sert à évaluer le potentiel mutagène de composés chimiques en utilisant des bactéries *Salmonella typhimurium* portant un gène muté qui inhibe l'expression d'un acide aminé essentiel. Ce test consiste à induire des mutations inverses dans le gène déjà muté [3]. Si la substance testée est mutagène, elle va permettre à la bactérie de synthétiser l'acide aminé essentiel et de se développer dans une colonie visible. Le comptage du nombre de ces colonies est une mesure directe de la mutagénicité de la substance d'essai. Il existe également des tests de mutation génique sur cellules mammifères où le potentiel mutagène d'un produit est testé par la mise en évidence de mutations induites dans un gène codant pour une enzyme impliquée dans la biosynthèse des acides nucléiques. L'exposition à un agent dit « sélectif » va permettre la croissance exclusive des cellules mutées, celles-ci étant «

résistantes » à son effet cytotoxique. L'effet mutagène d'un produit se traduit donc par la survie et la prolifération des cellules en milieu sélectif [184,185].

Concernant l'étude des mutations chromosomiques, le test d'analyse de métaphase ou test d'aberrations chromosomiques peut être utilisé *in vivo* et *in vitro* afin de rechercher des mutations chromosomiques de structure ou de nombre. Ce test fait partie de la batterie des tests réglementaires. Le test du micronoyau est également couramment utilisé pour étudier les mutations chromosomiques. Il consiste en la recherche de fragments chromosomiques acentriques ou de chromosomes entiers n'ayant pas migrés normalement lors de l'anaphase et n'étant donc pas retenus dans le noyau de la cellule fille [5]. Ils apparaissent alors dans le cytoplasme sous la forme d'un corps de Howell-Jolly ou micronoyau. Le test du micronoyau permet de détecter simultanément le retard mitotique, l'apoptose, les cassures chromosomiques, la perte d'un ou plusieurs chromosomes et la non-disjonction de chromosomes [6].

Les études sur la génotoxicité des PM sont en constante augmentation du fait que le lien entre l'exposition à ces polluants et le développement de certaines maladies comme le cancer est actuellement établi. L'effet génotoxique des PM dépend de plusieurs facteurs comme, par exemple, leur origine d'émission et leur taille. Karlsson et ses collaborateurs ont montré que la génotoxicité des PM émises dans le métro est huit fois plus importante que celle des PM issues du trafic routier car ces particules contiennent des quantités importantes de métaux et plus particulièrement du fer, un métal très réactif [186]. De plus, plusieurs études ont montré que la fraction organique (comme les HAP et les nitro-HAP) des PM était responsable des cassures d'ADN observées via l'induction d'un stress oxydant [187–189]. La taille et la dose des particules peuvent aussi influencer la toxicité des particules. Les PUF présentent un risque plus important en terme de génotoxicité parce que leur petit diamètre leur permet d'exercer leur toxicité dans les poumons et dans d'autres organes [190–192]. Corsini et ses collaborateurs (2017) montrent dans leur étude que les PUF émis par la combustion du bois sont génotoxiques surtout en hiver parce que la composition des particules est différente entre les saisons où des quantités plus importantes de HAP et de métaux sont observées [191]. Landkocz et ses collaborateurs (2017) montrent également dans leur étude que les PUF sont potentiellement plus génotoxiques que les particules de plus grande taille du fait de la présence de concentrations importantes de HAP dans ces particules [193].

e. Epigénétique

L'épigénétique désigne les mécanismes moléculaires qui modulent l'expression des gènes sans changement de la séquence d'ADN. L'ensemble des marques activatrices et inhibitrices de l'expression des gènes constitue l'épigénome d'une cellule, qui la différencie des autres cellules. Les cellules d'un organisme ont toutes le même génome mais elles ne sont pas identiques puisque chacune d'entre elles porte un épigénome qui lui est spécifique. Cela est à l'origine d'une expression différente des gènes entre les cellules. Au cours des dernières décennies, de nombreuses études ont révélé que l'apparition de modifications épigénétiques aberrantes était toujours associée à la survenue de nombreuses maladies, notamment le cancer, le diabète, la maladie d'Alzheimer et de nombreuses autres maladies liées au vieillissement.

Les mécanismes épigénétiques les plus étudiés sont la méthylation de l'ADN, les modifications d'histones et d'expression des miARN [194] (Figure 17). Ces mécanismes peuvent être influencés par des facteurs environnementaux et ils sont essentiels à la régulation de nombreux processus cellulaires, notamment l'expression des gènes et des miARN, la différenciation et la division cellulaire, et l'embryogenèse [195,196]. Certains de ces changements sont transitoires tandis que d'autres sont héréditaires. La majorité des études examine l'impact des facteurs environnementaux sur l'épigénome à court terme, alors que les effets à plus long terme sont beaucoup plus importants à étudier parce qu'ils constituent un risque réel pour les prochaines générations [195]. Les modifications épigénétiques peuvent être retrouvées à des stades précoces d'une maladie ou même avant que la maladie puisse être détectée par les moyens diagnostiques classiques. Par conséquent, une compréhension des changements épigénétiques induits par l'exposition au PM pourrait constituer un outil important qui permet d'identifier des biomarqueurs d'exposition afin d'éviter le développement ou la progression de maladies [197,198].

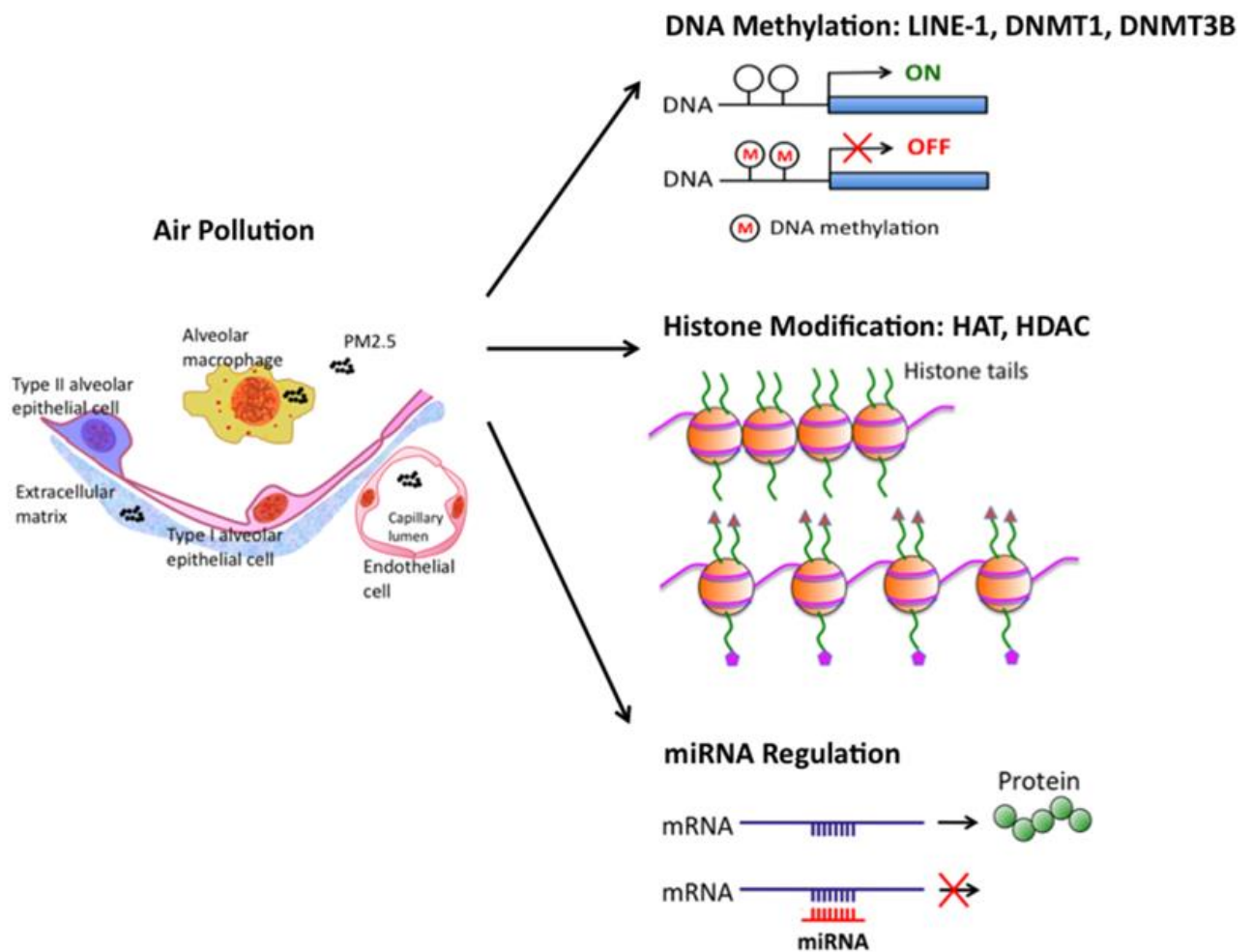


Figure 17 : Changements épigénétiques associés à l'exposition aux PM. La taille des PM_{2,5} leur permet de pénétrer dans les alvéoles. A ce niveau-là, Les particules sont pris en charge par les macrophages ou peuvent passer dans la circulation sanguine. Elles peuvent donc induire des modifications épigénétiques au niveau local mais également au niveau systémique. Elles peuvent par exemple altérer l'activité des enzymes DNMT, HAT et HDAC impliqués dans la méthylation de l'ADN et les modifications d'histones. L'exposition aux PM est aussi associée à des altérations au niveau de l'expression des microRNA (miRNA) [197].

(i) Effet des PM_{2,5} et des PM_{0,1} sur la méthylation de l'ADN

La modification épigénétique la plus étudiée est la méthylation de l'ADN. C'est une modification épigénétique héritable dans laquelle une cytosine est méthylée en position C-5 en 5-méthylcytosine par une réaction enzymatique impliquant l'ADN méthyltransférase. Chez les mammifères, elle est principalement limitée aux sites CpG (plus de 98% dans les cellules somatiques). Elle a été considérée comme un trait génétique héréditaire stable, mais des études récentes ont montré que c'est un processus dynamique où les marques de méthylation peuvent être synthétisées de novo, maintenues ou supprimés [195]. La méthylation de l'ADN dans les promoteurs, y compris les sites d'initiation de la transcription,

inhibe généralement l'expression du gène en aval. Elle peut également survenir dans les gènes mais contrairement à la méthylation du promoteur, elle est associée à une activation de la transcription. Il existe un équilibre entre les ADN méthyltransférases (DNMT) et déméthylases afin de maintenir le taux de méthylation global de l'ADN [199,200].

Le génome humain code pour trois DNMT (DNMT1, DNMT3A et DNMT3B) afin de catalyser la méthylation de l'ADN. La DNMT1 agit au niveau des séquences d'ADN dites hémiméthylées, où un des deux brins est déjà méthylé, afin de maintenir la méthylation après la réplication de l'ADN et la réparation des dommages. Les DNMT3A et DNMT3B jouent un rôle majeur dans la méthylation de novo de l'ADN et ne font pas la distinction entre les substrats d'ADN non méthylés et hémiméthylés [195]. La déméthylation de l'ADN est catalysée par des protéines de la famille TET (ten-eleven translocation) où le groupe méthyle du 5-mC est oxydé pour donner la 5 hydroxyméthyle cytosine (5-hmC), qui peut être encore oxydé en 5-formylcytosine et 5-carboxylcytosine. Ces dérivés de 5-mC sont de nouvelles marques épigénétiques qui possèdent de nouvelles fonctions biologiques [201]. Finalement, le choix d'approches expérimentales pour étudier la méthylation de l'ADN dépend de l'objectif de chaque étude. En effet, il existe des méthodes qui permettent d'étudier le taux de méthylation globale de l'ADN aussi bien que des méthodes qui visent à plutôt cibler des sites méthylés spécifiques dans l'ADN. De nouvelles techniques ont été développées ces dernières années pour étudier la méthylation de l'ADN à plus grande échelle, notamment les microarrays et le séquençage qui permettent d'établir une cartographie du méthylome dans le génome [195].

A ce jour, la question de savoir si l'exposition aux PM provoque une hyper ou hypométhylation n'est pas encore résolue [202]. Plusieurs tests ont été réalisés chez l'homme afin de déterminer l'impact des PM sur la méthylation globale de l'ADN. Dans une expérience d'exposition humaine contrôlée, quinze participants adultes en bonne santé ont été exposés pendant 130 minutes à des particules fines ambiantes alors que d'autres sujets étaient exposés à un air filtré. Les résultats de cette étude montrent une diminution de la méthylation globale de l'ADN [134]. Une autre étude similaire dans laquelle les participants ont été exposés à un air non filtré pendant 48h, montre qu'une augmentation de $64 \mu\text{g}/\text{m}^3$ de $\text{PM}_{2,5}$ était significativement associée à une réduction de 1,44% de la méthylation de LINE-1 (Long interspersed element-1), éléments transposables constituant 17% du génome chez l'homme

et où le taux de méthylation est considéré comme un marqueur de méthylation global de l'ADN [203]. Les résultats de cette étude suggèrent qu'une exposition à court terme aux PM entraînerait une hypo-méthylation globale. En plus de l'impact de l'exposition directe, des études ont mis en évidence les effets de l'exposition aux PM sur la méthylation de l'ADN pendant la grossesse. Janssen et ses collaborateurs (2013) montrent dans leur étude une hypométhylation de l'ADN placentaire pendant toute la grossesse surtout au cours de la phase d'implantation de l'embryon [202].

Plusieurs expérimentations *in vivo* et *in vitro* ont été menées pour étudier l'effet des PM sur la méthylation globale ou spécifique de l'ADN. Une étude publiée par Ding et ses collaborateurs a montré qu'une exposition à des PM₁₀ et PM_{2,5} entraîne une diminution de la méthylation de LINE-1 de manière dose-dépendante [204]. Cela a été observé également dans des cellules épithéliales bronchiques issues de patients atteints de BPCO après exposition aux PM_{2,5} [205]. En revanche, une augmentation de la méthylation de l'ADN a été mis en évidence dans des cellules épithéliales de veine ombilicale après exposition à des particules fines de carbone [206]. Il est intéressant de noter aussi qu'une exposition à des PM₁₀ pendant 24h n'a pas eu d'effets significatifs sur le niveau global de 5-mC dans des macrophages RAW264.7 ; une hyper-méthylation non significative de LINE-1 et Alu pour la plupart des doses d'exposition a été observée [207]. Il est donc difficile de conclure et établir la relation entre l'exposition aux PM et la méthylation globale de l'ADN du fait des différences entre les sources de particules et les protocoles d'exposition.

Une altération de la méthylation de gènes par les PM peut entraîner directement une modification de l'expression de gènes ciblés, ce qui pourrait entraîner de multiples effets sur les cellules. L'effet des PM sur la méthylation spécifique de gènes impliqués dans des mécanismes comme l'inflammation et le stress oxydant a été analysé dans plusieurs études. Une hypo-méthylation dose-dépendante du promoteur du gène *iNOS* a été observée dans le sang et les poumons de rats exposés à des PM_{2,5} et des PM₁₀ [204]. Il a été également démontré dans un certain nombre d'études qu'une exposition aux PM entraînait une hypométhylation ou une hyperméthylation de gènes impliqués dans certains mécanismes cellulaires importants comme le cycle cellulaire (p16 et p53) et la coagulation du sang (SERPINE1) [203,208]. Plusieurs facteurs peuvent participer à ces dérégulations épigénétiques notamment la durée d'exposition, la taille des particules, la complexité de la composition du

mélange particulière, ainsi que la prédisposition génétique des individus. Il est important de noter aussi que ces modifications peuvent être transmises à la descendance d'où l'importance des différentes directives visant à améliorer la qualité de l'air [209].

(ii) Effet des $PM_{2,5}$ et des $PM_{0,1}$ sur les modifications d'histones

L'ADN génomique est associé à des octamères de protéines histones (H2A, H2B, H3 et H4, deux de chaque), l'ensemble formant la chromatine. Les modifications d'histones, notamment l'acétylation, la méthylation, la phosphorylation et l'ubiquitination, influencent l'expression des gènes. Ces modifications épigénétiques sont apposées par différentes enzymes. Concernant l'acétylation, l'histone acétyltransférase (HAT) et l'histone désacétylase (HDAC) travaillent de concert pour équilibrer le taux global d'acétylation des histones. L'acétylation des histones favorise le déroulement de la chromatine parce qu'elle réduit l'affinité entre l'ADN et les histones, ce qui augmente l'accessibilité de l'ARN polymérase II et des facteurs de transcription, et facilite la transcription des gènes. Par ailleurs, les activités de l'histone méthyltransférase et de l'histone déméthylase contribuent à l'équilibre du taux de méthylation globale des histones [197] (Figure 18).

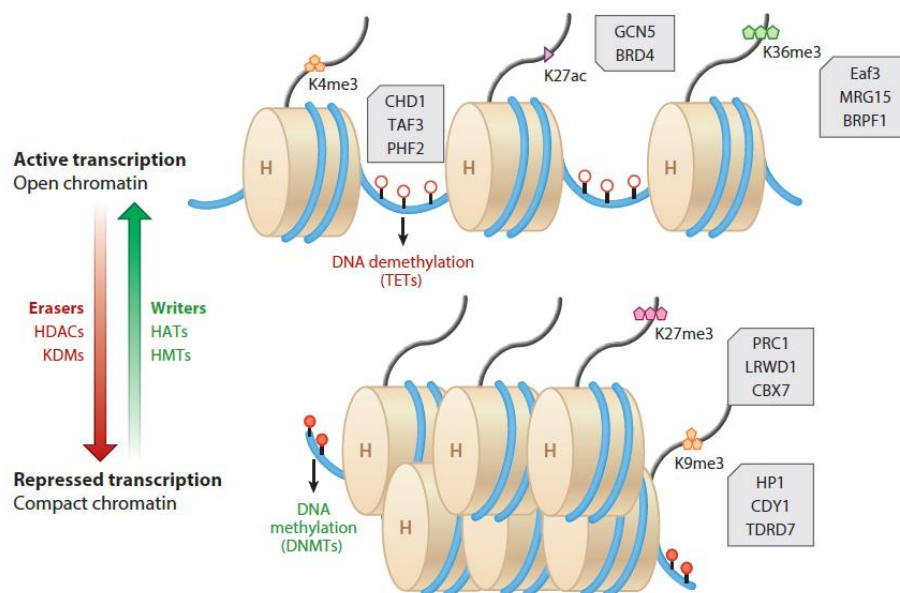


Figure 18 : Les modifications d'histones. Selon l'état de transcription « activé » ou « inhibé » des gènes, la chromatine peut exister sous forme d'euchromatine (déroulée) ou d'hétérochromatine (compacte). L'euchromatine est caractérisée par une hypo-méthylation des promoteurs de gènes et plusieurs modifications post-traductionnelles d'histones, en particulier les modifications H3K4me3, H3K27ac et H3K36me3 de H3 : cela entraîne une activation de la transcription. Concernant l'hétérochromatine, elle est caractérisée par une hyper-méthylation des promoteurs et les modifications H3K27me3 et H3K9me3 qui entraînent une inhibition de la transcription. Abréviations : DNMT, ADN méthyltransférases ; HAT, histone acétyltransférases, HDAC, histones désacétylases ; HMT, histone méthyltransférases ; KDM, histone lysine déméthylases [195].

Il a été démontré que les PM pouvaient entraîner des modifications d'histones. À ce jour, il existe peu d'informations sur les effets des PM sur ces marques épigénétiques. En effet, une exposition aux PM₁₀ favorise la libération de cytokines inflammatoires dans les cellules A549 en augmentant l'activité de l'HAT et de l'acétylation des histones H4 [210]. Une étude publiée par Cao et ses collaborateurs a montré qu'une exposition aux gaz d'échappement des moteurs diesels induisait l'expression du gène COX-2 via une augmentation de l'acétylation de l'histone H4 et une diminution de l'activité de l'HDAC [211]. Les résultats obtenus dans ces études permettent de faire le lien entre le déséquilibre des activités HAT/HDAC et la réponse inflammatoire observée dans les cellules épithéliales pulmonaires et chez les patients atteints de BPCO exposés aux PM [197]. Enfin, d'autres études ont montré que l'exposition aux métaux conduisait à une augmentation de la méthylation d'histones comme H3K9me2, H3K4me3, H3K27me3, H3K79me3 et H3K4me2. La production d'ERO induite par les PM_{2,5} modifie également les niveaux d'acétylation de H3K27 avec une élévation globale associée à l'activation de gènes impliqués dans l'inflammation [209] (Tableau 2).

Tableau 2. Modifications post-traductionnelles d'histones induites par l'exposition aux PM

Exposition	Cohorte/modèle	Modifications d'histone	Principales conclusions	Références
Air ambient pollué	Rats	H3K9ac	Augmentation de l'acétylation de H3K9 avec un effet dose réponse	Ding et al. (2017) [212]
	Conducteurs de camion	H3K9ac, H3K9me3, H3K27me3, et H3K36me3	Association entre augmentation de H3K27me3 et exposition aux PM	Kresovich et al. (2017) [213]
Particules d'échappement de diesel PM ₁₀	Cellules BEAS-2B	Histone H4	Augmentation de l'acétylation de l'histone H4 au niveau du promoteur COX-2 associée à une dégradation de HDAC1	Cao et al. (2007) [211]
	Cellules A549	Histone H4	Augmentation de l'expression d'IL-8 associée à une augmentation de l'acétylation de H4, de l'activité de HAT et une activation de NF-Kb	Gilmour et al. (2003) [210]
PM _{2,5}	Sujets exposés à des concentrations faibles ou élevées de PM _{2,5}	Profile d'expression globale de H3K27ac dans le génome	Association de marqueurs H3K27ac différentiels induits par les PM _{2,5} avec les réponses immunitaires et inflammatoires induites par la pollution atmosphérique	Liu et al. (2015) [214]
Particules riches en métaux	Travailleurs dans l'acier	di-méthylation de H3K4 et acétylation de H3K9	Augmentation de la di-méthylation de H3K4 et de l'acétylation de H3K9	Cantone et al. (2011) [215]

Les études sur le comportement des PUF vis-à-vis les modifications d'histones nécessitent d'être plus approfondies. Cependant, les données obtenues jusqu'à présent quant à la relation entre les modifications post-traductionnelles d'histones et les effets des

PM sont intéressantes et permettent en partie de comprendre les mécanismes à l'origine de la toxicité des PM. Il serait donc important de réaliser des analyses épigénétiques à plus grande échelle sur des populations plus larges dans le but d'identifier des biomarqueurs d'exposition spécifiques.

(iii) Dérégulation des miRNA par les PM_{2,5} et les PM_{0,1}

Les miARN constituent une classe d'ARN non codants de longueur moyenne de 22 nucléotides. Ils jouent un rôle important dans la régulation de l'expression des gènes. Les miARN sont transcrits à partir d'une séquence d'ADN en miARN primaires (pri-miARN), puis transformés en précurseurs de miARN (pré-miARN) et ensuite en miARN matures (Figure 19). Dans la majorité des cas, les miARN interagissent avec la région 3'UTR d'ARNm cibles pour inhiber leur expression. Si le miARN est totalement complémentaire à son ARNm cible, ce dernier est dégradé par le complexe RISC (RNA-induced silencing complex), et si la complémentarité est partielle, la traduction de l'ARNm est inhibée. Cependant, des études ont mis en évidence que les miARN pouvaient interagir aussi avec des régions 5'UTR, promotrices ou codantes des gènes [216]. Par ailleurs, il a été démontré également que les miARN pouvaient activer l'expression génique sous certaines conditions [217]. Un seul miARN peut moduler l'expression de plusieurs ARNm cibles. Les miARN jouent donc un rôle essentiel dans les cellules parce qu'ils sont impliqués dans de nombreux processus biologiques essentiels comme le cycle cellulaire, la mort cellulaire, la réponse inflammatoire, etc. Par conséquent, une expression aberrante des miARN est souvent associée à des processus pathologiques chez l'homme et, en particulier à la cancérogenèse. Par exemple, mir-21, let-7a, et mir-145 sont dérégulés dans le cancer du sein, le cancer du poumon et le cancer gastrique, respectivement [218]. Des études mécanistiques ont permis de montrer que les miARN jouaient aussi un rôle important dans l'inflammation via la régulation des voies associées à Nf-kB, médiateur central de l'inflammation. Mir-155 et mir-146 sont parmi les miARN les plus caractérisées dans ce mécanisme puisqu'ils sont impliqués dans plusieurs maladies immunitaires [218].

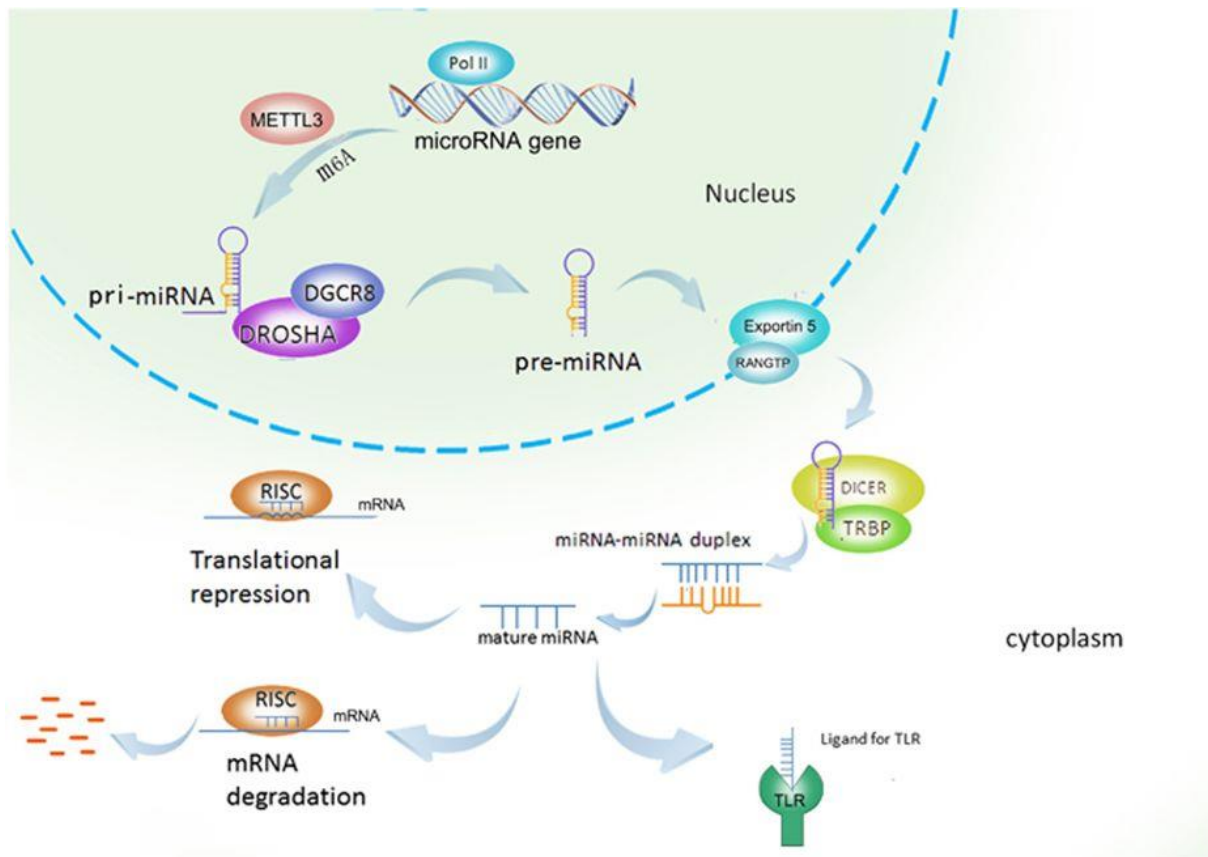


Figure 19 : La biogénèse des miARN. Les gènes des miARN sont en général transcrits par l'ARN polymérase II pour produire les pri-miARN. Ceux-ci sont par la suite clivés par un complexe enzymatique formé par la protéine DGCR8 et DROSHA pour donner les pre-miARN qui ont une structure d'épingle à cheveux. Ces pre-miARN sont par la suite transportés du noyau vers le cytoplasme à l'aide du complexe Ran/GTP/Exportin 5 où ils sont pris en charge par une autre enzyme RNase III Dicer pour les transformer en un duplex miARN/miARN. Une fois ces 2 miARN séparés, le miARN mature s'incorpore dans le complexe protéique RISC. Un miARN mature peut inhiber l'expression de gènes cibles via la dégradation ou l'inhibition de la traduction des ARNm correspondants. En outre, les miARN peuvent se lier directement aux récepteur TLR et déclencher des voies de signalisation en aval [219].

De nombreux miARN peuvent être retrouvés dans les fluides extracellulaires. Différentes études ont permis de les identifier dans le plasma, le sérum, la salive, le liquide céphalo-rachidien, le lait maternel, l'urine, les larmes, le liquide péritonéal, le lavage bronchoalvéolaire, etc. Ces miARN circulants ont un réel intérêt diagnostique ou pronostique car ce sont de potentiels biomarqueurs pour des maladies. Les miARN circulants présentent une stabilité importante car ils sont majoritairement protégés contre la dégradation. Ils peuvent être associés à des lipoprotéines, principalement des HDL, et/ou des protéines Argonaute ou incorporés dans des vésicules extracellulaires [220]. Ces vésicules consistent en des exosomes, des microvésicules, des oncosomes, mais aussi en des corps apoptotiques libérés lors de la mort cellulaire [221]. Les exosomes sont à la base dérivée d'endosomes qui se forment par invagination dans des corps multivésiculaires (MVB). Ces derniers sont

normalement destinés aux lysosomes où ils sont dégradés, mais ils peuvent aussi fusionner avec la membrane cytoplasmique, libérant ainsi des exosomes dans l'espace extracellulaire. C'est au moment de la formation des exosomes que certains ARN sont incorporés. La présence de miARN dans les exosomes s'explique en partie du fait que le complexe RISC a été localisé à la surface des MVB. Les mécanismes d'absorption des miARN circulants par les cellules ne sont pas encore clairs. Cela varie en fonction de leur mode de transport, dans des exosomes (ou d'autres vésicules) ou associés à d'autres molécules (HDL ou Ago). Les miARN extracellulaires associés à une vésicule pénétreraient dans les cellules par endocytose, phagocytose ou fusion directe avec les membranes plasmiques, tandis que les miARN libres pourraient être pris en charge par des récepteurs spécifiques situés à la surface des cellules [216]. Les études sur les mécanismes de libération des ARN extracellulaires par les cellules et leurs fonctions au niveau des cellules cibles sont en plein essor (Figure 20).

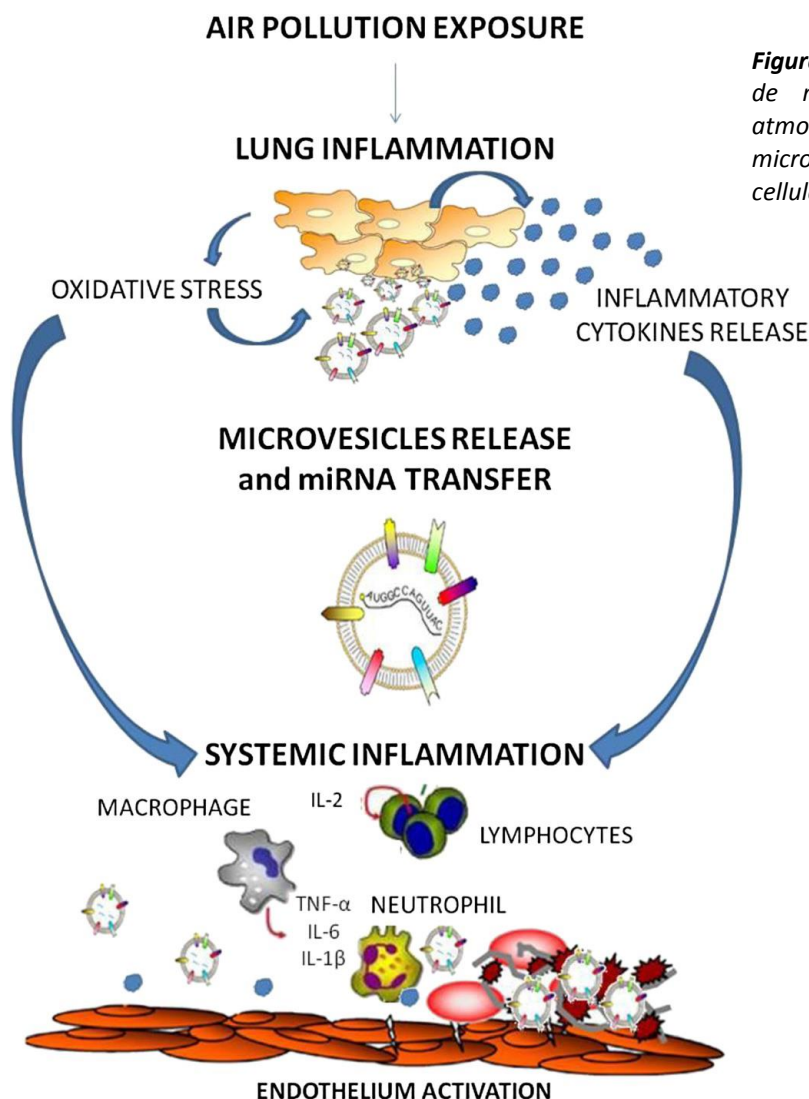


Figure 20 : Schéma présentant une proposition de mécanisme de l'effet de la pollution atmosphérique sur la libération de microvésicules et la communication entre les cellules [222].

L'expression des miARN peut être influencée par l'environnement. C'est pourquoi, une exposition à un air pollué pourrait avoir des effets délétères sur la santé en dérégulant de nombreux mécanismes biologiques et voies de signalisation. Plusieurs études ont montré que certains miARN modifiaient le niveau d'expression de leurs ARNm cibles en réponse au stress oxydant induit par les ERO [222,223]. Les ERO activent des facteurs de transcription impliqués dans le stress oxydant notamment p53, NF- κ B, FOXO et HIF qui eux-mêmes activent directement certains miARN tel que let-7s, mir-146 et mir-21 [209]. Une exposition aux PM_{2,5} dérégule l'expression de miARN impliqués dans l'inflammation, le cycle cellulaire, l'apoptose, les maladies cardiovasculaires ainsi que les maladies neurodégénératives (Tableau 3) [209]. Il est intéressant de noter aussi que les PM_{0,1} sont pareillement associés à ce type de modifications épigénétiques [224]. Chew et ses collaborateurs ont montré qu'une exposition à des nanoparticules d'aluminium dérégulait l'expression de 23 miARN dont mir-146 qui est décrit comme atténuateur d'inflammation en inhibant l'expression d'il-8 et Cox-2 [225]. Mir-146 ainsi que d'autres miARN impliqués dans la réponse immunitaire, comme mir-21 et mir-135b, sont également dérégulés suite à l'exposition aux nanoparticules de carbone [173]. Il a été aussi démontré qu'une exposition à des PM riches en métaux contribuait à une modification importante du profil d'expression des miARN chez les ouvriers d'aciéries [226].

Tableau 3. miARN dérégulés après exposition aux PM.

Exposition	miARN	Fonction	Dérégulations	Localisation	Reference
PM ₁₀	let-7c-5p, miR-106a-5p, miR-143-3p, miR-185-5p, miR-218-5p, miR-331-3p, miR-642-5p, miR-99b-5p	Asthme, inflammation, hypertension artérielle	Down-régulés	Vésicules extracellulaires	Pergoli et al. (2017) [227]
PM _{2,5}	miR-126-3p, miR-19b-3p, miR-93-5p, miR-223-3p, miR-142-3p, miR-23a-3p, miR-150-5p, miR-15a-5p, miR-191-5p, let-7a-5p	Athérosclérose, Hypertrophie cardiaque, Réponses inflammatoires	Up-régulés	Circulants	Rodosthenous et al. (2016) [228]
PM _{0,1}	mir-222	Cycle cellulaire, Dommages vasculaires	Up-régulé	Circulant	Vriens et al. (2016) [224]

Malgré le nombre limité d'études qui valident les modifications des miARN suite à une exposition aux particules, les profils d'expression des miARN pourraient être utilisés dans le futur comme biomarqueurs spécifiques pour suivre l'état de santé des patients.

6. Biomarqueurs et santé environnementale

Des tests toxicologiques sont mis à jour en permanence afin d'améliorer les protocoles et procédures utilisés pour estimer la nocivité d'une substance. Le rapport de l'US National Research Council (NRC) envisage de s'éloigner des tests de toxicité traditionnels et de se concentrer sur la compréhension des voies de signalisation dérégulées par l'exposition à des molécules biologiquement actives ayant la capacité d'avoir des effets nocifs sur la santé [229]. L'identification de ces voies de toxicité est essentielle pour comprendre les mécanismes d'action d'un stimulus. Afin de mieux comprendre la toxicité d'une substance donnée, le NRC recommande ainsi de réaliser des analyses « omiques » sur des cultures primaires, des lignées cellulaires et des modèles animaux exposés, et de les associer à une caractérisation chimique de cette substance et à une analyse de la relation dose-réponse [230]. Cependant, les résultats générés à l'aide de cette nouvelle stratégie expérimentale nécessitent encore d'être comparés à ceux obtenus par les méthodes conventionnelles afin de prendre les décisions appropriées en ce qui concerne les risques des molécules toxiques étudiées [139].

De nombreuses études ont eu recours à des analyses d'expression pangénomiques afin d'identifier les voies de signalisation dérégulées après exposition à des molécules toxiques. Comme déjà évoqué précédemment, Les PM peuvent avoir des effets délétères et induire diverses maladies pulmonaires à travers plusieurs mécanismes, dont le stress oxydant, l'inflammation et les modifications épigénétiques. Les biomarqueurs des maladies induites par les PM sont basés généralement sur ces 3 effets (stress oxydant, inflammation, et modifications épigénétiques) et les outils de génomiques récents utilisés dans les études de toxicogénomiques permettent de détecter ces biomarqueurs d'une manière plus précise [231].

Les biomarqueurs d'effets identifiés à l'aide d'études expérimentales *in vitro* et *in vivo* peuvent être par la suite évalués chez l'homme afin d'étudier leurs corrélations aux maladies d'origine environnementale et de développer ultérieurement de nouvelles stratégies pour la

prévention et le traitement de ces affections. Les adduits et la méthylation de l'ADN, les modifications d'histones ainsi que l'expression de cytokines ou de miARN corrélés à l'exposition aux polluants et liés à des maladies peuvent être utilisés en tant que biomarqueurs d'effets. D'un point de vue clinique, de nombreuses études suggèrent que l'étude de l'expression des miARN au niveau systémique offre de nouvelles perspectives pour le développement de nouveaux biomarqueurs diagnostiques ou pronostiques non invasifs [232]. D'un point de vue thérapeutique, la modulation de l'expression de miARN au niveau tissulaire pourrait également permettre le développement de nouveaux traitements. Par exemple, mir-22 pourrait constituer une cible intéressante pour le traitement du cancer du foie car il est impliqué dans la régulation de la prolifération, et dans les différentes étapes du développement du cancer [233,234].

Problématique de la thèse

La pollution atmosphérique particulaire constitue un risque pour la santé publique. Les études épidémiologiques montrent un lien étroit entre l'exposition aux PM et l'exacerbation et le développement de maladies respiratoires, cardiovasculaires et le cancer. Les PM sont classés selon leur DAE. C'est pourquoi, les particules ultrafines pourraient avoir un impact plus nocif que les particules ayant une taille plus grande parce qu'elles sont capables d'atteindre les alvéoles et de passer dans la circulation sanguine. Cependant, ces particules ultrafines ne sont pas prises en compte dans les directives actuelles visant à améliorer la qualité de l'air parce que les études toxicologiques à ce jour ne sont pas suffisantes pour établir des liens directs entre l'exposition et l'altération de mécanismes pouvant être à l'origine de nombreuses maladies comme, par exemple, l'inflammation chronique retrouvée chez les patients atteints d'asthme ou de BPCO.

A l'heure actuelle, les études toxicologiques sur les effets des particules se limitent souvent à des études à court terme. Mais l'homme est exposé à ces polluants tout au long de sa vie, il semble donc indispensable de caractériser l'impact de ces particules à plus long terme. Les questions posées sur le devenir et le comportement des particules ultrafines émises dans l'environnement paraissent donc essentielles.

Dans le cadre de ma thèse, je me suis intéressée à la caractérisation physico-chimique et à l'étude de la toxicité de particules fines ($PM_{2,5}$ ou PF) et quasi-ultrafines ($PM_{0,18}$ ou PUF) collectées durant une campagne de prélèvement de 7 mois sur un même site urbano-industriel localisé à Grande-Synthe dans le Nord de la France. Dans un premier temps, la granulométrie ainsi que la composition chimique, notamment en métaux et HAP, ont été évaluées. Ces particules ont été par la suite administrées par voie intranasale à un modèle murin (BALB/c) suivant 3 protocoles d'exposition : aigu (24h), et sub-chroniques de 1 mois ou 3 mois (3 fois par semaine) afin d'étudier leurs effets sur l'appareil respiratoire.

Dans cette étude, je me suis particulièrement intéressée à l'étude de l'effet pneumotoxique des PUF chez la souris par comparaison à celui des PF. J'ai d'abord évalué leur internalisation dans les cellules pulmonaires en comptant, dans le LBA ou dans des coupes histologiques de poumons, en dénombrant les macrophages ayant phagocyté des particules. Par la suite, j'ai évalué la réponse inflammatoire pulmonaire des souris exposées en analysant la cellularité (macrophages et PNN) des LBA recueillis, en quantifiant l'expression pulmonaire de gènes associés à l'inflammation et en analysant la morphologie des tissus pulmonaires à

l'aide de techniques d'immunohistochimie. J'ai ensuite évalué l'impact de l'exposition aux particules sur d'éventuelles altérations génétiques, à l'aide des tests *in vivo* des comètes, des micronoyaux et Pig-A, et épigénétiques, en mesurant la méthylation globale de l'ADN et les modifications d'histones (acétylation et méthylation).

Les mécanismes à l'origine de la pathogénicité pulmonaire des PUF ont été appréhendés en utilisant des méthodes transcriptomiques pangénomiques à l'aide de puces à ADN (microarrays). J'ai pu ainsi comparer, d'une part, le nombre de gènes dérégulés ainsi que les voies de signalisation altérées entre les PF et les PUF, et, d'autre part, entre les 3 protocoles d'exposition. En parallèle, j'ai mesuré le profil d'expression de 750s miARN dans les mêmes échantillons de poumons par une méthode RT-PCR quantitative à très haut débit (openarrays). Les miARN dérégulés dans les poumons pourront être prochainement recherchés dans le sang des animaux exposés et évalués comme biomarqueurs d'atteinte tissulaire.

MATERIELS ET METHODES

1. Prélèvement des PM

Les PF et PUF ont été collectées à Grande-Synthe dans le Nord de la France par le département SAGE (Sciences de l'Atmosphère et Génie de l'Environnement) de l'Institut Mines Télécom (IMT) de Lille-Douai. Le site de prélèvement était localisé à 2 Km de la zone industrielle de Dunkerque et à proximité des autoroutes A16 et A25. La campagne de prélèvement s'est déroulée entre le 9 Septembre 2013 et 14 Avril 2014 (26 semaines). Un impacteur en cascade à haut débit (HVIS – High Volume Impactor Sampler pompant à 400L/min) a été utilisé pour collecter les PF (DAE : 0,18-2,5 μm) par impaction à sec sur plaques de Teflon, et les PUF (DAE \leq 0,18 μm) par filtration sur filtres en polycarbonate (PC) de format A4. Le seuil de coupure du filtre étant de 0,18 μm , nous avons considéré, dans le cadre de ce projet, les particules avec un DAE \leq 0,18 μm comme quasi-ultrafines.

Simultanément à la collecte des PF et PUF par HIVIS, un impacteur en cascade à bas débit de 13 étages (Dekati ; flux 89 et de débit 30 L/min), recueillant des fractions de tailles différentes (10,5; 6,7; 4; 2,5; 1,65; 1; 0,65; 0,4; 0,26; 0,17; 0,1; 0,06 90 and 0,03 μm) sur des filtres en téflon pré-pesés de 25 mm de diamètre, a été déployé sur le même site. Cette collecte supplémentaire de particules a permis de caractériser plus finement sur un pas de temps hebdomadaire, les variations de composition chimique selon la granulométrie des particules. Ces données ont également servi à valider et à déterminer précisément les masses de nanoparticules (PM_{0,03-0,25}) pour les prélèvements effectués à haut débit (larges filtres physiquement difficiles à peser).

Les PF collectées sur les 26 semaines ont été transférées, à l'aide d'une spatule en Teflon, dans un tube sec nettoyé à l'acide. Elles ont été par la suite pesées, aliquotées et stockées -20°C jusqu'à utilisation (analyses physico-chimiques et toxicologiques). Nous avons ainsi pu collecter environ 250 mg de PF.

Les échantillons de PUF collectés sur filtres grand format ont été extraits aux ultrasons dans une solution d'HBSS (Hank's Balanced Salt Solution). Toutes les manipulations ont été effectuées dans une salle à empoussièremment contrôlé de classe 1000 et le matériel a été préalablement décontaminé à l'acide ou à l'alcool pour éviter toute contamination à la fois par des agents biologiques et des éléments traces. Pour constituer la suspension aqueuse de PUF, chaque filtre en polycarbonate a été découpé en 9 morceaux qui ont été par la suite

pesés. Un morceau a été conservé pour les analyses chimiques, tandis que les huit morceaux restants ont été immergés dans 3 bains successifs de 10 ml d'HBSS soumis à un traitement par les ultrasons (Vibracell 75455, 500W, 20 KHz). Tous les extraits contenant les PUF en suspension ont été combinés dans un seul échantillon. Pour la détermination précise de la concentration de PUF dans cet échantillon, nous avons utilisé à la fois (i) l'estimation de la masse des PUF sur chaque filtre et (ii) la composition chimique des PUF ($PM_{0,18}$) collectées par l'impacteur HVIS comparée à celle des PUF collectées par l'impacteur à bas débit Dekati ($PM_{0,03-0,26}$). En traçant les 26 points de données hebdomadaires des impacteurs à faible et haut débits rapportés aux concentrations massiques des éléments chimiques, nous avons obtenu une régression linéaire permettant de calculer le rapport entre la masse des PUF ($PM_{0,18}$) à déterminer (collectées avec l'impacteur HVIS) et la masse des PUF ($PM_{0,03-0,26}$) pesée sur les filtres en téflon de 25 mm de l'impacteur Dekati. Au total, nous avons récupéré une suspension de 150 ml dont la concentration a été calculée à $2,7 \mu\text{g}/\mu\text{l}$.

2. Répartition granulométrique des PM

Le diamètre hydrodynamique des PF et PUF a été mesuré dans des suspensions particulières à 1 mg/ml d'HBSS, en utilisant un Zetasizer nano ZS à diffusion dynamique de la lumière (DLS) (Malvern Instruments, Orsay, France). Les solutions contenant les particules ont été traitées aux ultrasons avant les analyses.

3. Analyse qualitative et quantitative des HAP et des éléments traces dans les particules fines et ultrafines

Concernant les PF, trois aliquots (environ $1,2 \pm 0,4$ mg) ont été préparés pour mesurer les concentrations en métaux. Les particules ont été digérées dans un mélange de réactifs ultrapurs (8 mL HNO_3 ; 0.5 mL HF; 2 mL H_2O_2), à 200°C pendant 20 minutes, dans un four à microonde (Milestone ETHOS, Thermo Fisher Scientific, Courtaboeuf, France). La méthodologie et le control qualité (blancs, limites de détection, incertitudes) ont été décrits précédemment [235]. Les concentrations d'éléments traces (Al, As, Ba, Be, Ca, Cd, Ce, Co, Cr, Cs, Cu, Fe, K, La, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, Pb, Rb, Sb, Sn, Sr, Tl, V, Zn) ont été mesurés en triplicat par ICP-MS (Inductively coupled plasma mass spectrometry) (NeXion 300x, Perkin Elmer, Waltham, MA, USA). Des mesures répétées de blancs et des échantillons control qualité (QC at $0.4 \mu\text{g}/\text{L}$) ont été effectuées au cours de l'analyse. Un standard interne (69Ga, 103Rh) a été

ajouté (1 µg/L) à toutes les solutions afin de corriger la dérive du signal au cours de l'analyse par ICP-MS. De plus, plusieurs échantillons standards de particules de référence (1.1 ± 0.5 mg ; NIST SRM 2584 particles, Indoor Dust) ont été utilisés pour valider la procédure d'extraction.

En ce qui concerne les échantillons de PF, les HAP ont été extraits sous pression en utilisant le système Dionex ASE 200 (Thermo-Scientific) équipé d'une cellule en acier inoxydable de 11 mL contenant les particules à extraire (i.e., 5,13 mg) et de l'acétonitrile. L'extrait a été ensuite placé dans un bain-marie TurboVap II à 60°C (Zymark, Roissy, France) et évaporé sous un léger flux d'azote pour être concentré et ramené à un volume final de 500 à 1000 µL. Les HAP ont été par la suite séparés et quantifiés par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) à l'aide d'un système Waters 2695 Alliance (Waters SA, Saint-Quentin-en-Yvelines, France) couplé à un capteur composé de photodiodes placées en ligne et à un détecteur fluorimétrique [236]. L'efficacité d'extraction et les limites de détection analytiques ont été évaluées pour chaque HAP à l'aide d'un échantillon certifié (i.e., NIST SRM-1649a, Urban Dust). Cette méthode a permis de déterminer la concentration de 18 HAPs : Fluoranthène (FLA), Pyrène (PYR), Benzo(c)phénanthrène (BcPHE), Benzo(a)anthracène (BaA), Chrysène (CHR), 5-Méthylchrysène (5MCHR), Benzo(e)pyrène (BeP), Benzo(b)fluoranthène (BbF), Benzo(j)fluoranthène (BjF), Benzo(k)fluoranthène (BkF), Benzo(a)pyrène (BaP), Dibenzo(a,l)pyrène (DaIP), Dibenzo(a,h)anthracène (DahA), Benzo(g,h,i)perylene (BghiP), Indeno(1,2,3-c,d)pyrène (IP), Dibenzo(a,e)pyrène (DaeP), Anthanthrène (ANTH) and Coronène (COR).

Concernant les PUF, la procédure d'analyse des éléments trace par ICP-MS a été réalisée sur 4 échantillons de 250 µL d'une suspension de PUF dans de l'HBSS (600 µg de PUF) après digestion acide suivant la même procédure que celle décrite pour les PF. Les éléments Na, Mg et K étant présents en grande quantité dans le tampon HBSS, ils n'ont pas été pris en compte dans les analyses de composition chimique. Pour l'analyse des HAP, 5,37 mg de PUF ont été déposés sur un filtre à fibres de quartz pré-chauffé ($\varnothing = 47$ mm, Tissuquartz 2500QAT-UP Pallflex, VWR, Fontenay-sous-Bois, France) puis extraits deux fois et analysés en triplicat en utilisant la même procédure que pour les PF.

4. Hébergement des animaux

Des souris mâles BALB/c âgées de 9 semaines ont été fournies par la société Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, France). Cette souche est connue pour être moyennement sensible à l'induction chimique de tumeurs pulmonaires [141]. Toutes les procédures d'expérimentation animale ont été approuvées par le comité d'éthique local (approval number : 2015120411561967). Les souris ont été surveillées tous les jours pour évaluer leur santé, leur bien-être, leur poids ainsi que leurs changements éventuels de comportement.

5. Exposition des souris aux particules

Après anesthésie à l'isoflurane (2%), les souris ont été exposées par voie intranasale à 40 μ L de suspensions de PF ou de PUF, ou à 40 μ L d'HBSS pour les souris contrôles suivant 3 protocoles d'exposition : aiguë (24h), ou sub-chroniques de 1 mois ou de 3 mois. Pendant l'exposition aiguë, les souris ont reçu des doses uniques de 10, 50 ou 100 μ g de PF ou de PUF ; pour les expositions sub-chroniques les souris ont reçu 10 μ g de PF ou de PUF 3 fois par semaine pendant 1 mois ou 3 mois (Figure 21). Avant chaque exposition, les suspensions de PF et de PUF ont été préalablement traitées aux ultrasons afin de limiter la formation d'agrégats particulaires.

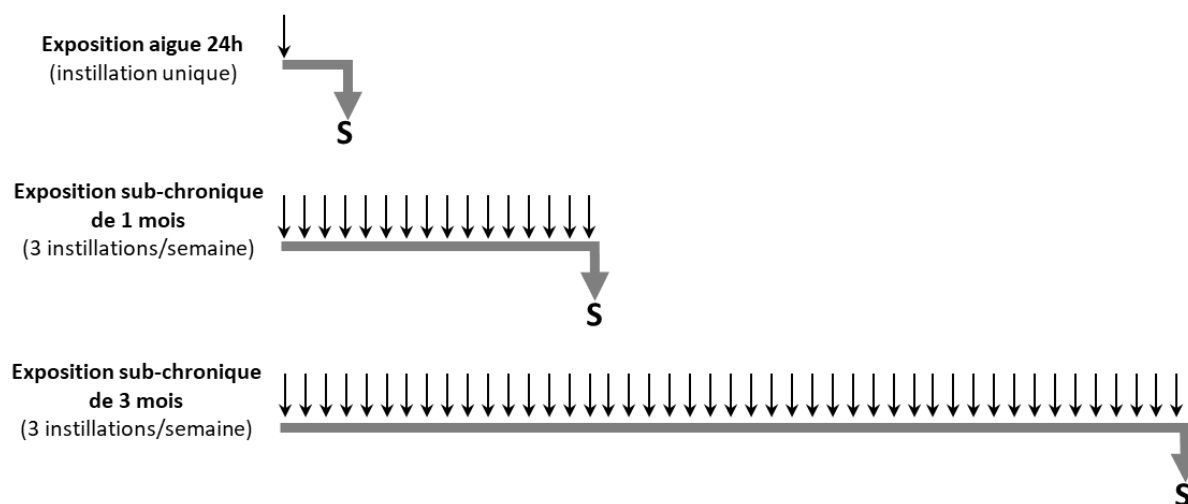


Figure 21 : Protocoles expérimentaux d'expositions aiguë et sub-chronique des souris aux PF et PUF. Les particules ont été mises en suspension dans 40 μ l d'HBSS. Pour l'exposition aiguë, les souris ont été sacrifiées (S) 24h après avoir reçu une dose unique de particules (10, 50 ou 100 μ g). Pour les expositions sub-chroniques, les souris ont été exposées 3 fois par semaine pendant 1 ou 3 mois à 10 μ g de particules ; elles ont été sacrifiées 24h après la dernière exposition. Les souris témoins ont reçu HBSS sans particules.

6. Prélèvement des échantillons biologiques

A l'issue des expositions, les souris ont été légèrement anesthésiées à l'isoflurane afin de prélever sur tubes EDTA environ 300-400 μ l de sang par voie retro-orbitale. Un volume de 60 μ l de cet échantillon a été utilisé immédiatement pour réaliser le test de mutation génique Pig-A. Le reste a été directement centrifugé à 2000 g pendant 8 min à température ambiante afin de séparer le plasma. Le surnageant (plasma) ainsi que les culots de sang ont été stockés à -80°C pour des analyses ultérieures.

Les souris ont été par la suite anesthésiées profondément par un mélange de xylazine/kétamine. Des lavages broncho-alvéolaires (LBA) ont été réalisés avec 2 x 1mL de PBS stérile (ThermoFisher Scientific, Illkirch, France). Ensuite, les poumons ont été prélevés : une première partie a été conservée dans une solution de RNA Later selon les instructions du fournisseur (Ambion, ThermoFisher Scientific, Illkirch, France) pour les extractions ultérieures d'acides nucléiques ; une seconde partie a été congelée à sec dans de l'azote liquide puis conservée au congélateur à -80°C. Le cœur, le foie, les reins et le cerveau ont été également prélevés et conservés selon les mêmes procédures. A noter que de petits morceaux supplémentaires de foie et de poumon frais ont été également prélevés pour réaliser immédiatement le test de comètes. De même, les fémurs des souris ont été prélevés et la moelle osseuse a été extraite dans du sérum de veau fœtal pour effectuer les tests du micronoyau.

Pour les analyses histologiques, un autre groupe de souris a été utilisé. Les poumons ont été perfusés par voie intratrachéale avec 4% de paraformaldéhyde dans du tampon PBS. Ils ont été par la suite immergés pendant une nuit dans cette même solution puis enrobés dans de la paraffine.

7. Numération cellulaire du LBA

Le LBA recueilli (2 x 1 ml) a été immédiatement maintenu dans la glace, puis centrifugé à 3000 g pendant 10 min à 4°C. Les 2 culots ont été remis en suspension ensemble dans 500 μ l de PBS et la viabilité cellulaire a été évaluée par comptage des cellules vivantes après coloration par le bleu Trypan. Les cellules du LBA ont été ensuite déposées sur des lames superfrost par cyto-centrifugation (cytospin-2, Shandon Products Ltd., ThermoScientific), et

colorées par le May–Grünwald–Giemsa (Sigma Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France). Le pourcentage de macrophages chargés de particules a été calculé par rapport à 200 macrophages comptés dans 4 champs sélectionnés aléatoirement. En parallèle, le pourcentage de PNN et de macrophages a été calculé après avoir compté au moins 200 cellules dans au moins 4 champs sélectionnés aléatoirement sur chaque lame.

8. Evaluation du potentiel génotoxique *in vivo* des PF et PUF

L'évaluation du potentiel génotoxique et/ou mutagène *in vivo* des PF et PUF a été réalisée en collaboration avec le Laboratoire de Toxicologie Génétique de l'Institut Pasteur de Lille. Pour cela, trois tests *in vivo* complémentaires ont été réalisés chez les souris : (i) le test des comètes sur le poumon (en tant qu'organe primo-exposé) et sur le foie (organe systémique, métaboliseur et riche en cellules capables de phagocytose) pour la mise en évidence des altérations primaires de l'ADN, (ii) le test du micronoyau *in vivo* sur moelle osseuse (effets systémiques) pour l'évaluation des aberrations chromosomiques et (iii) le test Pig-A sur sang circulant (effets systémiques) pour étudier les mutations géniques *in vivo*. Ces trois tests sont classiquement employés pour détecter le pouvoir génotoxique et/ou mutagène de nanoparticules [237]. Pour des raisons méthodologiques, le test des comètes a été réalisé dans le cas des expositions aiguës (2 traitements à 24h d'intervalle) et subchronique de 1 mois uniquement. Le test du micronoyau et le test Pig-A ont été effectués dans le cas des expositions subchroniques de 1 et 3 mois. La réalisation des tests ainsi que l'interprétation des données ont été faites conformément aux lignes directrices de l'OCDE N°489 et N°474 pour les tests des comètes *in vivo* et du micronoyau *in vivo*, respectivement [238,239], et conformément aux recommandations internationales pour le test Pig-A [240,241]. Pour des raisons éthiques et scientifiques, ces 3 tests ont été réalisés sur les mêmes animaux quand cela a été possible.

(i) Test d'altérations primaires de l'ADN *in vivo* : Test des Comètes

A partir d'un lobe de poumon fraîchement prélevé, des cellules ont été isolées par digestion enzymatique avec de la collagénase. Les cellules recueillies ont été incluses dans un gel d'agarose déposé sur une lame de microscope. Les microgels ainsi obtenus ont été soumis successivement aux étapes de lyse des membranes cellulaires et nucléaires, de déroulement de l'ADN puis d'électrophorèse en conditions alcalines (pH>13) et à l'abri de la lumière. Après

neutralisation, les lames ont été déshydratées puis colorées par un agent intercalant fluorescent (iodure de propidium) avant l'analyse et la quantification de la fragmentation de l'ADN. La procédure suivie était en accord avec les récentes recommandations internationales, notamment celles décrites dans plusieurs rapports et revues qui définissent les conditions optimales de mise en œuvre des tests des comètes *in vivo* [242,243]. Les images de 50 noyaux sélectionnés aléatoirement ont été analysées pour chaque lame étudiée. Pour chaque animal, au moins 3 lames seront analysées soit 150 noyaux.

Une partie importante des effets génotoxiques des PM étant susceptible d'être en rapport avec la production de formes activées de l'oxygène, il apparaissait nécessaire de compléter le protocole traditionnel en mettant en évidence les lésions oxydatives de l'ADN (telle que la 8-oxo-dG).

(ii) Test de mutation chromosomique in vivo : Test du Micronoyau

Le test du micronoyau consiste en la recherche de fragments chromosomiques acentriques ou de chromosomes entiers n'ayant pas migrés normalement lors de l'anaphase et n'étant donc pas retenus dans le noyau de la cellule fille. Ils apparaissent alors dans le cytoplasme sous la forme d'un corps de Howell-Jolly ou micronoyau. Le test du micronoyau permet de détecter simultanément le retard mitotique, l'apoptose, les cassures chromosomiques, la perte d'un ou plusieurs chromosomes et la non-disjonction des chromosomes.

Le test a été réalisé *in vivo* de façon standard à partir de la moelle osseuse des souris (OCDE 474). Les micronoyaux, qui peuvent également être présents dans les myéloblastes, les myélocytes ou les érythroblastés, ont été recherchés spécifiquement dans les érythrocytes polychromatiques car ils sont plus faciles à détecter dans ces cellules étant donné qu'elles expulsent leur noyau principal (le micronoyau restant dans les érythrocytes).

Après traitement des animaux, les fémurs ont été prélevés et la moelle osseuse extraite dans du sérum de veau fœtal. Les culots de centrifugation ont été homogénéisés, étalés sur des lames et colorés. La fréquence des érythrocytes polychromatiques avec un ou plusieurs micronoyaux a été déterminée en comptant au moins 2000 de ces cellules par animal.

(iii) Test de mutation génique in vivo : Test Pig-A

Le test Pig-A est un test de mutation génique *in vivo* sensible et relativement simple, réalisé par cytométrie en flux.

Le gène PIG-A est impliqué dans la synthèse du récepteur membranaire Phosphatidyl-Inositol Glycane (PIG), nécessaire à l'ancrage membranaire de plusieurs protéines de cellules sanguines, en particulier le CD24, le CD55 et le CD 59. Dans le test Pig-A [241,244], c'est précisément la fixation ou non de CD59 couplé à un fluorochrome qui est étudiée dans deux populations cellulaires : les érythrocytes totaux (RBC) et les réticulocytes circulants (RET) contenant encore de l'ARN.

Situé sur le chromosome X, une seule copie fonctionnelle du gène PIG-A est présente chez les mâles. Si une mutation du gène induite par un composé chimique conduit à une protéine non fonctionnelle, les cellules seront alors déficientes en marqueurs de surfaces CD59. La fréquence de cellules CD59(-) pourra donc être directement liée à la fréquence de mutations induites par ce composé.

Après séparation des différentes populations sanguines, les RBC (érythrocytes matures et immatures) sont isolés puis marqués avec l'anticorps anti-CD59 murin couplé à de la phycoérythrine. Les RETs contenant encore de l'ARN seront différenciés par marquage par le Syto 13. L'analyse par cytométrie en flux permettra de séparer les différentes populations cellulaires et de déterminer la fréquence de mutation.

9. Extraction de l'ADN génomique

L'ADN génomique a été isolé à partir du tissu pulmonaire avec le kit QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) selon les recommandations du fournisseur. La concentration de l'ADN isolé a été mesurée par le spectrophotomètre Biospecnano (Shimadzu, Marne-la-vallée, France).

10. Dosage de 8-hydroxy-2-deoxyguanosine (8-OHdG) dans les poumons de souris

L'ADN extrait a d'abord été dénaturé à 98°C pendant 5 minutes puis transféré directement dans la glace. La digestion enzymatique de l'ADN a été effectuée avec le kit 8-

OHdG Assay Preparation Reagent Set de Wako (Sobioda, Montbonnot-Saint-Martin, France) en suivant les recommandations du fournisseur. Le taux de 8-OHdG a été dosé par une méthode ELISA à l'aide du kit OxiSelect Oxidative DNA Damage (Cell Biolabs, Paris, France) selon le protocole du fournisseur.

11. Analyse histologique des poumons

Des coupes histologiques de 5 µm ont été réalisées à partir des échantillons de tissu pulmonaire inclus en paraffine. Une première série de lame a été colorée à l'hématoxyline et à l'éosine (HE) afin d'évaluer de manière qualitative et quantitative l'impact des particules sur la morphologie des voies aériennes (les scores sont détaillés dans le tableau 6). D'autres coupes de poumons ont été colorés aussi par le rouge sirius (Sigma aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) afin de rechercher d'éventuelles lésions fibrotiques. Des analyses immunohistochimiques ont également été réalisées à l'aide d'un anticorps anti-F4/80 (SP115; Abcam, Paris, France) et d'un anticorps secondaire conjugué à la peroxydase (Abcam) pour marquer les macrophages sur les coupes de poumons. Les lames ont été analysées à l'aveugle par un vétérinaire anatomopathologiste à l'aide d'un microscope optique Eclipse Ni équipé d'une caméra DS-Ri2 (Nikon, Amsterdam, Netherlands).

12. Analyse de la méthylation de l'ADN

(i) Mesure de l'activité de l'ADN méthyltransférase (DNMT)

Des extraits nucléaires ont été préparés à partir des tissus pulmonaires de souris à l'aide du kit « Nuclear extract Kit » (Active motif, La Hulpe, Belgique). L'activité de la DNMT a ensuite été mesurée à l'aide du kit « DNMT Activity / Inhibition Assay » (Active motif) suivant les recommandations du fournisseur.

(ii) Analyse de la méthylation globale de l'ADN

La méthylation globale de l'ADN extrait à partir du tissu pulmonaire a été dosée par méthode ELISA à l'aide du kit Imprint Methylated DNA Quantification (Sigma Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) suivant les recommandations du fournisseur.

13. Analyse des modifications des histones

Les histones ont été extraites à l'aide du kit Histone extraction (Active motif) et des modifications d'histones ont été analysées en utilisant le kit Histone H3 PTM Multiplex (Active motif) basé sur la technologie Luminex. Plusieurs modifications ont été ciblées : H3 total, H3K4me3, H3K9ac, H3K9me2, H3K9me3, H3K27ac, H3K27me2 et H3K27me.

14. Analyses transcriptomiques

(i) Extraction des ARN

Les poumons destinés aux analyses transcriptomiques ont été traités par du RNAlater™ (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) immédiatement après prélèvement, puis conservés à -20°C, selon les instructions du fournisseur. Vingt à trente mg de tissu pulmonaire ont été lysés dans 0,7 mL de QIAzol (Qiagen) à l'aide de l'homogénéiseur de tissu Gentlemacs Dissociator (Miltenyi Biotec, Paris, France). Les ARN totaux ont été ensuite extraits selon le protocole du kit miRNeasy mini (Qiagen) qui permet d'extraire en même temps les ARNm et les miARN. Ce protocole inclut une étape de digestion à la Dnase I permettant d'éliminer toute trace d'ADN génomique résiduel. Les ARN extraits ont été ensuite quantifiés par analyse spectrophotométrique à l'aide du Biospec Nano (Shimadzu), et leur qualité a été vérifiée par micro-électrophorèse capillaire sur le système Experion™ (Biorad, Marnes la Coquette, France).

(ii) RT-PCR quantitative en temps réel

La rétrotranscription (RT) des ARNm en ADNc a été réalisée avec le kit high capacity cDNA reverse transcription kit selon les instructions du fournisseur (Applied Biosystems). L'expression de gènes d'intérêt a été quantifiée par PCR (Polymerase Chain Reaction) quantitative en temps réel en utilisant des sondes et des amorces Taqman et le TaqMan Fast advanced Master MIX (Applied Biosystems). Les résultats sont rapportés par rapport à l'expression du gène de ménage PP1A (Mm02342430_g1).

(iii) Analyses transcriptomiques pangénomiques

Elles ont été réalisées par la technologie des microarrays, en collaboration avec la plateforme de génomique fonctionnelle du Centre de Biologie Pathologie du CHRU de Lille, à l'aide de lames 8x60k OneColor (Agilent Technologies, Les Ulis, France) couplées à des

oligonucléotides de 60-mer (028005 slides) couvrant l'ensemble du génome de la souris. Le marquage, l'hybridation, et la détection des ARNc sont réalisés selon les instructions du fabricant (Agilent Technologies). Pour chaque micropuce, les ARNc couplés à la Cyanine 3 sont synthétisés par le Kit Low input QuickAmp à partir de 50ng d'ARN total. Des ARN Spike-In ont été rajoutés à chaque tube et utilisés comme control positif de l'étape de marquage et de l'amplification. Les ARNc marqués ont été purifiés et 600ng de chaque ARNc ont été ensuite hybridés et lavés en suivant les instructions du fabricant. Les micropuces ont été scannées et les données ont été ensuite exportés par le logiciel « Agilent Feature Extraction Software© » (FE version 10.7.3.1). Les résultats ont ensuite été analysés au laboratoire.

L'analyse fonctionnelle des ARNm dérégulés au niveau pulmonaire chez les souris exposées a été abordée in silico en utilisant le logiciel Ingenuity Pathway Analysis - QIAGEN Bioinformatics qui permet d'établir des liens entre les gènes dérégulés en se basant sur les données de la littérature.

(iv) Analyse de l'expression des miARN

L'analyse de l'expression des miARN a été réalisée par OpenArrays avec le système QuantStudio 12K Flex (Applied Biosystems). Cette technique consiste à réaliser des RT-PCR quantitatives à très haut-débit avec la technologie Taqman sur des lames pouvant contenir jusqu'à 3 072 sondes. La transcription inverse des miARNs a été effectuée à partir de 100ng d'ARN total grâce au kit Megaplex™ RT Primers (Applied Biosystems). Une étape de préamplification a été réalisée avec le kit Megaplex™ PreAmp (Applied Biosystems). Enfin, les ADNc préamplifiés ont été dilués dans 156µL de Tampon TE (Tris EDTA) selon les recommandations du fabricant. L'expression de 754 miARN a été analysée sur des lames Taqman OpenArrays Rodent miRNA (Applied Biosystems) TaqMan™ OpenArray™ Real-Time PCR Master Mix. Pour les analyses statistiques, nous avons sélectionné les miARN dont l'expression était au moins significativement 2 fois supérieure ou 2 fois inférieure à celle des souris contrôles exposées à de l'HBSS ($p \leq 0,05$).

15. Analyse des voies de signalisation dérégulées par l'exposition aux PF ou PUF

Les échantillons de poumon congelés à sec ont été lysés dans un tampon RIPA contenant un cocktail d'inhibiteurs de protéases et de phosphatases (MS-SAFE Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail).

Les protéines ont été séparées par électrophorèse sur un gel NuPAGE 4-12 % Bis-Tris (Thermo Fisher Scientific, Courtaboeuf, France) et ensuite transférées sur une membrane en nitrocellulose en utilisant le système Trans-Blot Turbo Transfert System (Biorad). Les immunomarquages ont été réalisés en incubant les membranes avec les anticorps primaires spécifiques pendant la nuit à 4°C. Les anticorps suivants ont été utilisés : p-38 MAPK, p-GSK-3b, p-MAPKAPK, et p-MKK 3/6, ERK 42/44, p-ERK 42/44, pAkt thr308, pAkt ser473 c-fos et p-c-fos (Tableau 4). Les anticorps secondaires utilisés sont : le Mouse IgG HRP-conjugated Antibody ref. HAF007 (R&D Systems, Bio-Techne, Lille, France) et le Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Secondary Antibody [HRP] ref. NB7160 (Novus, Bio-Techne, Lille, France). Les membranes ont été ensuite incubées avec des anticorps secondaires conjugués à la peroxydase pendant une heure à température ambiante. Les bandes immunoréactives ont été visualisées par chimioluminescence à l'aide du réactif ECL prime/select (Sigma Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France).

Tableau 4. Anticorps primaires et secondaires utilisés dans les analyses par western blot

Anticorps	Référence
NF-κB	#8242
p-NF-κB	#3033
p-38 MAPK	#4511
p-GSK-3b	#5558
p-MAPKAPK	#3007
p-MKK 3/6	#12280
ERK 42/44	#9102S
p-ERK 42/44	#4370
p-Akt thr308	#13038
p-Akt ser473	#4060
c-fos	#4384
p-c-fos	#5348

16. Analyse fonctionnelle des miARN candidats

Des pré-miARN et des Anti-miARN (Antagomirs) (Applied Biosystems) correspondant aux miARN candidats ont été transfectées dans des cellules pulmonaires de souris LA-4 cultivées en plaques de 6 puits. A 70-80% de confluence, les puits ont été rincés avec 2 ml de milieu DMEM F12 contenant 1% de glutamax (Thermofisher Scientific). Les puits ont été ensuite placés dans 2 ml de ce même milieu. D'autre part, la lipofectamine RNAiMAX (Thermofisher Scientific) et les pré-miARN/Anti-miARN ont été dilués dans du milieu Opti-MEM et incubées 5 minutes à température ambiante. Ces 2 solutions ont ensuite été mélangées ensemble et incubées à température ambiante pendant 15 minutes puis ajoutés aux 2 ml de milieu DMEM F12 dans les plaques 6 puits pour une incubation de 30' à 1h à 37°C. Après incubation, le milieu a été éliminé et les cellules ont été rincées 2 fois au PBS puis placées dans 2ml d'Opti-MEM pour 24h. A l'issue de la transfection une analyse transcriptomique des cellules LA-4 a été réalisée en utilisant des microarrays 8x60k OneColor (Agilent Technologies, Les Ulis, France).

17. Analyses statistiques

Les groupes biologiques étant globalement constitués de 5 échantillons, ils ne suivent pas une loi Normale. Un test non paramétrique a été alors utilisé pour vérifier la significativité des résultats : le test de Mann-Whitney avec $p \leq 0,05$ pour comparer les groupes PUF par rapport aux groupes PF et les comparer par rapport aux groupes contrôles.

RESULTATS

1. Caractérisation physico-chimique des particules

L'analyse de la distribution granulométrique par DLS montre la présence d'un pic à 1265 ± 239 nm dans la solution de PF. Cependant, l'analyse des PUF montre une distribution bimodale avec 2 pics à $188,0 \pm 39,9$ nm et à 1078 ± 305 nm correspondant respectivement à la présence de PUF (71,9%) et à la formation d'agrégats de particules (28,1%) (Figure 22).

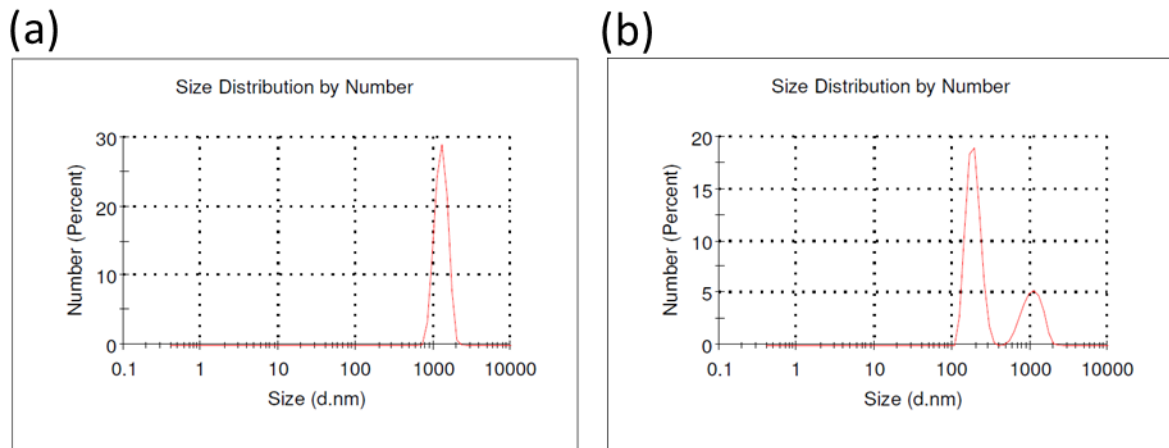


Figure 22 : Distribution en taille et en nombre de PF et PUF suspendues dans une solution d'HBSS. (a) Solution de PF ($n=3$). (b) Solution de PUF ($n=3$). L'analyse de la solution de PF montre la présence de particules ayant une taille de 1265 ± 239 nm. Par contre, 2 pics apparaissent dans l'analyse de la solution de PUF. Le premier correspond à la présence de particules ultrafines de 188.0 ± 39.9 nm. Le deuxième (1078 ± 305 nm) est associé à la formation d'agrégats dans la solution.

L'analyse de la concentration des éléments traces métalliques dans les solutions de PF et PUF montre une composition élémentaire avec quelques variations au niveau de la concentration de quelques éléments. Les PF contiennent des niveaux élevés de Mn et de Zn caractéristiques d'une influence industrielle, et comparables aux concentrations déjà mesurés sur le site urbano-industriel de Dunkerque [235,245–247]. La teneur en métaux des suspensions de PUF indique la présence de grandes quantités d'As, de Ni, de Pb et de V par rapport aux concentrations généralement mesurées dans la région Haut de France ; cela souligne, là encore, l'origine industrielle des particules ultrafines collectées. Une analyse de clustering hiérarchique réalisée à partir des données issues des échantillons de PUF a permis d'identifier 5 sources principales provenant d'activités industrielles (sidérurgie, transformation de métaux), du trafic routier, du trafic maritime et de la remise en suspension des sols (Figure 23).

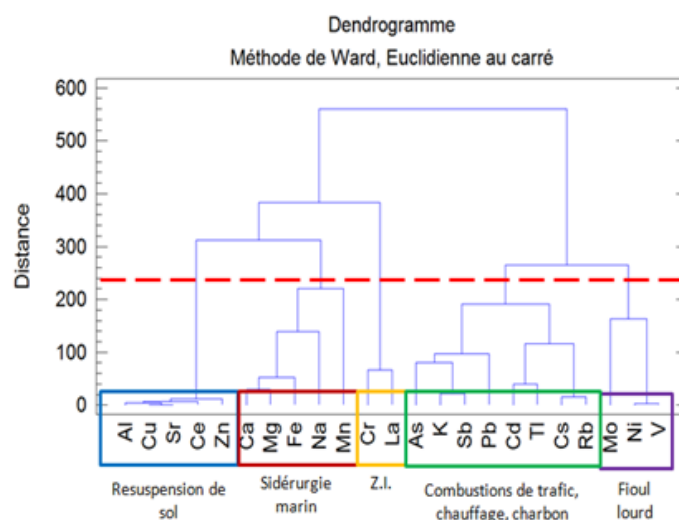


Figure 23 : Classification hiérarchique des sources de particules collectées sur le site urbano-industriel de Grande-Synthe.

Il faut noter que les éléments Na, Mg et K n'ont pas été pris en compte dans l'analyse de la composition des PUF car ces éléments étaient initialement présents à une concentration élevée dans le tampon HBSS (Tableau 5). Il est intéressant aussi de noter que les concentrations de HAP semblent être similaires entre les échantillons de PF et de PUF avec une légère augmentation (10%) de leur quantité totale dans les échantillons de PF. En particulier, la quantité de BeP est près de 10 fois supérieure dans les PF (Tableau 6).

Tableau 5. Composition élémentaire des PF et PUF quantifiée par ICP-MS (n=3)

*valeur non pris en compte dans l'analyse à cause de leur forte teneur dans l'HBSS

Element ($\mu\text{g/g}$)	PF	PUF	Element ($\mu\text{g/g}$)	PF	PUF
As	23,0	64,8	Sb	47,1	49,3
Ba	140,3	64,4	Sn	49,6	111,1
Be	0,4	0,3	Sr	91,8	49,3
Cd	16,9	19,3	Ti	3,0	5,7
Ce	8,5	6,3	Zn	4000,2	2460,7
Co	5,4	9,3	Cr	97,3	120,7
Cs	4,4	8,9	V	75,0	196,3
Cu	367,0	425,2	Al	5252,2	3621,1
La	8,4	3,1	Ca	17904,5	11857,4
Mn	1350,4	582,2	Fe	16406,1	10267,0
Mo	25,6	36,7	K	1240,3	30368*
Ni	98,7	199,7	Mg	6591,3	6344,8*
Pb	399,4	541,9	Na	43510,8	283147*
Rb	26,3	44,1	Si	9383,5	7568,1

Tableau 6, Quantification de la composition en HAP des PF et PUF par HPLC (n=3)

PAH (ng/mg)	PF	PUF
Fluoranthene (FLA)	5,1	4,3
Pyrene (PYR)	4,2	3,7
Benzo(c)phenanthrene (BcPHE)	0,4	0,2
Benzo(a)anthracene (BaA)	6,9	4,2
Chrysene (CHR)	6,8	2,8
5-Methylchrysene (5MCHR)	1,1	3,4
Benzo(e)pyrene (BeP)	9,9	0,8
Benzo(b)fluoranthene (BbF)	7,6	8,0
Benzo(j)fluoranthene (BjF)	4,7	9,9
Benzo(k)fluoranthene (BkF)	7,4	4,6
Benzo(a)pyrene (BaP)	3,8	5,3
Dibenzo(a,l)pyrene (DaIP)	0,8	0,4
Dibenzo(a,h)anthracene (DahA)	2,6	1,5
Benzo(g,h,i)perylene (BghiP)	12,0	12,5
Indeno(1,2,3-c,d)pyrene (IP)	14,0	12,1
Dibenzo(a,e)pyrene (DaeP)	3,6	2,7
Anthanthrene (ANTH)	0,1	3,3
Coronene (COR)	2,9	4,5
Total	94,0	84,0

2. Internalisation des PF et PUF dans les poumons des souris

Nous avons observé des agrégats de particules dans le cytoplasme des macrophages présents dans le LBA des souris exposées aux PUF et PF. Ces observations confirment que les particules administrées par voie intranasale ont été efficacement délivrées dans les poumons des souris. Dans l'exposition aiguë, le nombre de macrophages contenant des particules dans leur cytoplasme augmente d'une manière dose-dépendante. Après 1 mois et 3 mois d'exposition, le nombre de macrophages augmente avec le temps d'une manière significative, Cette augmentation est plus importante chez les souris exposées aux PUF (Figure 24, a). De plus, les macrophages contenant des particules dans leur cytoplasme ont été aussi observés dans les coupes histologiques des poumons souris, confirmant les résultats obtenus dans le LBA (Figure 24, b).

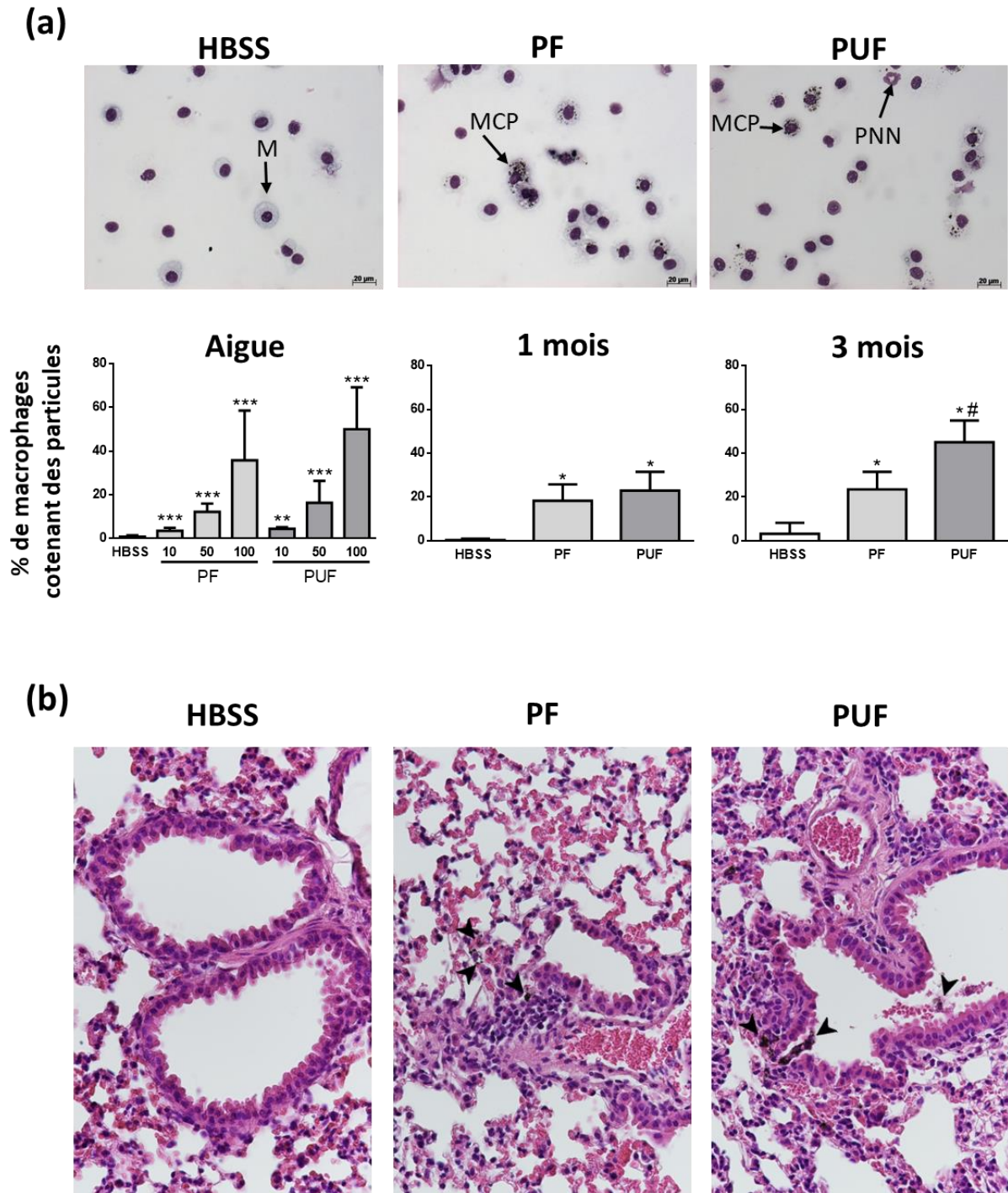


Figure 24 : Internalisation des particules dans les poumons. (a) photos représentant les cellules présentes dans le LBA des souris et histogramme montrant le comptage des macrophages contenant des particules dans le LBA. M = macrophage, MCP = macrophages contenant des particules, PNN = polynucléaires neutrophiles. (b) Photos représentant les coupes histologiques des poumons de souris (40 x) ; les flèches indiquent les MCP. * $p \leq 0,05$ vs Control ; ** $p \leq 0,01$ vs Control ; *** $p \leq 0,001$ vs Control ; # $p \leq 0,05$ vs PF.

L'internalisation des particules a été aussi mis en évidence par la quantification de l'expression des gènes *Cyp1a1* et *Cyp1b1* dans les poumons des souris. Ces gènes sont connus pour être inductibles par les HAP, notamment ceux qu'on peut retrouver adsorbés à la surface

des PM, et jouer un rôle majeur dans le métabolisme de ces composés cancérigènes. Pour les expositions aiguës, l'expression de *Cyp1a1* et *Cyp1b1* augmente d'une manière significative chez les souris exposées à des doses de 100µg de PF ou PUF. Au cours des expositions sub-chroniques, l'expression pulmonaire de *Cyp1a1* augmente aussi après exposition pendant 1 mois et 3 mois aux PF ou PUF ; cependant, cette augmentation est plus significative pour le groupe de souris exposées aux PF. Concernant *Cyp1b1*, son expression n'augmente qu'après 3 mois d'exposition aux particules (**Figure 25**).

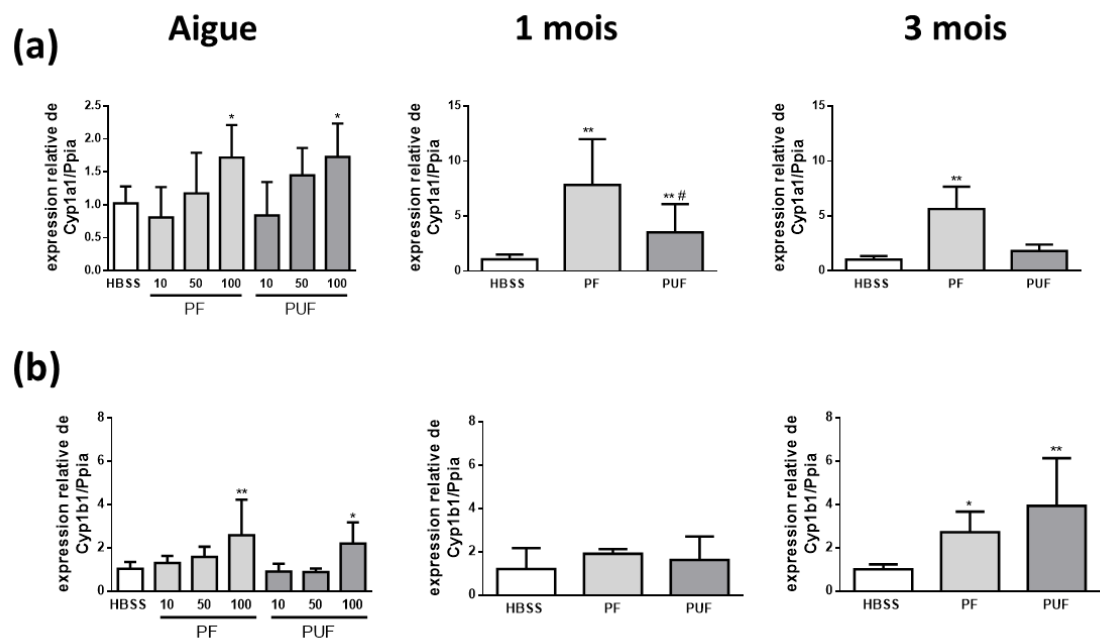


Figure 25 : Expression génique de *Cyp1a1* (a) et *Cyp1b1* (b) dans les poumons des souris exposées pendant 24h, 1 mois et 3 mois aux PF ou PUF ; n=5 par condition ; *p ≤ 0,05 vs Control ; **p ≤ 0,01 vs Control ; #p ≤ 0,05 vs PF.

3. Analyse de la génotoxicité des particules

(i) Exposition aiguë

Les résultats des tests des comètes sont présentés dans la Figure 26. Dans nos conditions expérimentales, les PF et PUF n'induisent pas de lésions primaires de l'ADN sur cellules isolées de poumon et de foie après 2 administrations à 24h d'intervalle de 100 µg de

particules. Les PF et PUF sont donc considérées comme n'ayant pas d'activité génotoxique sur ces organes chez la souris.

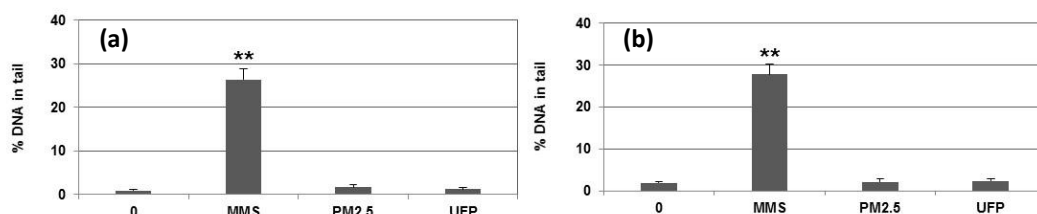
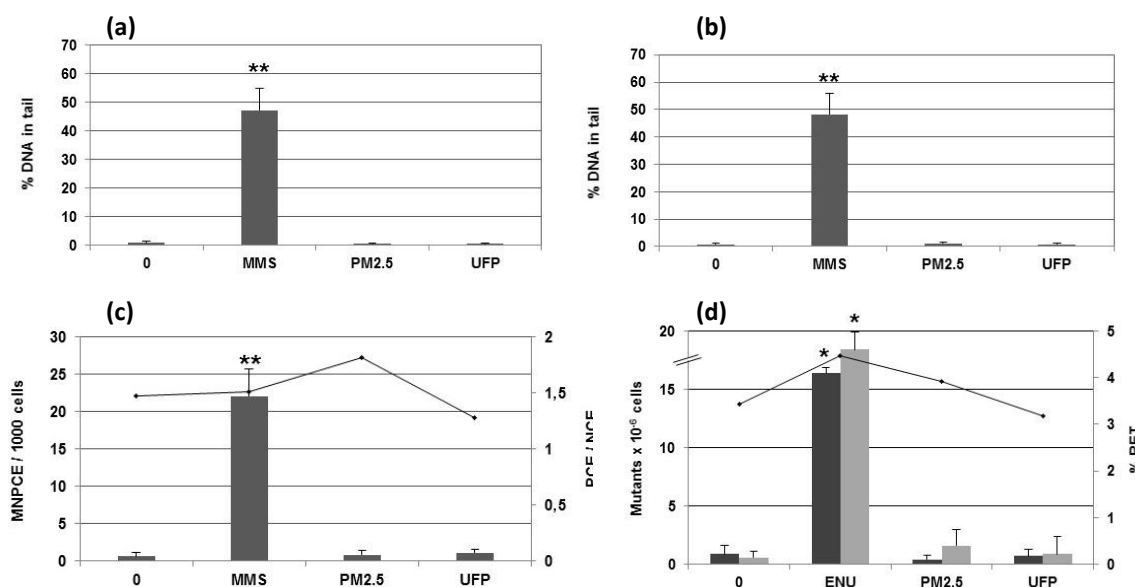


Figure 26 : Tests de génotoxicité in vivo après exposition aiguë. (a) Test des comètes sur le foie. (b) Test des comètes sur le poumon. $PM_{2,5}=PF$; groupe contrôle positif traité par MMS: Methyl-methane Sulfonate [(100 mg/kg/day) x 2] ; % DNA in tail : % d'ADN dans la queue (% de fragmentation de l'ADN) ; ** $p < 0,01$ (Mann-Whitney).

(ii) Exposition subchronique de 1 mois

Les résultats des tests des comètes, du micronoyau et Pig-A sont présentés dans la Figure 27. Après exposition de 1 mois, les PF et PUF n'induisent pas d'augmentation biologiquement et/ou statistiquement significative de la fragmentation de l'ADN sur les cellules de poumon et de foie (test des comètes), de la fréquence d'aberrations chromosomiques (test du micronoyau) et de la fréquence de mutations géniques (test Pig-A)



chez les souris exposées.

Figure 27 : Tests de génotoxicité in vivo après 1 mois d'exposition ; (a) Test des comètes sur le foie. (b) Test des comètes sur le poumon. (c) Test du micronoyau sur moelle osseuse. (d) Test de mutation génique in vivo (test Pig-A) sur sang. $PM_{2,5} = PF$; groupe contrôle positif traité par MMS: Methylmethane Sulfonate [(100 mg/kg/day) x 2] ; groupe contrôle positif traité par ENU: Ethyl nitroso urée [(40 mg/kg/day) x 3] ; % DNA in tail : % d'ADN dans la queue ; MNPCE/1000 cells : Nombre de micronoyau dans les érythrocytes polychromatiques / 1000 cellules analysées ; PCE/NCE : nombre d'érythrocytes polychromatiques / nombre d'érythrocytes normochromatiques ; % RET : % de réticulocytes ; ** $p < 0,01$ (Mann-Whitney) ; * $p < 0,05$ (Dunnett).

(iii) Exposition subchronique de 3 mois

Les résultats des tests du micronoyau et Pig-A sont présentés dans la Figure 28. Comme précédemment, après exposition de 3 mois, les PF et PUF n'induisent pas d'augmentation biologiquement et/ou statistiquement significative de la fréquence d'aberrations chromosomiques (test du micronoyau) ni de la fréquence de mutations géniques (test Pig-A) chez la souris.

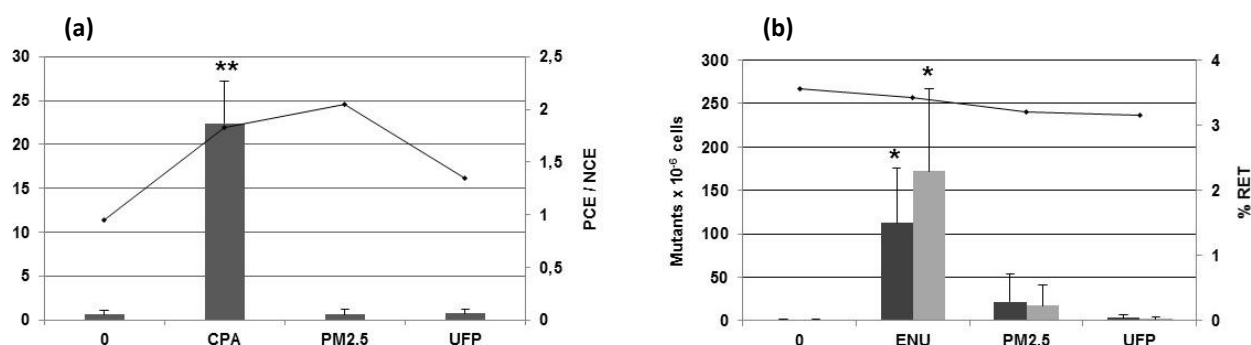


Figure 28 : Tests de génotoxicité *in vivo* après 3 mois d'exposition. (a) Test du micronoyau sur moelle osseuse. (b) Test de mutation génique (Pig-A) sur sang. PM_{2,5} = PF; groupe contrôle positif traité par CPA: Cyclophosphamide [(50 mg/kg/day) x 1]; groupe contrôle positif traité par ENU: Ethyl nitroso urée [(40 mg/kg/day) x 3]; MNPCE/1000 cells : Nombre de micronoyau dans les érythrocytes polychromatiques / 1000 cellules analysées ; PCE/NCE : nombre d'érythrocytes polychromatiques / nombre d'érythrocytes normochromatiques ; % RET: % de réticulocytes ; ** $p < 0,01$ (Mann-Whitney) ; * $p < 0,05$ (Dunnet).

4. Evaluation du stress oxydant dans les poumons des souris

L'expression génique de gènes liés au stress oxydant a été d'abord quantifiée par qPCR (*Nqo1*, *Nrf2*, et *Ho-1*) ; les résultats sont présentés dans le tableau 7. Aucun effet de l'exposition aux particules sur l'expression des gènes *Nrf2* et *Ho-1* n'a été observé après 24h, 1 mois ou 3 mois d'exposition. Cependant, nous avons observé une augmentation significative de l'expression de *Nqo1* que dans le groupe de souris exposées aux PF après 1 mois et 3 mois d'exposition.

Tableau 7. L'expression génique de *Nqo1*, *Nrf2* et *Ho-1* dans les poumons des souris exposées aux PF ou PUF après 24h, 1 mois et 3 mois d'exposition, ** $p \leq 0,01$.

	Exposition aigüe					
	PF 10 µg	PF 50 µg	PF 100 µg	PUF 10 µg	PUF 50 µg	PUF 100 µg
<i>Nqo1</i>	1,2 ± 0,3	1,0 ± 0,1	0,9 ± 0,2	1,0 ± 0,2	0,9 ± 0,1	1,0 ± 0,1
<i>Nrf2</i>	0,8 ± 0,3	0,8 ± 0,4	0,7 ± 0,1	1,0 ± 0,3	1,2 ± 0,4	0,7 ± 0,2
<i>Ho-1</i>	0,7 ± 0,1	0,7 ± 0,3	1,3 ± 0,4	1,1 ± 0,3	1,5 ± 0,6	1,3 ± 0,5
	1 mois			3 mois		
	PF 10 µg	PUF 10 µg		PF 10 µg	PUF 10 µg	
<i>Nqo1</i>	1,5 ± 0,2**	1,3 ± 0,4		2,0 ± 0,3**	1,7 ± 0,8	
<i>Nrf2</i>	1,2 ± 0,4	0,9 ± 0,2		1,3 ± 0,2	1,6 ± 0,5	
<i>Ho-1</i>	1,0 ± 0,2	0,8 ± 0,2		1,2 ± 0,7	1,4 ± 0,4	

Ensuite, un marqueur de dommages à l'ADN par oxydation, la 8-OHdG, a été quantifié dans les poumons des souris à l'aide d'un kit ELISA compétitif. Pour l'exposition aiguë, aucun changement significatif n'a été observé chez les souris exposées aux PF. Cependant, une légère augmentation a été observée dans les poumons des souris exposées aux PUF. Les résultats n'étaient significatifs que pour les doses de PUF de 10 µg et de 50 µg. Aucun effet sur le taux de 8-OHdG n'a été observé après une exposition d'1 mois aux PF ou aux PUF. En revanche, une augmentation légèrement significative a été détectée chez les souris exposées aux PUF pendant 3 mois (Figure 29).

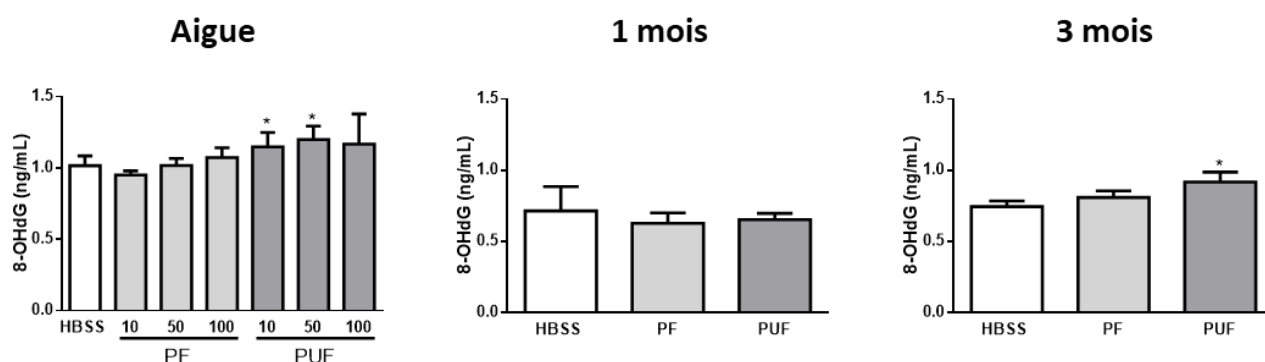


Figure 29 : Quantification du taux de 8-OHdG par ELISA compétitive dans les poumons des souris exposées pendant 24h, 1 mois et 3 mois aux PF ou PUF ; n=5 par condition ; *p ≤ 0,05 vs Contrôle.

5. Analyse de l'inflammation dans le LBA

Le comptage des cellules du LBA est couramment utilisé pour le diagnostic de l'inflammation dans les poumons et les maladies pulmonaires. Dans l'exposition aiguë, les résultats du comptage cellulaire dans le LBA des souris ne montre aucun effet des particules sur le nombre total des cellules ni sur le nombre de macrophages alvéolaires. Par contre, nous avons observé une augmentation dose-dépendante du nombre de polynucléaires neutrophiles après 24h d'exposition. En ce qui concerne les expositions sub-chroniques de 1 mois et de 3 mois, nous avons observé une augmentation du nombre total de cellules dans le LBA de souris exposées aux PF ou PUF. Cette augmentation est corrélée à une augmentation du nombre de macrophages dans les LBA. De plus, comparés aux souris exposées aux PF, les effets observés sont plus importants chez les souris exposées aux PUF. Le nombre de PNN semble ne pas être influencé dans les expositions sub-chroniques (Figure 30).

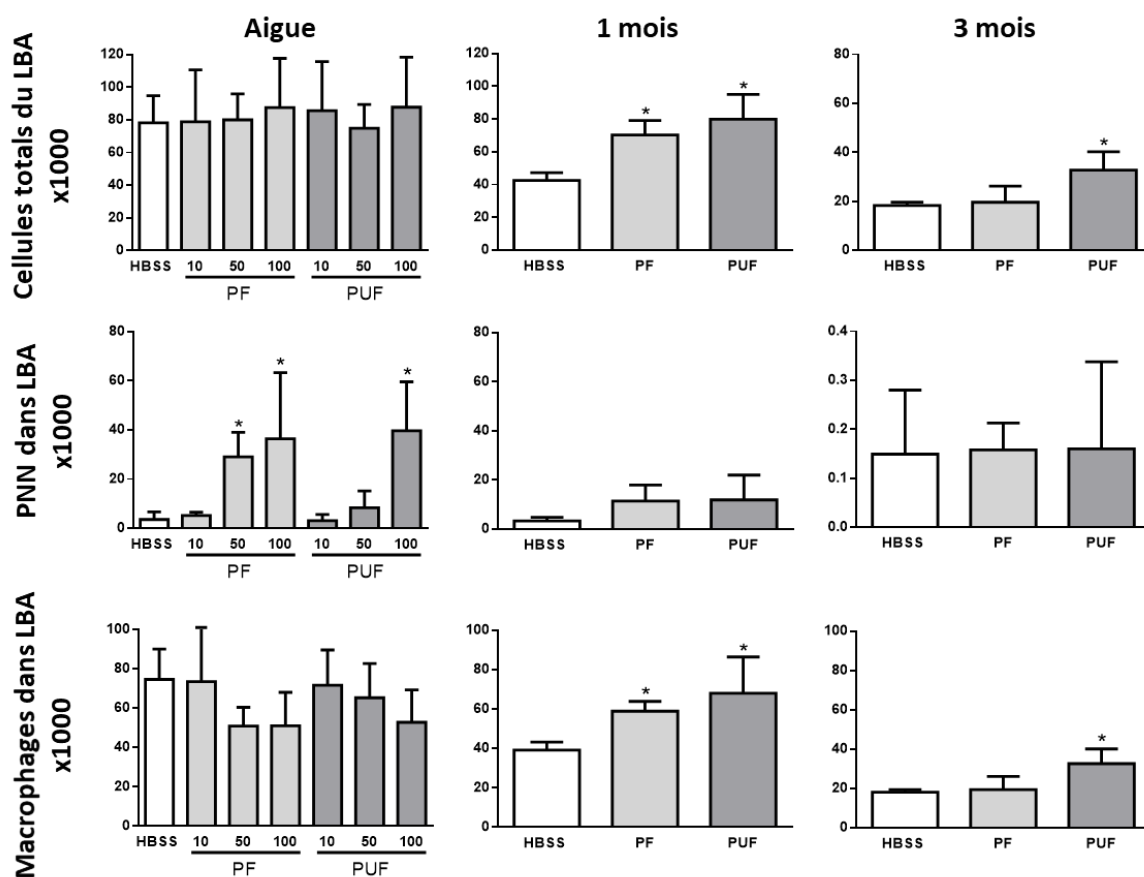


Figure 30 : Analyse de la réponse inflammatoire dans le LBA des souris exposées aux PF et PUF. Histogrammes montrant le comptage cellulaire des LBA des souris exposées aux PF ou PUF après 24h, 1 mois ou 3 mois d'exposition : cellularité totale du LBA, nombre total de PNN et nombre total de macrophages dans le LBA ; n=5 par condition ; *p ≤ 0,05 vs Contrôle.

Un ensemble de cytokines a été sélectionné (*il-6*, *il-1b*, et *il-10*) pour évaluer la réponse inflammatoire dans les poumons des souris exposées. L'expression génique pulmonaire de ces cytokines a été quantifiée par RT-qPCR. Après 24h d'exposition, nous avons remarqué une augmentation significative de l'expression génique d'*il-6* chez les souris exposées à 100 µg de PUF. Après 1 mois d'exposition, *il-6* diminue chez les souris exposées aux PF ou PUF et aucun effet n'a été observé sur les autres cytokines. Cependant, après 3 mois d'exposition, l'expression d'*il-6* et d'*il-10* augmente chez les souris exposées aux PUF (Tableau 8). Nous avons en parallèle essayé de quantifier l'expression protéique de ces cytokines dans le LBA et les poumons des souris à l'aide de différentes méthodes (tests ELISA et Luminex). Cependant, nous n'avons pas réussi à obtenir des résultats exploitables, en particulier chez les souris exposées aux PUF. En effet, il a été décrit précédemment que les interactions entre les particules, notamment les particules ultrafines, et certaines cytokines pouvaient créer des

artéfacts non biologiques, gênant la quantification de ces cytokines dans des échantillons biologiques [248,249].

Tableau 8, L'expression génique d'*il-6*, *il-1b* et *il-10* dans les poumons des souris exposées aux PF ou PUF après 24h, 1 mois et 3 mois d'exposition. * $p \leq 0,05$.

	Exposition aigüe					
	PF 10	PF 50	PF 100	PUF 10	PUF 50	PUF 100
<i>Il-6</i>	2,3 ± 2,5	1,3 ± 1,1	1,7 ± 1,9	1,8 ± 0,9	2,7 ± 1,9	6,1 ± 4,1 *
<i>Il-1b</i>	0,7 ± 0,3	1,0 ± 0,3	0,8 ± 0,1	1,3 ± 0,2	1,7 ± 0,8	2,7 ± 1,2
<i>Il-10</i>	1,1 ± 0,6	1,6 ± 0,5	1,0 ± 0,4	1,0 ± 0,7	1,6 ± 0,6	1,7 ± 0,8
	1 mois		3 mois			
	PF 10	PUF 10	PF 10	PUF 10		
<i>Il-6</i>	0,4 ± 0,2 **	0,4 ± 0,1 *	2,5 ± 1,6	7,8 ± 2,9 *		
<i>Il-1b</i>	1,1 ± 0,6	0,9 ± 0,2	0,7 ± 0,1	1,0 ± 0,3		
<i>Il-10</i>	0,4 ± 0,2	0,5 ± 0,1	2,2 ± 1,9	3,9 ± 1,0 *		

6. Remodelage tissulaire des poumons

Dans le but d'évaluer l'impact des particules sur la réponse inflammatoire des poumons, nous avons effectué une analyse morphométrique des coupes histologiques provenant des poumons des souris exposées pendant 1 mois et 3 mois aux PF ou aux PUF. Des foyers inflammatoires et des lésions tissulaires ont été observés dans les régions péri-bronchiques et alvéolaires (Figure 31). Cependant, la distribution de ces lésions varie en fonction de la taille des particules administrées. Les lésions observées dans les poumons occupent presque 8% et 18% de la surface pulmonaire globale chez les souris exposées aux PF ou PUF pendant 1 mois, respectivement. Pour les expositions de 3 mois, les lésions atteignent respectivement 35% et 47% de la surface globale des poumons chez les souris exposées aux PF et PUF (Tableau 9). Les zones lésées sont constituées de régions kystiques caractérisés par des élargissements des espaces aériens dans certains loci (plus marqués chez les souris exposées aux PUF pendant 3 mois) et des épaissements des parois alvéolaires de 7 à 14 μm chez les souris exposées pendant 1 mois aux particules, et de 12 à 20 μm chez les groupes exposés pendant 3 mois. La coloration rouge Sirius des coupes histologiques des poumons n'a pas détecté la présence de fibres de collagènes dans les zones lésées ce qui suggère l'absence de lésions fibrotiques à ce stade d'exposition.

Tableau 9. Récapitulatif des modifications histologiques pulmonaires observées après exposition sub-chronique de 1 mois et de 3 mois aux particules. Scores d'évaluation de l'inflammation péri-bronchique et des lésions kystiques : aucun = 0, léger = 1, modéré = 2, marqué = 3, sévère = 4, Les macrophages totaux ont été comptés dans 10 champs de forte puissance (CFP) pour chaque souris. L'épaississement des parois alvéolaires a été évalué en comparant l'épaisseur de la paroi des alvéoles à la taille d'un érythrocyte (E) : <1 E =0; 1 to 2 E =1; 3 to 5 E =2; 6 to 10 E =3; and >10 E =4. Le pourcentage des surfaces lésées représente la distribution de la surface de parenchyme épaissi par rapport à la surface totale du poumon. CFP : champs de forte puissance = 400.

	1 mois			3 mois		
	HBSS	PF	PUF	HBSS	PF	PUF
Inflammation péri-bronchique	0 ± 0	0,7 ± 0,6	0,7 ± 0,6	0 ± 0	1 ± 0,0	1,7 ± 0,6
Macrophages totaux/10 CFP	45,3 ± 16,3	275 ± 81,8	342,7 ± 74,4	53 ± 12,0	211 ± 122,7	500 ± 213,7
Lésions kystiques	0 ± 0	1,3 ± 0,6	0,7 ± 0,6	0 ± 0	1,3 ± 0,6	1,7 ± 0,6
Epaississement des parois alvéolaires	0,7 ± 0,6	1,7 ± 0,6	1,7 ± 0,6	1,0 ± 0	1,7 ± 0,6	2,3 ± 0,6
Surface parenchymateuse lésée (mm²)	0,6 ± 0,8	5,5 ± 1,0	9,8 ± 2,0	1,8 ± 0,8	21,9 ± 9,0	28,3 ± 3,8
Surface totale des poumons (mm²)	78,3 ± 4,3	66,3 ± 9,1	56,5 ± 8,4	64,8 ± 7,7	68,3 ± 14,0	61,7 ± 14,1
Pourcentage des surfaces lésées	0,8 ± 0,9	8,3 ± 0,4	18 ± 6,6	2,7 ± 0,9	35 ± 21,2	47,3 ± 11,5

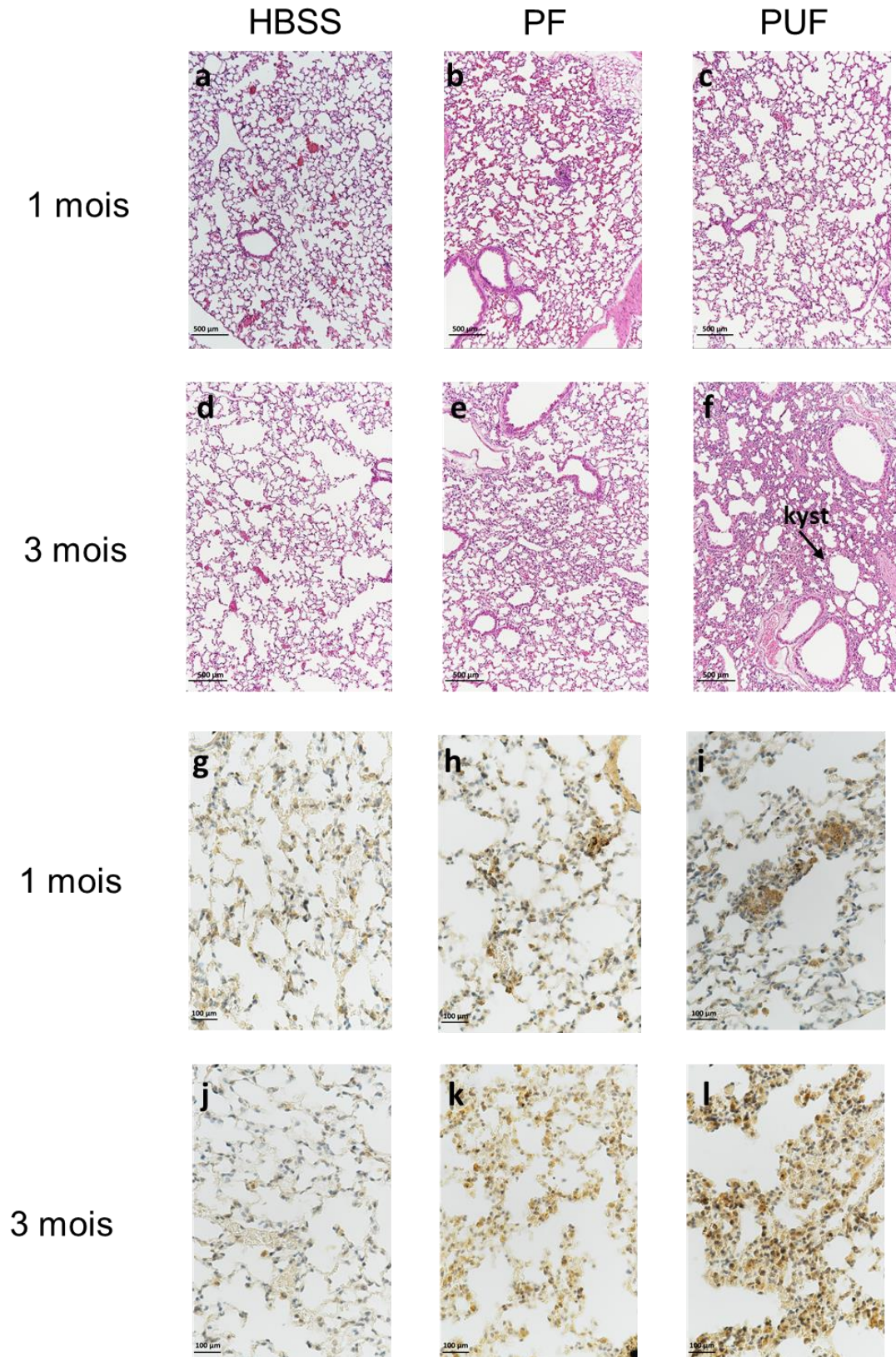


Figure 31 : remodelage tissulaire des poumons après exposition de 1 mois et 3 mois aux PF et PUF. (a-f) Coupes histologiques pulmonaires (coloration hématoxyline-éosine) montrant l'épaississement de la paroi alvéolaire dans les poumons des souris ; Kyst : lésions kystiques ; grossissement 10 x. (g-l) Marquage immunohistochimique des coupes avec l'anticorps F4/80 (les macrophages sont colorés en marron) ; grossissement 40 x.

Le marquage immunologique des coupes histologiques avec l'anticorps F4/80 confirme que les épaissements alvéolaires observés sont dus à une infiltration de macrophages (Figure 31). En effet, les macrophages présents dans les poumons des souris exposées aux PUF sont beaucoup plus nombreux que ceux présents dans les poumons des souris exposées aux PF après 1 mois d'exposition. Pour les expositions de 3 mois, le nombre de macrophages dans les zones lésées avait tendance à diminuer chez les souris exposées aux PF, mais il continué d'augmenter d'une manière importante chez les souris exposées aux PUF (Tableau 9).

7. Modifications épigénétiques dues à l'exposition aux PF et PUF

Dans le but d'élucider les mécanismes à l'origine des effets toxiques des PF et PUF, nous avons décidé d'évaluer les altérations épigénétiques pulmonaires secondaires à l'exposition à ces particules. En effet, l'étude des effets épigénétiques pourrait permettre en partie d'expliquer les mécanismes moléculaires à l'origine des effets observés au niveau histologique dans les poumons.

(i) Méthylation de l'ADN

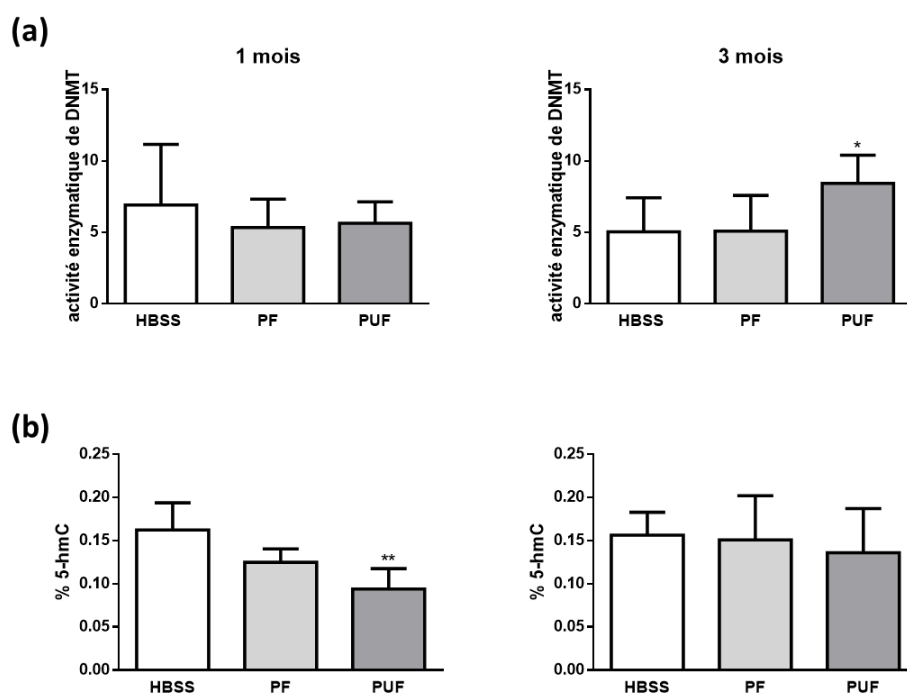


Figure 32 : (a) Activité enzymatique de la DNMT et (b) pourcentage du taux de méthylation globale de l'ADN dans les poumons des souris exposées pendant 1 mois ou 3 mois aux PF ou PUF ; n=5 par condition ; *p ≤ 0,05 vs Contrôle.

Une quantification de l'activité enzymatique de l'ADN méthyltransférase (DNMT) dans les poumons de souris a été d'abord effectuée. Aucun effet n'a été observé après 1 mois d'exposition des souris aux PF ou PUF. Cependant, une augmentation significative de l'activité enzymatique de la DNMT a été détectée après 3 mois chez les souris exposées aux PUF (Figure 32, a). Au vu de ces résultats, nous avons décidé de mesurer le taux de méthylation globale de l'ADN dans les poumons. Contrairement à ce qui était attendu, l'analyse des résultats de cette expérience montre une diminution significative de la méthylation globale de l'ADN chez les souris exposées aux PUF pendant 1 mois, mais aucune différence significative entre les souris exposées et les souris témoins après 3 mois d'exposition (Figure 32, b).

(ii) Modifications d'histones

Des modifications des histone H3 ont été quantifiées dans les poumons des souris exposées. Une diminution significative de la méthylation des histones H3K4me3 et H3K27me3, et de l'acétylation des histones H3K9ac et H3K27ac a été mesurée chez les souris exposées aux PF pendant 3 mois. L'exposition des souris aux PUF pendant 1 mois a été à l'origine d'une légère augmentation de la méthylation de l'histone H3K27me2 ; cependant, après 3 mois d'exposition à ces particules, seule une importante diminution de l'acétylation de l'histone H3K27ac a été observée (Figure 33).

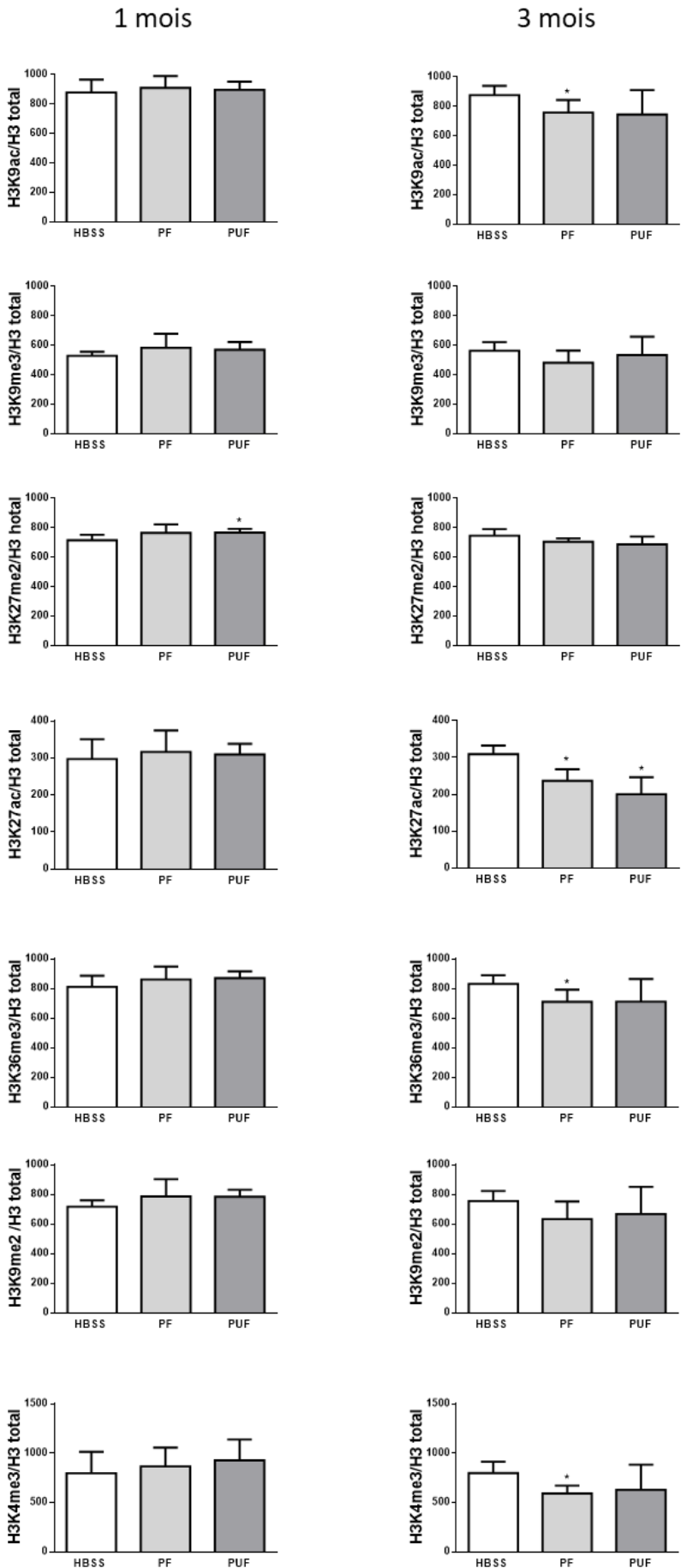


Figure 33 : Modifications d'histones induites par l'exposition des souris aux PF ou PUF pendant 1 mois ou 3 mois.

7 modifications d'histone H3 ont été mesurées par rapport à H3 totale : H3K9ac, H3K9me3, H3K27me2, H3K27ac, H3K36me3, H3K9me2, H3K4me3.

(iii) Dérégulation de l'expression des miARN

Nous avons déterminé le profil d'expression pulmonaire de 754 miARN par la méthode des Openarrays. Dans le Tableau 10 est répertorié, pour chaque type de particules et chaque protocole d'exposition, le nombre de miARN dont l'expression pulmonaire est significativement dérégulée d'un facteur supérieur à 2 ($p < 0,05$) par rapport aux souris contrôles.

Tableau 10. Nombre de gènes dont l'expression pulmonaire est significativement dérégulée d'un facteur supérieur à 2 ($p < 0,05$) chez les souris exposées ux PF ou aux PUF par rapport aux souris contrôles (HBSS). Pour chaque lot de souris, $n = 5$.

	Expositions	Aiguë			1 mois	3 mois
		10 µg	50 µg	100 µg		
PF	miARN dérégulés	23	28	24	2	8
	Sous-exprimés	13	1	6	0	4
	Surexprimés	10	27	18	2	4
PUF	miARN dérégulés	56	25	35	8	10
	Sous-exprimés	1	1	0	0	5
	Surexprimés	55	24	35	8	5

Les résultats montrent que quel que soit le type de particule, le nombre de miARN dérégulés est beaucoup plus important dans le cadre du protocole d'exposition aiguë. Le nombre de miARN dérégulés se limite à une dizaine après expositions de 1 et 3 mois. Par ailleurs, le nombre de miARN dérégulés est plus important chez les souris exposées aux PUF que chez les souris exposées aux PF pour les expositions aiguë et subchronique de 1 mois. Le nombre de miARN dérégulés devient équivalent entre les souris exposées aux PUF et aux PF après 3 mois d'exposition.

Parmi les miARN montrant les différentiels d'expression les plus importants au cours des expositions subchroniques, cinq candidats ont été sélectionnés pour établir leur(s) lien(s) avec les ARNm dérégulés par les expositions aux PF et aux PUF.

8. Analyses transcriptomiques

Dans le but de mieux comprendre les mécanismes et les voies de signalisation dérégulés suite à l'exposition aux PF et PUF, nous avons analysé par microarrays le profil d'expression global des ARN dans les poumons des souris. Les résultats ont été ensuite analysés par le logiciel IPA (Ingenuity pathway analysis) pour établir des liens entre les gènes dérégulés et découvrir les mécanismes le plus touchés par l'exposition aux particules.

(i) Exposition aiguë

Dans le Tableau 11 est répertorié, pour l'exposition aiguë des souris aux 3 doses de PF ou PUF, le nombre de gènes dont l'expression pulmonaire est significativement dérégulée d'un facteur supérieur à 2 ($p < 0,05$) par rapport aux souris contrôles.

Dans un premier temps, nous avons constaté que, pour les deux types de particules, le nombre de gènes dérégulés croît avec la dose. Nous avons remarqué aussi que les gènes dérégulés sont plus nombreux chez les souris exposées aux PUF comparées à celles exposées aux PF.

Tableau 11. Nombre de gènes dont l'expression pulmonaire est significativement dérégulée d'un facteur supérieur à 2 ($p < 0,05$) chez les souris exposées aux PF ou aux PUF pendant 24h par rapport aux souris contrôles (HBSS). Pour chaque lot de souris, $n = 5$.

Expositions		Aiguë		
		10 µg	50 µg	100 µg
PF	Gènes dérégulés	0	7	19
	Sous-exprimés	0	5	11
	Surexprimés	0	2	8
PUF	Gènes dérégulés	33	26	39
	Sous-exprimés	18	14	17
	Surexprimés	15	12	22

L'analyse par le logiciel IPA a montré que les gènes les plus significativement impactés par l'exposition aux particules correspondent à des mécanismes liés au cycle circadien. La dérégulation de ces gènes était d'autant plus élevée que la dose administrée de PF ou de PUF était plus forte, d'une part, et que la taille des particules était plus faible, d'autre part. Même si dans la littérature un lien entre le cycle circadien et la réponse inflammatoire pulmonaire suite à une exposition environnementale avait été décrit [250], il nous a semblé opportun de renouveler l'exposition aiguë des souris puisque l'effet dose observé semblait également corrélé avec l'ordre chronologique de sacrifice des souris. Pour cela, une seconde exposition aiguë a été donc reproduite dans les mêmes conditions expérimentales que la première, mais, cette fois, l'ordre de sacrifice des souris a été randomisé. Nous avons ensuite sélectionné certains gènes parmi ceux qui étaient dérégulés et liés au cycle circadien (*Nr1d1*, *Arntl*, et *Per2*) et nous avons comparé leur expression dans les poumons des souris entre les 2 expériences d'exposition aiguë aux particules : aiguë 1 (ordre de sacrifices non randomisés) et aiguë 2 (ordre de sacrifices randomisés) (Figure 34).

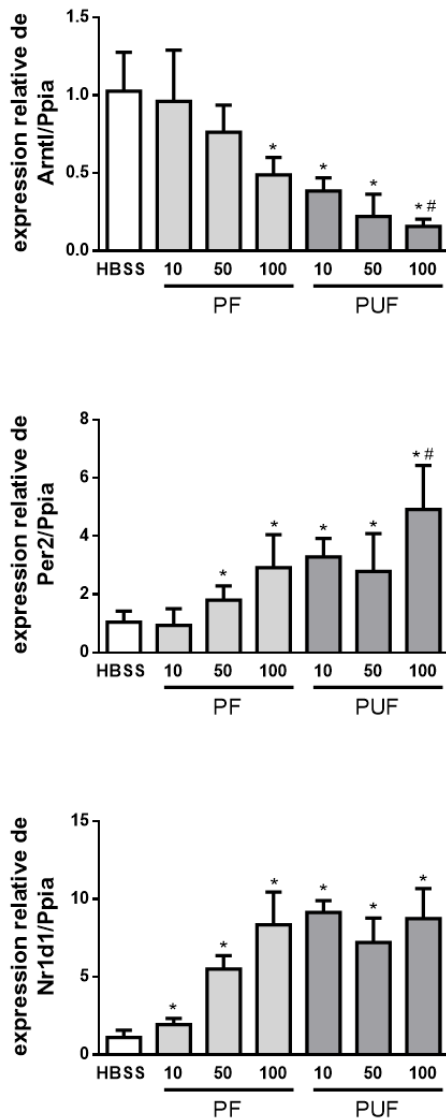
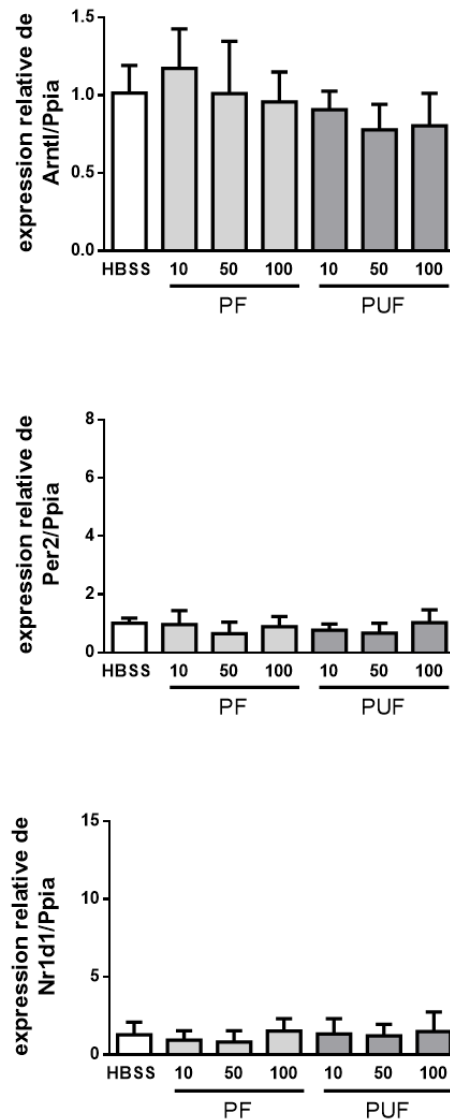
(a)**Aiguë 1****(b)****Aiguë 2**

Figure 34 : Comparaison de l'expression génique de *Nr1d1*, *Arntl*, et *Per2* entre les 2 expériences d'exposition aiguë : (a) aiguë 1 et (b) aiguë 2. Expression génique exprimée en fold-change par rapport au groupe contrôle de souris exposées à de l'HBSS pour les 2 séries d'exposition ; ($n = 5$ par groupe) * $p \leq 0,05$ contre l'exposition à l'HBSS ; # contre l'exposition aux PF.

La comparaison des deux expériences d'exposition aiguë montre que l'effet que nous avons observé chez les souris de l'exposition aiguë 1 n'était dû qu'à l'ordre chronologique des sacrifices (Figure 34, a). Cet effet disparaît après avoir randomisé l'ordre de sacrifice dans la deuxième série d'exposition aiguë (Figure 34, b). Ces résultats suggèrent que les PF et PUF n'ont pas d'effets sur le cycle circadien chez les souris dans les conditions expérimentales testés.

(ii) Exposition sub-chroniques de 1 mois et de 3 mois

Au vu des résultats obtenus lors des expositions aiguës, une attention a été portée sur l'ordre de sacrifice des souris des expositions sub-chroniques de 1 mois et de 3 mois pour éviter les effets dues à l'ordre chronologique de sacrifices. Dans le tableau 12 est répertorié, pour chaque type de particules et chaque protocole d'exposition des souris, le nombre de gènes dont l'expression pulmonaire est significativement dérégulée d'un facteur supérieur à 2 ($p < 0,05$) par rapport aux souris contrôles. Les gènes dérégulés après 1 mois et 3 mois d'exposition sont présentés dans un tableau dans l'annexe.

Tableau 12. Nombre de gènes dont l'expression pulmonaire est significativement dérégulés d'un facteur supérieur à 2 ($p < 0,05$) chez les souris exposées aux PF ou aux PUF pendant 1 mois ou 3 mois par rapport aux souris contrôles (HBSS). Pour chaque lot de souris, $n = 5$.

	Expositions	1 mois	3 mois
PF	Gènes dérégulés	37	108
	Sous-exprimés	20	103
	Surexprimés	17	5
PUF	Gènes dérégulés	65	182
	Sous-exprimés	9	129
	Surexprimés	56	53

Dans un premier temps, nous avons remarqué que, pour les deux types de particules, le nombre de gènes dérégulés croît avec le temps d'exposition. Il est, par exemple, près de 3 fois supérieur pour les expositions de 3 mois par rapport aux expositions de 1 mois. Nous avons également remarqué que, pour tous les protocoles d'exposition, le nombre de gènes dérégulés est largement supérieur chez les souris exposées aux PUF par rapport à celles exposées aux PF. Les diagrammes de Venn représentés ci-dessous (Figure 35) montrent le nombre de gènes dérégulés de manière commune entre les expositions subchroniques aux PF et aux PUF. Ce nombre est 5 fois supérieur pour les expositions de 3 mois par rapport à celles de 1 mois.

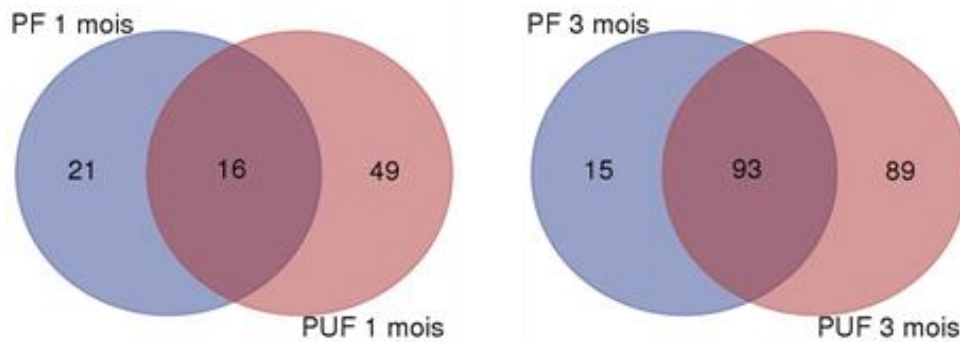


Figure 35 : Diagramme de Venn montrant à 1 mois et à 3 mois le nombre de gènes dérégulés de manière commune entre les expositions subchroniques aux PF et aux PUF.

Pour chaque type de particules, le nombre de gènes dérégulés de façon commune entre les expositions de 1 et de 3 mois est représenté sur les diagrammes de Venn de la Figure 36. Pour les PF, 6 gènes sont dérégulés communément entre les expositions de 1 et 3 mois pour les PUF, ce nombre de gènes atteint 34. Nous avons pu valider par RT-PCR quantitative, les différentiels d'expression mesurés par microarrays pour une sélection des gènes les plus dérégulés, comme par exemple *fos*, *icos*, *nr4a1*, *mmp9*, *mmp8*, *hspa1a*, *hif3a*, *tgfb-a*, *il1r2*, et *bcl2l15*.

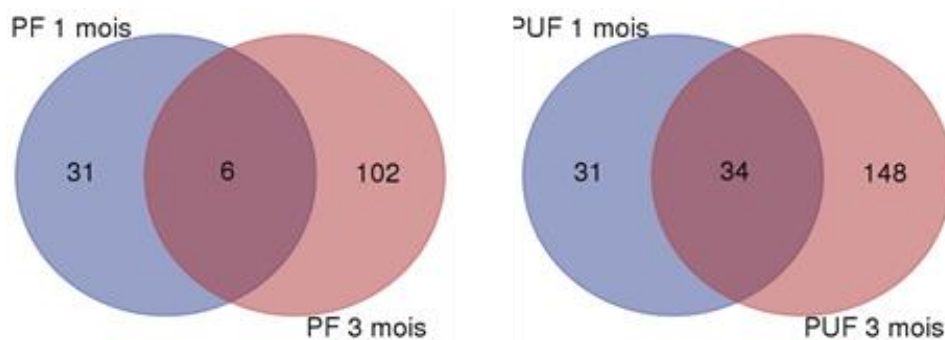


Figure 36 : Diagramme de Venn illustrant le nombre de gènes dérégulés simultanément à 1 mois et à 3 mois chez les souris exposées aux PF d'une part et les souris exposées aux PUF d'autre part.

Par ailleurs, une analyse par le logiciel IPA des gènes dérégulés (différentiel d'expression > 2) a permis d'identifier les voies de signalisation les plus significativement impactées par l'exposition des souris aux PF ou PUF pendant 1 mois ou 3 mois. Dès 1 mois d'exposition, les gènes affectés par les PUF sont en premier lieu des gènes impliqués dans la réponse inflammatoire, des maladies immunologiques, des affections de la morphologie tissulaire, des maladies inflammatoires et des anomalies et lésions d'organes. Le nombre de gènes dérégulés impliqués dans ces mêmes processus est à peu près équivalent après 3 mois d'exposition par les PF mais il est 3 fois plus important après 3 mois d'exposition par les PUF.

Ces données attestent encore une fois que les PUF induisent une réponse plus intense mais également plus précoce du tissu pulmonaire que les PF. L'analyse par le logiciel IPA montre que les voies les plus significativement dérégulées sont communes entre les expositions de 1 mois et de 3 mois aux PF ou PUF avec une différence au niveau du nombre total de gènes dérégulés. C'est pourquoi seulement le top 5 des réseaux de gènes dérégulés dans les poumons de souris exposées aux PUF pendant 3 mois sont présentés dans le tableau 13.

Tableau 13. Top 5 des networks les plus dérégulés dans les poumons de souris exposées pendant 3 mois aux PUF.

Top Networks		
ID	Associated Network Functions	Score
1	Hematological System Development and Function, Tissue Morphology, Cellular Movement	45
2	Neurological Disease, Organismal Injury and Abnormalities, Reproductive System Disease	25
3	Embryonic Development, Nervous System Development and Function, Organ Development	21
4	Cellular Movement, Immune Cell Trafficking, Cell-To-Cell Signaling and Interaction	19
5	Drug Metabolism, Glutathione Depletion In Liver, Cell Death and Survival	19

Dans un premier temps, nous avons analysé le premier network de la liste des top 5 (Figure 37). Cette voie est liée au développement du système hématopoïétique, la morphologie tissulaire et les mouvements cellulaires, ce qui pourrait expliquer l'infiltration de cellules inflammatoires et les modifications observées dans les poumons. Dans ce réseau la protéine NF- κ B occupe un rôle central. Nous avons donc testé si NF- κ B était plus activé dans les poumons de souris exposées pendant 3 mois. Les résultats montrent que les expositions aux PF ou PUF n'ont pas d'effet sur la phosphorylation de NF- κ B dans les conditions expérimentales testés (i.e, homogénat de cellules pulmonaires totales) (Figure 38).

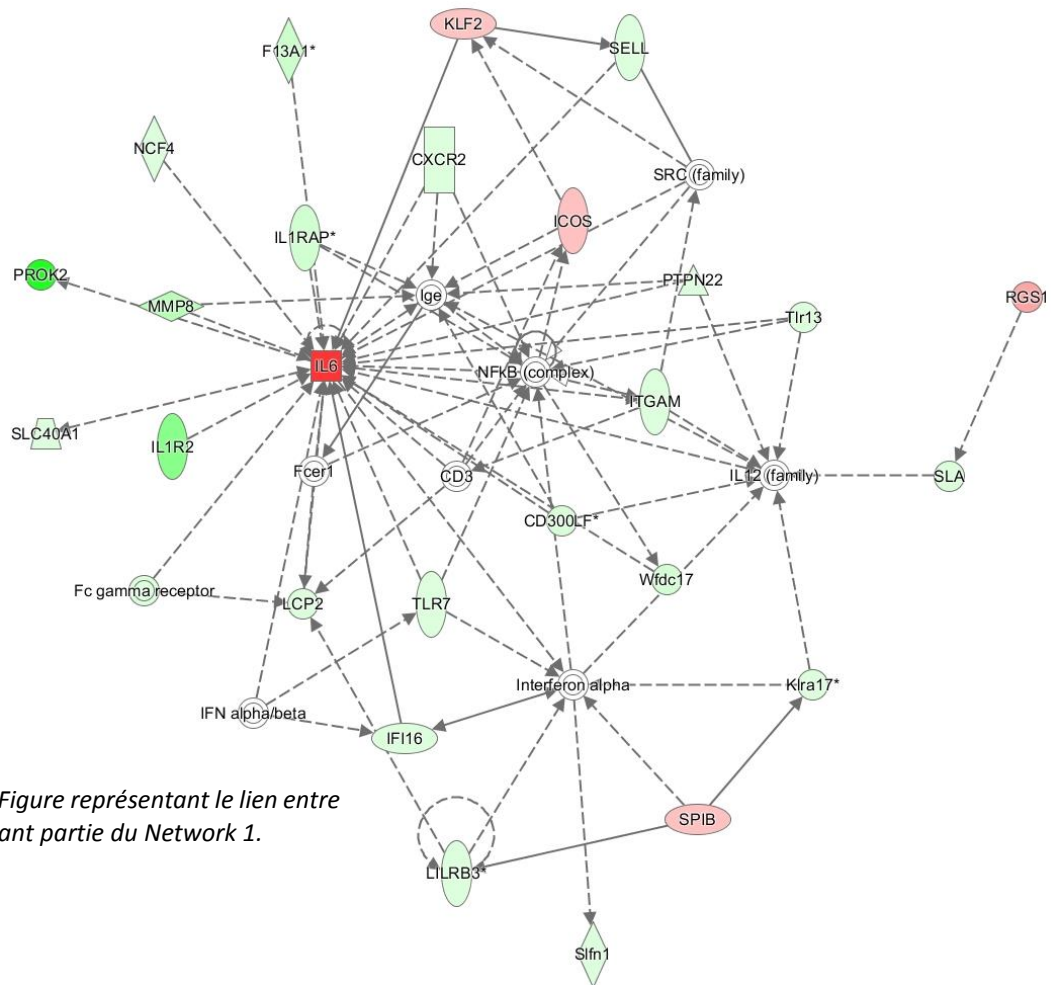


Figure 37 : : Figure représentant le lien entre les gènes faisant partie du Network 1.

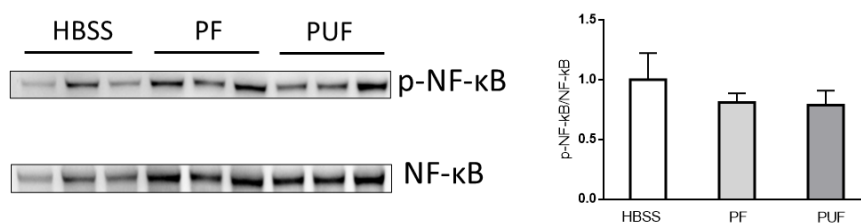


Figure 38 : Analyse par western blot de NF-κB et de p-NF-κB dans l'homogénat des poumons de souris exposées aux PF ou PUF pendant 3 mois. n=3 pour chaque groupe de souris.

Nous avons ensuite analysé le deuxième network proposé par le logiciel IPA dans le but de comprendre les mécanismes à l'origine de la dérégulation de l'expression des gènes observée (Figure 39). Ce network comprend des gènes liés à plusieurs mécanismes dont les anomalies et les lésions d'organe (Tableau 13). En se basant sur les gènes proposés par IPA comme étant liés aux gènes dérégulés dans le network 2, nous avons examiné l'activation des voies MAPK notamment les voies p38-MAPK et ERK1/2. Les résultats de l'analyse de la voie p38-MAPK par western blot montrent une diminution significative de p38-MAPK, pMKK 3/6,

pGSK-3 β , et pMAPKAPK uniquement chez les souris exposées aux PUF pendant 3 mois (Figure 40). Par ailleurs, nous avons observé une augmentation de pERK1/2 chez les souris exposées aux PF ou PUF pendant 3 mois. Cependant, une légère augmentation du taux de phosphorylation de Akt en thr308 a été observée chez les souris exposées aux PF pendant 3 mois. Il nous semble donc que l'exposition aux PF ou PUF n'a pas eu d'effets sur l'activation de Akt parce que nous n'avons pas observé d'importants effets sur le taux de phosphorylation de Akt en thr308 et ser473, nécessaires pour l'activation totale de Akt (Figure 40).

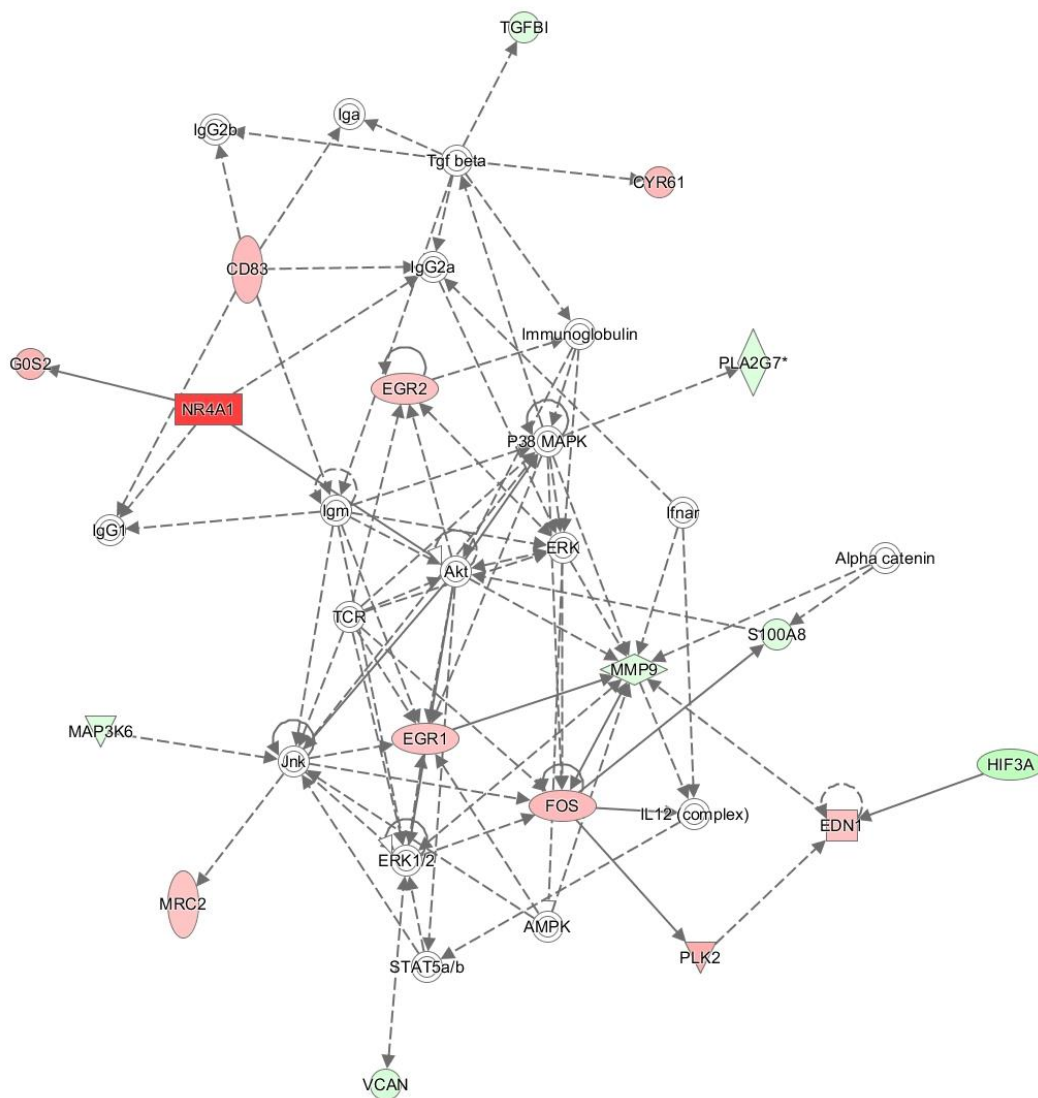


Figure 39 : Figure représentant le lien entre les gènes faisant partie du Network 2.

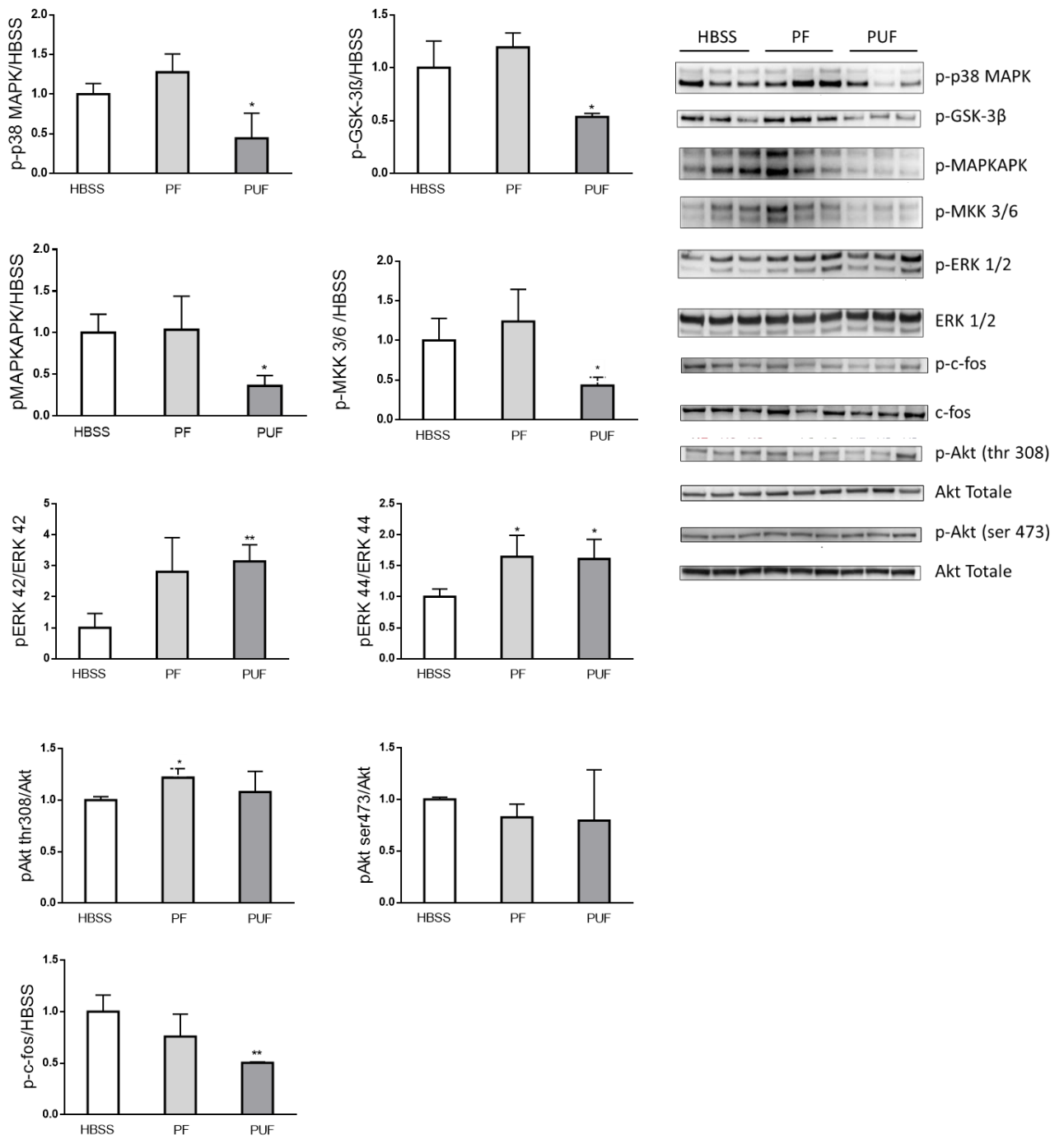


Figure 40 : Analyse par western blot de p-38 MAPK, p-GSK-3b, p-MAPKAPK, et p-MKK 3/6, p-ERK 42/44, pAkt thr308, pAkt ser473 et p-c-fos dans l'homogénat des poumons des souris exposées aux PF ou PUF pendant 3 mois. n=3 pour chaque groupe de souris.

DISCUSSION

De nombreuses études montrent que l'exposition à des niveaux élevés de PM dans l'air participe à l'exacerbation et au développement de maladies respiratoires. La toxicité des PM est principalement liée à une réponse inflammatoire et un stress oxydant dans les poumons entraînant ainsi des effets délétères sur le génome et la santé. Par comparaison avec les particules fines et grossières, il existe moins de données sur la toxicité des particules ultrafines. Cependant, des études montrent qu'elles ont un impact plus nocif sur la santé que les particules de plus grande taille. A l'heure actuelle, la plupart des études se préoccupe de la toxicité des nanomatériaux manufacturés, tandis que l'effet de l'exposition à long terme aux PUF ambiantes n'est pas encore clairement établi.

L'objectif de mon travail de thèse est donc de comparer, à l'aide d'un modèle murin, l'effet de PUF et de PF collectées sur un même site urbano-industriel. Pour cela, des souris ont été exposées pendant 24 h à une dose unique de PF ou de PUF (10, 50 ou 100 μg), ou exposées à des doses répétées de PF ou de PUF (10 μg) à raison de 3 fois/semaine pendant 1 mois ou 3 mois. Les caractéristiques physico-chimiques de ces particules, leur génotoxicité ainsi que leurs effets sur la réponse inflammatoire pulmonaire, et sur les modifications épigénétiques et transcriptomiques ont été évalués dans cette étude.

L'exposition des souris à long terme à des doses réalistes de particules faisait également partie des objectifs de notre étude pour être le plus proche possible des conditions auxquels sont exposées les personnes habitant dans des villes où l'air est pollué. Nous avons donc choisi des doses qui peuvent mimer l'exposition à un pic de pollution. Etant donné que la capacité ventilatoire chez la souris est d'environ 50 mL/min, l'administration de 10 μg de $\text{PM}_{2,5}$ pourrait mimer l'exposition pendant 24h à un air ambiant où la concentration des particules est d'environ 139 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, ce qui correspond à la concentration en $\text{PM}_{2,5}$ dans l'air lors d'un gros pic de pollution dans le Nord de la France, selon les structures régionales de la surveillance de la qualité de l'air (actuellement, aucune donnée n'est disponible concernant la concentration des PUF dans l'air). De plus, un niveau similaire de $\text{PM}_{2,5}$ (132 $\mu\text{g} / \text{m}^3$) est atteint dans les tunnels routiers aux heures de pointe [251]. Dans ces conditions de dispersion défavorables, la concentration des PUF peut atteindre 46,5 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, ce qui n'est que 3 fois moins que celle observée pour les $\text{PM}_{2,5}$ dans le même environnement [251]. Par conséquent, les doses que nous avons testées ne sont pas très éloignées de niveaux d'exposition ambiante.

Le site de prélèvement, situé à l'intersection entre la zone industrielle, les autoroutes A16 et A25 et la conurbation dunkerquoise, est particulièrement influencé par les émissions atmosphériques de particules industrielles, urbaines, portuaires et routières. Les sources d'émissions de particules dans cette zone ont fait l'objet de nombreux travaux ces dernières années et sont bien caractérisées [235,252,253]. Dans le cadre de ce projet, la campagne de prélèvement des particules dans la zone urbano-industrielle à Dunkerque a duré 26 semaines entre septembre 2013 et avril 2014. Dans le but d'identifier les sources principales des PUF prélevées sur ce site, une analyse de regroupement hiérarchique a été effectuée. Elle a permis de mettre en évidence que ces particules sont majoritairement émises par les activités industrielles, le trafic routier et maritime et la remise en suspension du sol. Comme évoqué dans la partie résultat, nous avons mesuré une quantité importante de métaux spécifiques dans les particules collectées, au-dessus de la moyenne urbaine régionale, indiquant que ces particules sont impactées par les industries locales et le trafic routier [205,235,245]. Quant aux HAP, leur concentration dans les échantillons de PF et PUF était similaire avec une légère augmentation de 10% dans les PF. La concentration en BeP était en particulier plus importante dans les échantillons de PF. Cela a été également observé dans 6 villes européennes où la teneur en BeP était 4 à 6 fois plus élevée dans les $PM_{0,2-2,5}$ que dans les $PM_{0,2}$ [254]. Cette augmentation est probablement due à une accumulation à long terme de cet HAP dans l'atmosphère. Par ailleurs, il existe de nombreuses sources de combustion différentes dans la zone urbano-industrielle de Dunkerque qui pourraient émettre de préférence du BeP dans cette fraction de particules.

L'exposition contrôlée de modèles animaux par inhalation directe d'aérosols serait la méthode la plus réaliste pour réaliser des expérimentations *in vivo* visant à étudier la toxicité des PM. Cependant, cette méthode nécessite des quantités très importantes de PM, surtout dans le cadre d'expositions chroniques, ce qui est contraignant lorsqu'il s'agit de particules environnementales pour lesquelles l'accès à des quantités suffisantes est très limité. Pour ces raisons, nous avons choisi d'administrer des suspensions liquides de particules directement dans les voies respiratoires des animaux et avons comparé, dans un premier temps, les modes d'instillation par voie intranasale et par voie endotrachéale. L'instillation par voie endotrachéale assure une administration directe des PM dans les poumons mais elle est invasive et nécessite une anesthésie profonde des animaux (xylazine/kétamine). Cette

méthode est donc difficilement compatible avec des expositions répétées puisqu'elle expose les animaux à un stress peu supportable sur le long terme. L'instillation par voie intranasale consiste à administrer les doses de particules directement dans les narines des animaux et donc d'exposer l'ensemble des voies aériennes de ces animaux. Cette procédure est non invasive et ne nécessite qu'une légère anesthésie à l'isoflurane de très courte durée. Par conséquent, après une série de tests préliminaires comparatifs, nous avons opté pour le mode d'instillation par voie intranasale afin d'appréhender la toxicité respiratoire des PM au décours d'expositions sub-chroniques. Plusieurs études ont mis en évidence la déposition des particules administrées par voie intranasale dans les poumons de modèles murins [255,256]. Dans notre étude, la présence de macrophages contenant des particules (MCP) dans le LBA et les poumons des souris exposées confirme que les PF et PUF administrées par voie intranasale ont atteint les régions les plus profondes des poumons. Cela a été aussi confirmé par l'augmentation de l'expression pulmonaire du gène *Cyp1a1* chez les souris exposées. Ce gène est connu pour être inductible par les HAP, notamment ceux entrant dans la composition des PF et des PUF que nous avons utilisées [257,258]. Par ailleurs, nous avons observé un nombre plus important de MCP dans le LBA des souris exposées aux PUF que dans celui des souris exposées aux PF ; cela pourrait être dû à l'accumulation d'un nombre plus important de PUF dans les poumons. Il a été démontré que la taille des particules joue un rôle important dans leur immunotoxicité [259]. En effet, certaines études montrent que les macrophages éliminent moins efficacement les particules de petite taille et par conséquent persistent dans les poumons plus longtemps, ce qui favorise le recrutement de macrophages et l'induction d'une inflammation chronique, comme le montre les résultats obtenus dans notre étude.

En Octobre 2013, le centre international de recherche sur le cancer (CIRC) a classé les PM en suspension dans l'air en tant que cancérogènes pour l'homme (groupe I) [107]. Plusieurs mécanismes peuvent participer au développement d'un cancer suite à l'exposition aux particules, notamment les mécanismes de génotoxicité qui entraînent des lésions de l'ADN et constituent une étape importante de la tumorigenèse. Les principaux travaux portant sur l'étude de la génotoxicité des PM sont réalisés *in vitro* où plusieurs conditions sont testées. Les tests de génotoxicité *in vivo* sont majoritairement réalisés en utilisant des nanomatériaux plutôt que des particules environnementales. Actuellement, il est donc

important d'optimiser les études à long terme de la génotoxicité *in vivo* des polluants particulaires atmosphériques afin de mieux comprendre, à l'échelle de l'organisme tout entier, les événements moléculaires et cellulaires en amont des maladies détectées chez les personnes exposées à un air pollué. Au cours de notre étude, nous avons évalué chez des souris, au niveaux pulmonaire, hépatique et sanguin, l'effet génotoxique de PF et de PUF administrées de manière aiguë ou sub-chronique par voie intranasale. Nous n'avons détecté aucun effet génotoxique *in vivo* de ces fractions particulaires chez les souris, quelles que soient les conditions d'exposition testées. Des résultats similaires ont déjà été décrits pour des souris exposées à des poussières ambiantes prélevées dans une usine de biocarburant [260]. Des analyses complémentaires *in vitro* réalisées au laboratoire sur des cultures primaires de cellules épithéliales bronchiques humaines n'ont pas permis non plus de détecter, dans les différentes conditions expérimentales testées, un effet génotoxique des PF et PUF collectées. Cependant, il existe des données *in vitro* qui ont montré des effets génotoxique de PM ou de certains de leurs constituants. Ces résultats contradictoires pourraient être attribués à la différence de : (i) dose ou de taille des PM utilisées dans ces études ; (ii) de site de prélèvement de ces PM, surtout que les sources d'émission des PM jouent un rôle capital dans leur toxicité ; ou même (iii) de modèle cellulaire utilisé, sachant que les systèmes de métabolisme et de transports des xénobiotiques, de même que les systèmes enzymatiques de réparation de l'ADN varient significativement d'un modèle cellulaire à un autre, ou sont insuffisants dans certains modèles, en particulier dans les lignées cancéreuses les plus souvent utilisées. Il a été décrit que les HAP présents dans les PM étaient le plus souvent à l'origine des effets génotoxiques ou cancérigènes observés, parce que leur activation métabolique entraîne la formation de métabolites électrophiles hautement réactifs capables d'interagir avec l'ADN [62]. Cependant, Kyjovska et ses collègues ont montré une augmentation des altérations primaires de l'ADN dans les cellules de LBA et de poumons de souris C57BL/6 suite à l'exposition à de faibles doses (de 0,67 à 162 µg) de nanoparticules de carbone suie, un élément retrouvé dans la composition des PM [261]. Afin de pouvoir statuer définitivement sur l'impact génotoxique des PM, et en particulier des fractions les plus fines, il semble nécessaire de multiplier et d'approfondir les études expérimentales *in vivo* s'appuyant sur des conditions d'exposition réalistes, proches de celles auxquelles les sujets sont confrontés dans l'environnement.

Les effets sanitaires de l'exposition aux PM résultent en partie de l'apparition d'un stress oxydant [262,263]. En effet, les PM entraînent la formation d'ERO via les molécules oxydantes et les radicaux libres présents à leur surface, ou les substances chimiques solubles comme les métaux et les composés organiques. Les ERO peuvent aussi être produites par l'altération de l'activité mitochondriale ou après activation des cellules inflammatoires [174]. Le stress oxydant peut entraîner ainsi des dommages de l'ADN qui, s'ils ne sont pas réparés, aboutissent à une altération de mécanismes cellulaires importants, notamment la prolifération cellulaire et l'apoptose [264]. La 8-OHdG est une lésion majeure de l'ADN considérée comme un marqueur de mutagénèse secondaire à un stress oxydant [265]. En effet, une augmentation du taux de 8-OHdG a été observée dans les urines d'enfants exposés à des particules fines et ultrafines [266]. De même, il a été décrit que l'exposition à long-terme à des métaux lourds présents dans l'air entraîne une augmentation de la concentration plasmatiques de 8-OHdG [267]. Il est également intéressant de noter que des quantités élevées de lésions d'ADN dues à la formation d'adduits, comme la 8-OHdG, ont été associées au développement de différents cancers [92]. Dans notre étude, seules les souris exposées aux PUF pendant 3 mois présentent une augmentation du taux pulmonaire de 8-OHdG. Cette augmentation, pourtant légère, indique quand même que les PUF ont potentiellement un impact plus important que la fraction particulaire fine, même si cette petite augmentation semble insuffisante pour induire un effet génotoxique. L'effet supérieur des PUF pourrait être dû à leur plus grande réactivité et à leur capacité de se lier à des molécules biologiquement actives [268]. Pour compléter l'évaluation du potentiel oxydant des PM, nous avons quantifié l'expression de gènes qui peuvent être dérégulés en réponse à un stress oxydant. L'expression pulmonaire des gènes *Nrf2* et *Ho-1* n'a pas été altérée quelles que furent les conditions expérimentales. Cependant, l'expression pulmonaire du gène *Nqo1* augmente de manière significative uniquement chez les souris exposées aux PF pendant 1 ou 3 mois. Cette augmentation différenciée pourrait être due au fait que les PF contiennent un peu plus de HAP que les PUF, puisque *Nqo-1* fait partie des enzymes qui sont inductibles par les HAP et qui les métabolisent [269].

L'inflammation est un autre mécanisme réactionnel très souvent observé suite à l'exposition à des PM [270]. Par conséquent, nous avons évalué la réponse inflammatoire pulmonaire des souris exposées. La numération des cellules présentes dans le LBA de ces

souris montre une augmentation du nombre de PNN après 24h d'exposition sans effets sur le nombre de macrophages. En effet, les PNN constituent la première ligne de défense contre les agents étrangers (quelques heures à quelques jours). Ils induisent une réponse inflammatoire aiguë et s'accumulent sur le site touché où ils éliminent et neutralisent les agents inducteurs de l'inflammation [271]. Dans notre étude, l'augmentation du nombre de PNN suggère donc qu'une inflammation aiguë a pu se développer immédiatement après l'instillation des particules dans les poumons. Ces observations ont également été montrées dans d'autres études où une infiltration de PNN dans les poumons s'est produite suite à l'administration d'une dose unique de PM_{2,5} [272]. Par la suite, lorsque les lésions inflammatoires murissent, les PNN meurent par apoptose et un second type cellulaire s'infiltré : les macrophages. Ces derniers, en arrivant sur le site inflammatoire, éliminent les PNN apoptotiques, les débris cellulaires, et le reste des agents inducteurs de l'inflammation [161]. Dans notre étude, nous avons montré une augmentation du nombre total de macrophage dans le LBA des souris exposées à des doses répétées de PF ou de PUF pendant 1 mois et 3 mois. Cependant, aucun effet sur le nombre de PNN n'a été détecté après ces expositions. Ces observations sont caractéristiques d'une inflammation chronique où les macrophages sont activés d'une manière continue et, par conséquent, résident plus longtemps sur le site inflammatoire [158,161]. Les macrophages sont normalement éliminés du site inflammatoire par efferocytose afin de mettre fin à l'inflammation et de revenir à l'homéostasie. Si la réponse inflammatoire n'est pas résolue, elle peut évoluer vers une inflammation chronique pouvant entraîner des lésions des tissus environnants et le développement de maladies respiratoires chroniques telles que la BPCO [161,271]. Dans notre étude, l'augmentation du nombre de macrophages dans les LBA n'a persisté que chez les souris exposées aux PUF pendant 3 mois. Le comptage des macrophages dans les coupes histologiques de poumons de souris a confirmé ces résultats, avec une augmentation plus significative chez les souris exposées aux PUF. De plus, nous avons également observé une inflammation péri-bronchique plus forte chez les souris exposées aux PUF comparées à celles exposées aux PF. Une exposition chronique aux PM pourrait entraîner une inflammation chronique non seulement dans les poumons mais aussi au niveaux des bronches [273].

La quantification de l'expression de quelques gènes impliqués dans la réponse inflammatoire a montré une augmentation de l'expression d'*Il-6* dans les poumons des souris

exposées aux PUF pendant 3 mois, ce qui confirme la réponse inflammatoire pulmonaire de ces souris. Une augmentation significative de l'expression génique d'Il-10 a également été détectée dans ce groupe de souris. Ce résultat suggère qu'une réponse anti-inflammatoire s'est mise en place afin de résoudre l'inflammation pulmonaire induite par les PUF. Il a été décrit que l'Il-10 favorisait la clairance des PNN, ce qui est cohérent avec la diminution du nombre de PNN dans le LBA avec le temps [274]. Nous avons essayé de confirmer ces résultats en mesurant la concentration protéique de ces cytokines en utilisant différentes méthodes en simplex ou en multiplex (ELISA, Luminex). Cependant, nous n'avons pas réussi à obtenir de résultats probants, surtout chez les souris exposées aux PUF. Certaines études mentionnent que les PM, en particulier les particules les plus fines, pourraient interagir directement avec certains cytokines, constituant ainsi un artefact non biologique lors de la quantification de ces cytokines dans les échantillons biologiques [248,249]. Ce phénomène pourrait expliquer en partie les difficultés que nous avons rencontrées lors du dosage des cytokines dans les LBA et les poumons des souris exposées.

Les modifications histologiques dues à l'exposition aux PF ou PUF ont été évaluées à la fin de chaque protocole d'exposition sub-chronique. Des épaissements de parois alvéolaires dus à une infiltration d'un grand nombre de macrophages ont été observés. Ces modifications étaient plus sévères chez les souris exposées aux PUF pendant 3 mois. Comparées aux PF, les PUF sont connues pour être capables d'altérer les capacités de phagocytose des macrophages d'une manière plus importante. Pour cette raison, les macrophages sont éliminés moins efficacement, ce qui leur favorise leur accumulation et propagation dans les poumons [275]. La formation d'épaissements alvéolaires suite à l'exposition aux PM a déjà été décrite antérieurement. Par exemple, Churg et ses collaborateurs (2003) ont observé un épaissement significatif des parois alvéolaires dans les poumons de femmes exposées à des concentrations élevées de PM [276]. Ce remodelage tissulaire dans les poumons est également observé dans les poumons de patients atteints de BPCO [277]. Les résultats obtenus dans notre étude montrent qu'une exposition sub-chronique aux PUF est capable d'induire de telles lésions. D'autre part, il est intéressant de noter aussi qu'il n'y a pas de différence entre l'effet des PF et PUF sur la largeur des épaissements alvéolaires observés. Cependant, la distribution de ces lésions, recouvrant

près de la moitié de la surface pulmonaire, ainsi que l'infiltration macrophagique sont beaucoup plus étendues dans les poumons de souris exposées aux PUF.

La formation de lésions kystiques caractérisées par un léger élargissement des espaces alvéolaires a également été observée dans les poumons des souris exposées à des doses répétées de particules. Nous avons montré dans notre étude que ces lésions étaient plus marquées dans les poumons de souris exposées aux PUF par rapport à celles exposées aux PF. L'évolution à plus long terme de ce type de dommages tissulaires pourrait conduire à la formation de lésions caractéristiques d'un emphysème pulmonaire [278]. Le tabagisme constitue le premier facteur de risque de l'emphysème pulmonaire. Cependant, de récentes études épidémiologiques ont mis en évidence que l'exposition à long-terme à de faibles concentrations de PM dans l'air peut également être associée au développement et à l'exacerbation de l'emphysème [279,280].

Plusieurs études ont montré que l'exposition aux PM entraîne des changements épigénétiques notamment au niveau (i) de la méthylation de l'ADN, (ii) des modifications d'histones, ou même (iii) de l'expression des miARN. Nous avons, dans un premier temps, évalué l'effet de l'exposition sub-chronique de 1 mois et de 3 mois aux PF et aux PUF sur la méthylation de l'ADN. Dans la littérature, en fonction des protocoles d'exposition utilisés, l'exposition aux PM peut induire une hypo-méthylation ou une hyper-méthylation de l'ADN. Une hypo-méthylation de l'ADN après 2 à 3 mois d'exposition aux PM a été détectée dans des échantillons de sang provenant de personnes habitant à Boston [281]. Dans notre étude, les résultats montrent une diminution de la méthylation globale de l'ADN chez les souris exposées aux PUF pendant 1 mois. Cependant, cette diminution ne persiste pas après 3 mois d'exposition dans ce même groupe de souris où nous observons une augmentation de l'activité enzymatique de la DNMT. La succession de ces deux événements chez les souris exposées aux PUF suggère que l'augmentation de l'activité de la DNMT s'est mise en place afin de compenser la diminution de la méthylation globale observée à 1 mois. Ces résultats sont intéressants parce qu'ils pourraient d'expliquer en partie pourquoi les effets biologiques mesurés chez les souris exposées aux PUF sont plus sévères que ceux observés chez les souris exposées aux PF. Cependant, il serait judicieux d'étudier ces modifications plus précisément, en analysant la méthylation spécifique de certains gènes impliqués dans les mécanismes

réactionnels les plus souvent mis en jeu après exposition aux PM, notamment ceux jouant un rôle dans l'inflammation, le stress oxydant ou même le cycle cellulaire.

Un panel de modifications d'histones a été quantifié simultanément par la technologie Luminex. De par sa structure et sa composition, la chromatine contribue à la régulation de l'expression génique en contrôlant de manière dynamique l'accessibilité des facteurs de transcription aux éléments régulateurs, tels que les promoteurs de gènes et les enhancers. Peu d'études décrivent les effets des PM sur les modifications d'histones. Nos résultats montrent que les PF et PUF n'influencent pas les mêmes modifications d'histone. Pour les expositions de 1 mois, même s'il y a une tendance générale à une légère augmentation des modifications d'histone testées, seule l'augmentation de H3K27me2 chez les souris exposées aux PUF est significative. H3K27me2 aurait un rôle dans la désactivation d'enhancers non spécifiques du type cellulaire [282].

Pour les expositions de 3 mois, on assiste plutôt à une diminution des modifications d'histone testées. Les diminutions les plus significatives concernent H3K4me3 chez les souris exposées aux PF, et H3K27ac chez les souris exposées aux PF et plus fortement encore chez les souris exposées aux PUF. Il a été démontré que le type d'élément régulateur de l'expression des gènes (promoteur, enhancer) est déterminé par le niveau de méthylation de la lysine 4 de l'histone H3 (H3K4). Les enhancers sont ainsi marqués par la mono et/ou la diméthylation (H3K4me1/me2), et les promoteurs par la di- et la triméthylation (H3K4me2/me3) [283,284]. L'acétylation de la lysine 27 de l'histone H3 (H3K27ac) est associée à l'activité des promoteurs et des enhancers, et donc à une augmentation de l'activité transcriptionnelle [284,285]. Liu et ses collaborateurs (2015) ont réalisé la première caractérisation à l'échelle du génome « Genome-wide study » de H3K27ac dans des échantillons de sang provenant de 4 individus exposés à un air plus ou moins concentré en PM_{2,5} [214]. Les résultats de cette étude montrent une augmentation globale des marqueurs H3K27ac associés à des enhancers chez les individus exposés à des niveaux relativement élevés de PM_{2,5}. De plus, certains gènes liés à la réponse immunitaire et à l'inflammation sont probablement influencés par les modifications du taux de H3K27ac suite à l'exposition aux PM_{2,5} [214]. En effet, une augmentation réversible de l'expression de H3k27ac a été observée dans les poumons de souris exposées pendant 2 semaines aux PM_{2,5}. Cette modification a été associée à des gènes impliqués dans la réponse inflammatoire [286], Parmi les autres

modifications d'histone significativement altérées chez les souris exposées aux PF pendant 3 mois, on retrouve H3K36me3 et H3K9ac. Contrairement à ce que nous avons observé. Ding et ses collaborateurs (2017) ont montré une augmentation de H3K9ac après 7 jours d'exposition chez des rats exposés à un air pollué en Chine [212]. Ces résultats contradictoires pourraient être attribués à la différence de dose, de taille ou de site de prélèvement des particules administrés, du mode d'exposition ainsi que du modèle animal.

Les résultats obtenus dans notre étude concernant l'effet de l'exposition aux PM sur les modifications d'histones dans les poumons des souris exposés sont intéressants car ils peuvent permettre de mieux comprendre les mécanismes moléculaires à l'origine des effets négatifs sur la santé observés suite à l'exposition à ces polluants. Le lien de ces modifications d'histones avec des gènes impliqués dans la réponse inflammatoire montre que l'effet des PM sur les histones constitue une étape clé de leur mécanisme de toxicité surtout que l'inflammation est un processus toujours observé suite à l'exposition aux PM dans les poumons de patients sains ou atteints de maladies respiratoires inflammatoires chroniques comme la BPCO et l'asthme.

Les miARN jouent un rôle central dans la régulation de l'expression des gènes. Par conséquent, une dérégulation de leur expression pourrait engendrer des effets délétères sur la santé. Afin d'étudier l'effet de l'exposition aux PF ou PUF sur l'expression des miARN, nous avons quantifié le profil d'expression de 750 miARN par Openarrays dans les poumons des souris exposées. En ce qui concerne les expositions sub-chroniques, les résultats montrent surtout une dérégulation de l'expression de plusieurs miARN après 3 mois d'exposition. Cinq miARN candidats significativement dérégulés ont été sélectionnés afin d'étudier le lien entre ces miARN et les ARNm dérégulés suite à l'exposition aux PF ou aux PUF : mir-598, mir-223, mir-135, mir-129, mir-139. Peu d'études existent sur le lien entre l'exposition aux PM et l'expression des miARN ; il est donc difficile de comparer nos résultats par rapport à ceux de la littérature. Nous avons observé une diminution de l'expression de mir-223 après 3 mois d'exposition dans les poumons des souris exposées aux PF ou PUF ; cependant, Rodosthenous et ses collaborateurs (2016) montrent dans leur étude une augmentation de l'expression de mir-223 dans les échantillons de plasma d'individus exposés aux PM_{2,5} pendant 6 mois [228]. Ce mi-ARN est décrit comme étant lié à différents processus biologiques, notamment la réponse inflammatoire et à la polarisation des macrophages [287]. L'étude des voies de

signalisation impliquées dans ces processus et leur lien avec mir-223 serait intéressante surtout qu'une réponse inflammatoire médiée par une infiltration de macrophages est l'observation prédominante détectée dans les poumons des souris. D'autre part, nous avons observé une augmentation de l'expression de mir-135b après 3 mois d'exposition. Bourdon et ses collaborateurs montrent également une augmentation marquée de mir-135b 27 jours après l'instillation d'une dose de particules de carbone [288]. Ce mi-ARN est également impliqué dans la réponse immunitaire donc, comme pour mir-223, la poursuite de l'étude de son implication dans la réponse immunitaire observée dans les poumons des souris pourrait nous aider à mieux comprendre les mécanismes moléculaires à l'origine des effets qu'entraîne l'exposition aux particules. Concernant mir-129 et mir-139, leur expression diminue dans les poumons des souris exposées pendant 3 mois. Une étude récente montre par contre une augmentation de ces 2 mi-ARN chez des souris exposées aux PM_{2,5} après 1 et 7 jours d'exposition. Dans cette étude, l'augmentation de l'expression de mir-129 et mir-139 a été associée à la régulation de la balance de Th1/Th2 après exposition aiguë aux PM_{2,5} [289]. La relation entre les miARN et la régulation de la réponse immunitaire est d'un grand intérêt car les miARN interviennent rapidement et d'une manière efficace dans la régulation d'un ou même plusieurs miARN en même temps. Concernant mir-598, à notre connaissance, aucune étude n'a encore montré une dérégulation de son expression après exposition aux PM. Cependant, il pourrait constituer un facteur important dans la régulation de la réponse aux PM parce qu'il est décrit en tant que suppresseur de tumeur dans plusieurs cancers, notamment le cancer de poumons à petites cellules [290]. Des pré-miARN et des Anti-miARN (Antagomirs) correspondant aux miARN candidats ont été transfectés avec succès dans une lignée murine de cellules pulmonaires (LA-4) pour respectivement augmenter ou inhiber leur expression. Une analyse transcriptomique des cellules transfectées est en cours et devrait nous permettre d'identifier les principales cibles cellulaires des miARN candidats et d'évaluer leur rôle dans la réponse des tissus pulmonaires aux PF et aux PUF.

Les mécanismes cellulaires et moléculaires à l'origine des effets observés suite à l'exposition aux PM ne sont pas encore clairement établis. De plus, il existe peu d'études sur l'effet de la taille des particules sur la régulation de ces mécanismes. Par conséquent, nous avons décidé de réaliser une étude transcriptomique pangénomique par microarrays dans les tissus pulmonaires des souris exposées aux PF ou aux PUF, avec pour objectif d'analyser les

voies de signalisation dérégulées et d'établir un lien avec les affections respiratoires d'origine environnementale, notamment les maladies inflammatoires chroniques. Les résultats obtenus montrent une augmentation du nombre de gènes dérégulés au cours du temps, mais également en fonction de la taille des particules, les PUF occasionnant plus de différentiels d'expression. Les gènes dérégulés suite à l'exposition aux PF ou PUF sont impliqués dans la réponse inflammatoire, des maladies immunologiques, des affections de la morphologie tissulaire, des maladies inflammatoires et des anomalies et lésions d'organes. Concernant les voies de signalisations dérégulées après 3 mois d'exposition aux PF ou PUF, nous avons remarqué que la protéine Akt n'était pas totalement activée après l'exposition aux particules. Plusieurs études ont cependant mis en évidence une dérégulation de la phosphorylation de cette kinase ainsi que des voies en aval de cette protéine [291]. Par ailleurs, nous avons remarqué une activation de la voie ERK1/2 dans les poumons des souris exposées aux PF ou PUF pendant 3 mois. Une diminution de la phosphorylation de la voie p38 MAPK a également été observée mais uniquement chez les souris exposées aux PUF. Ce résultat devrait être confirmé prochainement par quantification du taux de protéines phosphorylées de la voie p38 MAPK par rapport aux protéines totales respectives. Wang et ses collaborateurs (2017) ont montré que les PM induisaient initialement un stress oxydant et génèrent des ERO au niveau pulmonaire. Les ERO activent les voies p38 MAPK, ERK et JNK qui vont activer par la suite la voie NF- κ B pour induire l'expression de protéine pro-inflammatoire [272]. L'augmentation de la phosphorylation de ERK 1/2 dans les poumons des souris pourrait donc être secondaire au stress oxydant induit par les PF et les PUF. Il a été également décrit que p38 MAPK inhibe directement ou indirectement la phosphorylation de ERK 1/2 [292]. Pour les souris exposées aux PUF, l'inhibition de la voie p38 MAPK pourrait être à l'origine de l'absence d'effets sur la phosphorylation de NF- κ B. De plus, l'absence de l'activation de NF- κ B suggère que l'expression de la cytokine pro-inflammatoire *il-6* est induite par un autre facteur de transcription que NF- κ B, notamment CREB, (AP)-1, ou C/EBP [293], Il est intéressant aussi de noter que ERK1/2 peut activer CREB [294]. L'étude de l'activation de CREB serait intéressante car nous avons détecté dans notre étude du transcriptome une augmentation de l'expression de plusieurs gènes cibles de CREB notamment *Il-6*, *Nr4a1*, *Cyr61*, *Edn1*, *Egr1*, *Egr2*, et *Fos* [295]. Enfin, la différence entre les PF et PUF ici était surtout au niveau de l'inhibition de la voie p38 MAPK, ce qui suggère que les voies de signalisation responsables de l'activation de l'inflammation peuvent être différents entre les deux types de

particules surtout que p38 MAPK joue un rôle central dans l'inhibition de NF- κ B et l'activation de ERK 1/2. Ces voies de signalisation seront prochainement analysées à 1 mois aussi afin de mieux comprendre la cinétique de la toxicité des PF et PUF.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

En utilisant un modèle murin, nous avons démontré qu'une exposition répétée aux PUF pendant 3 mois conduit à une inflammation pulmonaire chronique sévère caractérisée par un épaissement alvéolaire et une infiltration de macrophages dans les tissus respiratoires. Nous avons montré que la réponse inflammatoire était plus limitée dans les poumons des souris exposées aux PF, comparées à celles exposées aux PUF. Les modifications épigénétiques et les voies de signalisation évaluées dans cette étude sont également impliqués dans des mécanismes inflammatoires. Les résultats de notre étude montrent que les PUF induisent une réponse plus intense et plus précoce par rapport à celle induite par les PF. Cela est probablement dû à la taille des PUF qui leur permet de se propager d'une manière plus large dans le système respiratoire ce qui leur permet d'avoir accès à un nombre plus important de cellules et par conséquent d'induire une réponse plus prononcée.

Dans notre étude, les PF et PUF ont été collectées sur le même site urbano-industriel à Dunkerque. Ces particules présentent une composition chimique similaire. Puisque les souris ont été exposées à la même concentration massique de PF ou PUF, les effets plus marqués de l'exposition aux PUF pourrait être attribué au plus grand nombre de ces particules et à leur petite taille qui leurs permettent d'atteindre plus facilement les régions les plus profondes du système respiratoire et de s'accumuler dans les alvéoles. Comparées aux PF, les PUF correspondent à une fraction mineure en masse alors qu'elles représentent 80% de l'aérosol en nombre. Par conséquent, il serait intéressant de déterminer les doses en se basant sur le nombre plutôt que sur la masse de particules administrées, surtout pour les particules de petite taille. Ce concept n'est pas toujours utilisé dans les études toxicologiques. C'est pourquoi une méthode standard pour calculer les doses en se basant sur le nombre des particules serait utile pour pouvoir comparer les résultats obtenus dans les différentes études toxicologiques sur les particules.

L'étude de la toxicité *in vivo* des PUF au-delà de 3 mois d'exposition, la réalisation d'explorations respiratoires fonctionnelles sur les animaux exposés ainsi que l'utilisation de modèle animaux de pathologie respiratoire représentent des objectifs qui s'inscrivent dans la continuité du projet abordé dans le cadre de cette thèse. Ces travaux devraient permettre d'étudier la cinétique de la toxicité de ces particules sur le long terme et de mieux comprendre leur implication dans la pathogenèse ou l'exacerbation des maladies respiratoires à composante environnementale. La poursuite de l'analyse fonctionnelle des miARN dérégulés

permettrait de connaître leurs cibles, d'élucider leurs fonctions et d'identifier des marqueurs (systémiques) innovants associés aux voies de signalisation liées à la pathogénicité des PUF. La validation chez l'homme de ces biomarqueurs, dans la population générale, des populations exposées dans un contexte professionnels ou chez des patients atteints de maladies respiratoires chroniques, pourrait permettre le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques et/ou de prévention ainsi qu'une meilleure surveillance des populations exposées à des stades réversibles de processus pathologiques. Une meilleure compréhension de la toxicité et de l'effet à long terme de l'exposition aux PUF permettrait de contribuer à l'amélioration de la prise de décision, par les organismes en charge de la pollution de l'air et de ses effets sur la santé, les instances en charge de la réglementation de ces émissions et les industriels, quant à la réduction des émissions de PUF afin de réduire les conséquences médicales et socio-économiques causées par les concentrations élevées de ces polluants dans l'atmosphère.

REFERENCES

- [1] Bharadwaj P, Zivin JG, Mullins JT, Neidell M. Early-Life Exposure to the Great Smog of 1952 and the Development of Asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2016;194:1475–82. doi:10.1164/rccm.201603-0451OC.
- [2] The Great London Smog of 1952 n.d. <https://insights.ovid.com/pubmed?pmid=29596258> (accessed March 5, 2019).
- [3] Kampa M, Castanas E. Human health effects of air pollution. *Environ Pollut* 2008;151:362–7. doi:10.1016/j.envpol.2007.06.012.
- [4] Kelly I, Clancy L. Mortality in a General Hospital and Urban Air Pollution n.d.:4.
- [5] Mansourian M, Javanmard SH, Poursafa P, Kelishadi R. Air Pollution and Hospitalization for Respiratory Diseases Among Children in Isfahan, Iran. *Ghana Med J* 2010;44:138–43.
- [6] Zhang H, Niu Y, Yao Y, Chen R, Zhou X, Kan H. The Impact of Ambient Air Pollution on Daily Hospital Visits for Various Respiratory Diseases and the Relevant Medical Expenditures in Shanghai, China. *Int J Environ Res Public Health* 2018;15. doi:10.3390/ijerph15030425.
- [7] Lee KK, Miller MR, Shah ASV. Air Pollution and Stroke. *J Stroke* 2018;20:2–11. doi:10.5853/jos.2017.02894.
- [8] Brook RD, Franklin B, Cascio W, Hong Y, Howard G, Lipsett M, et al. Air pollution and cardiovascular disease: a statement for healthcare professionals from the Expert Panel on Population and Prevention Science of the American Heart Association. *Circulation* 2004;109:2655–71. doi:10.1161/01.CIR.0000128587.30041.C8.
- [9] Shahi AM, Omraninava A, Goli M, Soheilarezoomand HR, Mirzaei N. The Effects of Air Pollution on Cardiovascular and Respiratory Causes of Emergency Admission. *Emerg (Tehran)* 2014;2:107–14.
- [10] Bauer RN, Diaz-Sanchez D, Jaspers I. Effects of air pollutants on innate immunity: The role of Toll-like receptors and nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors. *J Allergy Clin Immunol* 2012;129:14–26. doi:10.1016/j.jaci.2011.11.004.
- [11] Beamish LA, Osornio-Vargas AR, Wine E. Air pollution: An environmental factor contributing to intestinal disease. *J Crohns Colitis* 2011;5:279–86. doi:10.1016/j.crohns.2011.02.017.
- [12] Maher BA, Ahmed IAM, Karloukovski V, MacLaren DA, Foulds PG, Allsop D, et al. Magnetite pollution nanoparticles in the human brain. *PNAS* 2016;113:10797–801. doi:10.1073/pnas.1605941113.
- [13] Vinikoor-Imler LC, Davis JA, Meyer RE, Luben TJ. Early prenatal exposure to air pollution and its associations with birth defects in a state-wide birth cohort from North Carolina. *Birth Defects Res Part A Clin Mol Teratol* 2013;97:696–701. doi:10.1002/bdra.23159.
- [14] Genc S, Zadeoglulari Z, Fuss SH, Genc K. The Adverse Effects of Air Pollution on the Nervous System. *Journal of Toxicology* 2012. doi:10.1155/2012/782462.
- [15] Particulate matter from natural sources and related reporting under the EU Air Quality Directive in 2008 and 2009. European Environment Agency n.d. <https://www.eea.europa.eu/publications/particulate-matter-from-natural-sources> (accessed December 27, 2018).
- [16] Bauer H, Claeys M, Vermeylen R, Schueller E, Weinke G, Berger A, et al. Arabitol and mannitol as tracers for the quantification of airborne fungal spores. *Atmospheric Environment* 2008;42:588–93. doi:10.1016/j.atmosenv.2007.10.013.
- [17] Haas D, Galler H, Luxner J, Zarfel G, Buzina W, Friedl H, et al. The concentrations of culturable microorganisms in relation to particulate matter in urban air. *Atmospheric Environment* 2013;65:215–22. doi:10.1016/j.atmosenv.2012.10.031.
- [18] Adhikari A, Reponen T, Grinshpun SA, Martuzevicius D, LeMasters G. Correlation of ambient inhalable bioaerosols with particulate matter and ozone: A two-year study. *Environmental Pollution* 2006;140:16–28. doi:10.1016/j.envpol.2005.07.004.
- [19] Falcon-Rodriguez CI, Osornio-Vargas AR, Sada-Ovalle I, Segura-Medina P. Aeroparticles, Composition, and Lung Diseases. *Front Immunol* 2016;7. doi:10.3389/fimmu.2016.00003.

- [20] Yatkin S, Bayram A. Determination of major natural and anthropogenic source profiles for particulate matter and trace elements in Izmir, Turkey. *Chemosphere* 2008;71:685–96. doi:10.1016/j.chemosphere.2007.10.070.
- [21] SECTEN - CITEPA n.d. <https://www.citepa.org/fr/activites/inventaires-des-emissions/secten> (accessed August 2, 2018).
- [22] Ambient (outdoor) air quality and health. World Health Organization n.d. [http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/ambient-\(outdoor\)-air-quality-and-health](http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/ambient-(outdoor)-air-quality-and-health) (accessed July 26, 2018).
- [23] 31 mai 2018 : Emissions de GES - l’AEE publie les données 2016 - CITEPA n.d. <https://www.citepa.org/fr/actualites/2918-31-mai-2018-emissions-de-ges-l-ae-publie-les-donnees-2016> (accessed May 22, 2019).
- [24] Karagulian F, Belis CA, Dora CFC, Prüss-Ustün AM, Bonjour S, Adair-Rohani H, et al. Contributions to cities’ ambient particulate matter (PM): A systematic review of local source contributions at global level. *Atmospheric Environment* 2015;120:475–83. doi:10.1016/j.atmosenv.2015.08.087.
- [25] Kulmala M, Petäjä T, Nieminen T, Sipilä M, Manninen HE, Lehtipalo K, et al. Measurement of the nucleation of atmospheric aerosol particles. *Nature Protocols* 2012;7:1651–67. doi:10.1038/nprot.2012.091.
- [26] Adams K, Greenbaum DS, Shaikh R, van Erp AM, Russell AG. Particulate matter components, sources, and health: Systematic approaches to testing effects. *J Air Waste Manag Assoc* 2015;65:544–58. doi:10.1080/10962247.2014.1001884.
- [27] Kim D, Gautam M, Gera D. Parametric studies on the formation of diesel particulate matter via nucleation and coagulation modes. *Journal of Aerosol Science* 2002;33:1609–21. doi:10.1016/S0021-8502(02)00119-2.
- [28] Osornio-Vargas AR, Serrano J, Rojas-Bracho L, Miranda J, García-Cuellar C, Reyna MA, et al. In vitro biological effects of airborne PM_{2.5} and PM₁₀ from a semi-desert city on the Mexico–US border. *Chemosphere* 2011;83:618–26. doi:10.1016/j.chemosphere.2010.11.073.
- [29] WHO | Air pollution. WHO n.d. <http://www.who.int/airpollution/en/> (accessed July 26, 2018).
- [30] Järup L. Hazards of heavy metal contamination. *Br Med Bull* 2003;68:167–82.
- [31] Nriagu JO. Toxic metal pollution in Africa. *Sci Total Environ* 1992;121:1–37.
- [32] Boreson J, Dillner AM, Peccia J. Correlating bioaerosol load with PM_{2.5} and PM_{10cf} concentrations: a comparison between natural desert and urban-fringe aerosols. *Atmospheric Environment* 2004;38:6029–41. doi:10.1016/j.atmosenv.2004.06.040.
- [33] Waheed A, Li X, Tan M, Bao L, Liu J, Zhang Y, et al. Size Distribution and Sources of Trace Metals in Ultrafine/Fine/Coarse Airborne Particles in the Atmosphere of Shanghai. *Aerosol Science and Technology* 2011;45:163–71. doi:10.1080/02786826.2010.528079.
- [34] Vega E, Ruiz H, Escalona S, Cervantes A, Lopez–Veneroni D, Gonzalez–Avalos E, et al. Chemical composition of fine particles in Mexico City during 2003–2004. *Atmospheric Pollution Research* 2011;2:477–83. doi:10.5094/APR.2011.054.
- [35] Fang W, Yang Y, Xu Z. PM₁₀ and PM_{2.5} and health risk assessment for heavy metals in a typical factory for cathode ray tube television recycling. *Environ Sci Technol* 2013;47:12469–76. doi:10.1021/es4026613.
- [36] Sun G, Crissman K, Norwood J, Richards J, Slade R, Hatch GE. Oxidative interactions of synthetic lung epithelial lining fluid with metal-containing particulate matter. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 2001;281:L807–15. doi:10.1152/ajplung.2001.281.4.L807.
- [37] Morakinyo OM, Mokgobu MI, Mukhola MS, Hunter RP. Health Outcomes of Exposure to Biological and Chemical Components of Inhalable and Respirable Particulate Matter. *Int J Environ Res Public Health* 2016;13. doi:10.3390/ijerph13060592.
- [38] Ambient air pollution by AS, CD and NI compounds n.d.:318.

- [39] Abdel-Shafy HI, Mansour MSM. A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: Source, environmental impact, effect on human health and remediation. *Egyptian Journal of Petroleum* 2016;25:107–23. doi:10.1016/j.ejpe.2015.03.011.
- [40] Toxic Responses of the Respiratory System | Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons, 8e | AccessPharmacy | McGraw-Hill Medical n.d. <https://accesspharmacy.mhmedical.com/Content.aspx?bookId=958§ionId=53483737> (accessed August 27, 2018).
- [41] IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, International Agency for Research on Cancer, editors. Some non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons and some related occupational exposures. Lyon, France : Geneva: IARC Press ; Distributed by World Health Organization; 2010.
- [42] Majewski G, Widziewicz K, Rogula-Kozłowska W, Rogula-Kopiec P, Kociszewska K, Rozbicki T, et al. PM Origin or Exposure Duration? Health Hazards from PM-Bound Mercury and PM-Bound PAHs among Students and Lecturers. *Int J Environ Res Public Health* 2018;15. doi:10.3390/ijerph15020316.
- [43] Ewa B, Danuta M-Š. Polycyclic aromatic hydrocarbons and PAH-related DNA adducts. *J Appl Genet* 2017;58:321–30. doi:10.1007/s13353-016-0380-3.
- [44] Analogues NRC (US) C on P and S. *LISTS OF POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS*. National Academies Press (US); 1983.
- [45] Ball A, Truskewycz A. Polyaromatic hydrocarbon exposure: an ecological impact ambiguity. *Environ Sci Pollut Res Int* 2013;20:4311–26. doi:10.1007/s11356-013-1620-2.
- [46] Kim K-H, Jahan SA, Kabir E, Brown RJC. A review of airborne polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their human health effects. *Environ Int* 2013;60:71–80. doi:10.1016/j.envint.2013.07.019.
- [47] Moorthy B, Chu C, Carlin DJ. Polycyclic aromatic hydrocarbons: from metabolism to lung cancer. *Toxicol Sci* 2015;145:5–15. doi:10.1093/toxsci/kfv040.
- [48] DeCarlo PF, Slowik JG, Worsnop DR, Davidovits P, Jimenez JL. Particle Morphology and Density Characterization by Combined Mobility and Aerodynamic Diameter Measurements. Part 1: Theory. *Aerosol Science and Technology* 2004;38:1185–205. doi:10.1080/027868290903907.
- [49] Stuart BO. Deposition and clearance of inhaled particles. *Environ Health Perspect* 1984;55:369–90.
- [50] Big Road Blues. Tufts Now 2012. <https://now.tufts.edu/articles/big-road-blues-pollution-highways> (accessed May 22, 2019).
- [51] Neuf personnes sur 10 respirent un air pollué dans le monde n.d. <https://www.who.int/fr/news-room/detail/02-05-2018-9-out-of-10-people-worldwide-breathe-polluted-air-but-more-countries-are-taking-action> (accessed May 22, 2019).
- [52] Chaudhry R, Bhimji SS. *Anatomy, Thorax, Lungs*. StatPearls Publishing; 2017.
- [53] Crystal RG, Randell SH, Engelhardt JF, Voynow J, Sunday ME. Airway epithelial cells: current concepts and challenges. *Proc Am Thorac Soc* 2008;5:772–7. doi:10.1513/pats.200805-041HR.
- [54] Iwasaki A, Foxman EF, Molony RD. Early local immune defenses in the respiratory tract. *Nat Rev Immunol* 2017;17:7–20. doi:10.1038/nri.2016.117.
- [55] Adam D, Perotin J-M, Lebargy F, Birembaut P, Deslée G, Coraux C. Régénération de l'épithélium des voies aériennes. *Revue Des Maladies Respiratoires* 2014;31:300–11. doi:10.1016/j.rmr.2013.11.001.
- [56] Kotton DN, Morrissey EE. Lung regeneration: mechanisms, applications and emerging stem cell populations. *Nat Med* 2014;20:822–32. doi:10.1038/nm.3642.
- [57] Whitsett JA, Alenghat T. Respiratory epithelial cells orchestrate pulmonary innate immunity. *Nat Immunol* 2015;16:27–35. doi:10.1038/ni.3045.

- [58] Sou T, Meeusen EN, de Veer M, Morton DAV, Kaminskas LM, McIntosh MP. New developments in dry powder pulmonary vaccine delivery. *Trends Biotechnol* 2011;29:191–8. doi:10.1016/j.tibtech.2010.12.009.
- [59] Matthews NC, Pfeffer PE, Mann EH, Kelly FJ, Corrigan CJ, Hawrylowicz CM, et al. Urban Particulate Matter-Activated Human Dendritic Cells Induce the Expansion of Potent Inflammatory Th1, Th2, and Th17 Effector Cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2016;54:250–62. doi:10.1165/rcmb.2015-0084OC.
- [60] Brown JS. Chapter 27 - Deposition of Particles. In: Parent RA, editor. *Comparative Biology of the Normal Lung (Second Edition)*, San Diego: Academic Press; 2015, p. 513–36. doi:10.1016/B978-0-12-404577-4.00027-8.
- [61] Darquenne C. Aerosol Deposition in the Human Lung in Reduced Gravity. *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv* 2014;27:170–7. doi:10.1089/jamp.2013.1079.
- [62] Nemmar A, Holme JA, Rosas I, Schwarze PE, Alfaro-Moreno E. Recent advances in particulate matter and nanoparticle toxicology: a review of the in vivo and in vitro studies. *Biomed Res Int* 2013;2013:279371. doi:10.1155/2013/279371.
- [63] Wanner A, Salathe M, O’Riordan TG. Mucociliary clearance in the airways. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 1996;154:1868–902.
- [64] Bustamante-Marin XM, Ostrowski LE. Cilia and Mucociliary Clearance. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2017;9. doi:10.1101/cshperspect.a028241.
- [65] Munkholm M, Mortensen J. Mucociliary clearance: pathophysiological aspects. *Clin Physiol Funct Imaging* 2014;34:171–7. doi:10.1111/cpf.12085.
- [66] Wang C, editor. Chapter 10 Fate of deposited particles. *Interface Science and Technology*, vol. 5, Elsevier; 2005, p. 149–58. doi:10.1016/S1573-4285(05)80014-6.
- [67] Janssen WJ, Stefanski AL, Bochner BS, Evans CM. Control of lung defence by mucins and macrophages: ancient defence mechanisms with modern functions. *Eur Respir J* 2016;48:1201–14. doi:10.1183/13993003.00120-2015.
- [68] Geiser M. Update on macrophage clearance of inhaled micro- and nanoparticles. *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv* 2010;23:207–17. doi:10.1089/jamp.2009.0797.
- [69] Jubrail J, Kurian N, Niedergang F. Macrophage phagocytosis cracking the defect code in COPD. *Biomedical Journal* 2017;40:305–12. doi:10.1016/j.bj.2017.09.004.
- [70] Kumari S, Mg S, Mayor S. Endocytosis unplugged: multiple ways to enter the cell. *Cell Res* 2010;20:256–75. doi:10.1038/cr.2010.19.
- [71] Conner SD, Schmid SL. Regulated portals of entry into the cell. *Nature* 2003;422:37–44. doi:10.1038/nature01451.
- [72] Liang Z, Ni R, Zhou J, Mao S. Recent advances in controlled pulmonary drug delivery. *Drug Discovery Today* 2015;20:380–9. doi:10.1016/j.drudis.2014.09.020.
- [73] Brennan S, Sly PD, Gangell CL, Sturges N, Winfield K, Wikstrom M, et al. Alveolar macrophages and CC chemokines are increased in children with cystic fibrosis. *Eur Respir J* 2009;34:655–61. doi:10.1183/09031936.00178508.
- [74] Berenson CS, Kruzel RL, Eberhardt E, Sethi S. Phagocytic dysfunction of human alveolar macrophages and severity of chronic obstructive pulmonary disease. *J Infect Dis* 2013;208:2036–45. doi:10.1093/infdis/jit400.
- [75] Alexis NE, Soukup J, Nierkens S, Becker S. Association between airway hyperreactivity and bronchial macrophage dysfunction in individuals with mild asthma. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001;280:L369-375. doi:10.1152/ajplung.2001.280.2.L369.
- [76] Donaldson K, Stone V, Seaton A, MacNee W. Ambient particle inhalation and the cardiovascular system: potential mechanisms. *Environ Health Perspect* 2001;109:523–7.
- [77] Oberdörster G, Oberdörster E, Oberdörster J. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Perspect* 2005;113:823–39.

- [78] Xia T, Zhu Y, Mu L, Zhang Z-F, Liu S. Pulmonary diseases induced by ambient ultrafine and engineered nanoparticles in twenty-first century. *Natl Sci Rev* 2016;3:416–29. doi:10.1093/nsr/nww064.
- [79] Donaldson K, Stone V, Clouter A, Renwick L, MacNee W. Ultrafine particles. *Occup Environ Med* 2001;58:211–6, 199.
- [80] Li N, Sioutas C, Cho A, Schmitz D, Misra C, Sempf J, et al. Ultrafine particulate pollutants induce oxidative stress and mitochondrial damage. *Environ Health Perspect* 2003;111:455–60.
- [81] Costa DL. Historical Highlights of Air Pollution Toxicology. *Toxicol Sci* 2018;164:5–8. doi:10.1093/toxsci/kfy117.
- [82] Fann N, Bell ML, Walker K, Hubbell B. Improving the Linkages between Air Pollution Epidemiology and Quantitative Risk Assessment. *Environ Health Perspect* 2011;119:1671–5. doi:10.1289/ehp.1103780.
- [83] WHO | Global Platform on Air Quality and Health. WHO n.d. http://www.who.int/phe/health_topics/outdoorair/global_platform/en/ (accessed May 21, 2018).
- [84] Ostro B, Hu J, Goldberg D, Reynolds P, Hertz A, Bernstein L, et al. Associations of mortality with long-term exposures to fine and ultrafine particles, species and sources: results from the California Teachers Study Cohort. *Environ Health Perspect* 2015;123:549–56. doi:10.1289/ehp.1408565.
- [85] How clean is your air? | State of Global Air n.d. <https://www.stateofglobalair.org/air> (accessed May 22, 2019).
- [86] Beelen R, Raaschou-Nielsen O, Stafoggia M, Andersen ZJ, Weinmayr G, Hoffmann B, et al. Effects of long-term exposure to air pollution on natural-cause mortality: an analysis of 22 European cohorts within the multicentre ESCAPE project. *Lancet* 2014;383:785–95. doi:10.1016/S0140-6736(13)62158-3.
- [87] IARC – INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER n.d. <https://monographs.iarc.fr/> (accessed August 5, 2018).
- [88] Pope CA, Burnett RT, Thun MJ, Calle EE, Krewski D, Ito K, et al. Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long-term exposure to fine particulate air pollution. *JAMA* 2002;287:1132–41.
- [89] Pope CA, Burnett RT, Thurston GD, Thun MJ, Calle EE, Krewski D, et al. Cardiovascular mortality and long-term exposure to particulate air pollution: epidemiological evidence of general pathophysiological pathways of disease. *Circulation* 2004;109:71–7. doi:10.1161/01.CIR.0000108927.80044.7F.
- [90] Orru H, Maasikmets M, Lai T, Tamm T, Kaasik M, Kimmel V, et al. Health impacts of particulate matter in five major Estonian towns: main sources of exposure and local differences. *Air Qual Atmos Health* 2011;4:247–58. doi:10.1007/s11869-010-0075-6.
- [91] Vodonos A, Awad YA, Schwartz J. The concentration-response between long-term PM2.5 exposure and mortality; A meta-regression approach. *Environ Res* 2018;166:677–89. doi:10.1016/j.envres.2018.06.021.
- [92] Guo C, Li X, Wang R, Yu J, Ye M, Mao L, et al. Association between Oxidative DNA Damage and Risk of Colorectal Cancer: Sensitive Determination of Urinary 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine by UPLC-MS/MS Analysis. *Scientific Reports* 2016;6:32581. doi:10.1038/srep32581.
- [93] Lanzinger S, Schneider A, Breitner S, Stafoggia M, Erzen I, Dostal M, et al. Associations between ultrafine and fine particles and mortality in five central European cities — Results from the UFireg study. *Environment International* 2016;88:44–52. doi:10.1016/j.envint.2015.12.006.
- [94] Lelieveld J, Klingmüller K, Pozzer A, Pöschl U, Fnais M, Daiber A, et al. Cardiovascular disease burden from ambient air pollution in Europe reassessed using novel hazard ratio functions. *Eur Heart J* n.d. doi:10.1093/eurheartj/ehz135.

- [95] Künzli N, Kaiser R, Medina S, Studnicka M, Chanel O, Filliger P, et al. Public-health impact of outdoor and traffic-related air pollution: a European assessment. *Lancet* 2000;356:795–801. doi:10.1016/S0140-6736(00)02653-2.
- [96] Amann M, Cabala R, Cofala J, Heyes C, Klimont Z, Schöpp W, et al. The “Current Legislation” and the “Maximum Technically Feasible Reduction” cases for the CAFE baseline emission projections n.d.:41.
- [97] Santé publique France - Impacts sanitaires de la pollution de l’air en France : nouvelles données et perspectives n.d. <https://www.santepubliquefrance.fr/Accueil-Presses/Tous-les-communiqués/Impacts-sanitaires-de-la-pollution-de-l-air-en-France-nouvelles-données-et-perspectives> (accessed August 20, 2018).
- [98] Kreyling WG, Semmler-Behnke M, Möller W. Ultrafine particle-lung interactions: does size matter? *J Aerosol Med* 2006;19:74–83. doi:10.1089/jam.2006.19.74.
- [99] L S. Overall human mortality and morbidity due to exposure to air pollution. - PubMed - NCBI n.d. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26988881> (accessed December 28, 2018).
- [100] Vineis P, Fecht D. Environment, cancer and inequalities-The urgent need for prevention. *Eur J Cancer* 2018;103:317–26. doi:10.1016/j.ejca.2018.04.018.
- [101] Brunekreef B, Holgate ST. Air pollution and health. *The Lancet* 2002;360:1233–42. doi:10.1016/S0140-6736(02)11274-8.
- [102] Zanobetti A, Franklin M, Koutrakis P, Schwartz J. Fine particulate air pollution and its components in association with cause-specific emergency admissions. *Environ Health* 2009;8:58. doi:10.1186/1476-069X-8-58.
- [103] Martinelli N, Girelli D, Cigolini D, Sandri M, Ricci G, Rocca G, et al. Access Rate to the Emergency Department for Venous Thromboembolism in Relationship with Coarse and Fine Particulate Matter Air Pollution. *PLOS ONE* 2012;7:e34831. doi:10.1371/journal.pone.0034831.
- [104] de Oliveira BFA, Ignotti E, Artaxo P, do Nascimento Saldiva PH, Junger WL, Hacon S. Risk assessment of PM_{2.5} to child residents in Brazilian Amazon region with biofuel production. *Environmental Health* 2012;11:64. doi:10.1186/1476-069X-11-64.
- [105] Huynh M, Woodruff TJ, Parker JD, Schoendorf KC. Relationships between air pollution and preterm birth in California. *Paediatr Perinat Epidemiol* 2006;20:454–61. doi:10.1111/j.1365-3016.2006.00759.x.
- [106] Turner MC, Krewski D, Pope CA, Chen Y, Gapstur SM, Thun MJ. Long-term ambient fine particulate matter air pollution and lung cancer in a large cohort of never-smokers. *Am J Respir Crit Care Med* 2011;184:1374–81. doi:10.1164/rccm.201106-1011OC.
- [107] Raaschou-Nielsen O, Andersen ZJ, Beelen R, Samoli E, Stafoggia M, Weinmayr G, et al. Air pollution and lung cancer incidence in 17 European cohorts: prospective analyses from the European Study of Cohorts for Air Pollution Effects (ESCAPE). *Lancet Oncol* 2013;14:813–22. doi:10.1016/S1470-2045(13)70279-1.
- [108] Ferrante G, La Grutta S. The Burden of Pediatric Asthma. *Front Pediatr* 2018;6. doi:10.3389/fped.2018.00186.
- [109] DeVries R, Kriebel D, Sama S. Low level air pollution and exacerbation of existing copd: a case crossover analysis. *Environ Health* 2016;15. doi:10.1186/s12940-016-0179-z.
- [110] De Marchis P, Verso MG, Tramuto F, Amodio E, Picciotto D. Ischemic cardiovascular disease in workers occupationally exposed to urban air pollution - A systematic review. *Ann Agric Environ Med* 2018;25:162–6. doi:10.26444/aaem/79922.
- [111] Cesaroni G, Forastiere F, Stafoggia M, Andersen ZJ, Badaloni C, Beelen R, et al. Long term exposure to ambient air pollution and incidence of acute coronary events: prospective cohort study and meta-analysis in 11 European cohorts from the ESCAPE Project. *BMJ* 2014;348:f7412. doi:10.1136/bmj.f7412.
- [112] Brook RD, Rajagopalan S, C. Arden Pope III, Brook JR, Bhatnagar A, Diez-Roux AV, et al. Particulate Matter Air Pollution and Cardiovascular Disease. *Circulation* 2010.

- [113] Brook RD, Rajagopalan S. Particulate matter, air pollution, and blood pressure. *J Am Soc Hypertens* 2009;3:332–50. doi:10.1016/j.jash.2009.08.005.
- [114] al XW et. Relationship between fine particulate air pollution and ischaemic heart disease morbidity and mortality. - PubMed - NCBI n.d. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25341536> (accessed December 28, 2018).
- [115] Nieuwenhuijsen MJ. Influence of urban and transport planning and the city environment on cardiovascular disease. *Nat Rev Cardiol* 2018;15:432–8. doi:10.1038/s41569-018-0003-2.
- [116] Folino F, Buja G, Zanotto G, Marras E, Allocca G, Vaccari D, et al. Association between air pollution and ventricular arrhythmias in high-risk patients (ARIA study): a multicentre longitudinal study. *Lancet Planet Health* 2017;1:e58–64. doi:10.1016/S2542-5196(17)30020-7.
- [117] Du Y, Xu X, Chu M, Guo Y, Wang J. Air particulate matter and cardiovascular disease: the epidemiological, biomedical and clinical evidence. *J Thorac Dis* 2016;8:E8–19. doi:10.3978/j.issn.2072-1439.2015.11.37.
- [118] Shrey K, Suchit A, Deepika D, Shruti K, Vibha R. Air pollutants: the key stages in the pathway towards the development of cardiovascular disorders. *Environ Toxicol Pharmacol* 2011;31:1–9. doi:10.1016/j.etap.2010.09.002.
- [119] Xiao Q, Chen H, Strickland MJ, Kan H, Chang HH, Klein M, et al. Associations between birth outcomes and maternal PM2.5 exposure in Shanghai: A comparison of three exposure assessment approaches. *Environ Int* 2018;117:226–36. doi:10.1016/j.envint.2018.04.050.
- [120] Pearson JF, Bachireddy C, Shyamprasad S, Goldfine AB, Brownstein JS. Association between fine particulate matter and diabetes prevalence in the U.S. *Diabetes Care* 2010;33:2196–201. doi:10.2337/dc10-0698.
- [121] Hansen AB, Ravnskjaer L, Loft S, Andersen KK, Brauner EV, Bastrup R, et al. Long-term exposure to fine particulate matter and incidence of diabetes in the Danish Nurse Cohort. *Environment International* 2016;91:243–50. doi:10.1016/j.envint.2016.02.036.
- [122] Fu P, Guo X, Cheung FMH, Yung KKL. The association between PM2.5 exposure and neurological disorders: A systematic review and meta-analysis. *Science of The Total Environment* 2019;655:1240–8. doi:10.1016/j.scitotenv.2018.11.218.
- [123] Lipfert FW. Long-term associations of morbidity with air pollution: A catalog and synthesis. *J Air Waste Manag Assoc* 2018;68:12–28. doi:10.1080/10962247.2017.1349010.
- [124] Schulz H, Harder V, Ibalid-Mulli A, Khandoga A, Koenig W, Krombach F, et al. Cardiovascular effects of fine and ultrafine particles. *J Aerosol Med* 2005;18:1–22. doi:10.1089/jam.2005.18.1.
- [125] Rich DQ, Zareba W, Beckett W, Hopke PK, Oakes D, Frampton MW, et al. Are ambient ultrafine, accumulation mode, and fine particles associated with adverse cardiac responses in patients undergoing cardiac rehabilitation? *Environ Health Perspect* 2012;120:1162–9. doi:10.1289/ehp.1104262.
- [126] Wichmann H-E, Peters A. Epidemiological Evidence of the Effects of Ultrafine Particle Exposure. *Philosophical Transactions: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* 2000;358:2751–69.
- [127] Clifford S, Mazaheri M, Salimi F, Ezz WN, Yeganeh B, Low-Choy S, et al. Effects of exposure to ambient ultrafine particles on respiratory health and systemic inflammation in children. *Environ Int* 2018;114:167–80. doi:10.1016/j.envint.2018.02.019.
- [128] Heinzerling A, Hsu J, Yip F. Respiratory Health Effects of Ultrafine Particles in Children: A Literature Review. *Water Air Soil Pollut* 2016;227. doi:10.1007/s11270-015-2726-6.
- [129] Frampton MW, Rich DQ. Does Particle Size Matter? Ultrafine Particles and Hospital Visits in Eastern Europe. *Am J Respir Crit Care Med* 2016;194:1180–2. doi:10.1164/rccm.201606-1164ED.
- [130] Utell MJ, Frampton MW. Toxicologic methods: controlled human exposures. *Environ Health Perspect* 2000;108:605–13.

- [131] Pieretti LF, Hammad YY. Performance of a whole-body human dust inhalation challenge exposure chamber. *Toxicol Rep* 2018;5:793–9. doi:10.1016/j.toxrep.2018.07.004.
- [132] Huang Y-CT, Ghio AJ. Controlled human exposures to ambient pollutant particles in susceptible populations. *Environ Health* 2009;8:33. doi:10.1186/1476-069X-8-33.
- [133] Nightingale JA, Maggs R, Cullinan P, Donnelly LE, Rogers DF, Kinnersley R, et al. Airway inflammation after controlled exposure to diesel exhaust particulates. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162:161–6. doi:10.1164/ajrccm.162.1.9908092.
- [134] Bellavia Andrea, Urch Bruce, Speck Mary, Brook Robert D., Scott Jeremy A., Albetti Benedetta, et al. DNA Hypomethylation, Ambient Particulate Matter, and Increased Blood Pressure: Findings From Controlled Human Exposure Experiments. *Journal of the American Heart Association* n.d.;2:e000212. doi:10.1161/JAHA.113.000212.
- [135] Petrovic S, Urch B, Brook J, Datema J, Purdham J, Liu L, et al. Cardiorespiratory Effects of Concentrated Ambient PM_{2.5}: A Pilot Study Using Controlled Human Exposures. *Inhalation Toxicology* 2000;12:173–88. doi:10.1080/0895-8378.1987.11463191.
- [136] Devlin RB, Smith CB, Schmitt MT, Rappold AG, Hinderliter A, Graff D, et al. Controlled Exposure of Humans with Metabolic Syndrome to Concentrated Ultrafine Ambient Particulate Matter Causes Cardiovascular Effects. *Toxicol Sci* 2014;140:61–72. doi:10.1093/toxsci/kfu063.
- [137] Rom WN, Boushey H, Caplan A. Experimental human exposure to air pollutants is essential to understand adverse health effects. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2013;49:691–6. doi:10.1165/rcmb.2013-0253PS.
- [138] *Animal Models in Toxicology*. CRC Press n.d. <https://www.crcpress.com/Animal-Models-in-Toxicology/Gad-Gad/p/book/9781466554283> (accessed December 28, 2018).
- [139] Hoeng J, Talikka M, Martin F, Ansari S, Drubin D, Elamin A, et al. Toxicoponomics: Applications of Genomics, Transcriptomics, Proteomics, and Lipidomics in Predictive Mechanistic Toxicology. In: Hayes A, Kruger C, editors. *Hayes' Principles and Methods of Toxicology*, Sixth Edition, CRC Press; 2014, p. 295–332. doi:10.1201/b17359-9.
- [140] Bal HS, Ghoshal NG. Morphology of the terminal bronchiolar region of common laboratory mammals. *Lab Anim* 1988;22:76–82. doi:10.1258/002367788780746539.
- [141] Meuwissen R, Berns A. Mouse models for human lung cancer. *Genes Dev* 2005;19:643–64. doi:10.1101/gad.1284505.
- [142] Boverhof DR, Chamberlain MP, Elcombe CR, Gonzalez FJ, Heflich RH, Hernández LG, et al. Transgenic Animal Models in Toxicology: Historical Perspectives and Future Outlook. *Toxicol Sci* 2011;121:207–33. doi:10.1093/toxsci/kfr075.
- [143] Osier M, Oberdorster G. Intratracheal Inhalation vs Intratracheal Instillation: Differences in Particle Effects 2018:8.
- [144] A quantitative comparison of intranasal and intratracheal administration of coarse PM in the mouse. *Integrative Pharmacology, Toxicology and Genotoxicology* 2015;1. doi:10.15761/IPTG.1000103.
- [145] Driscoll KE, Costa DL, Hatch G, Henderson R, Oberdorster G, Salem H, et al. Intratracheal Instillation as an Exposure Technique for the Evaluation of Respiratory Tract Toxicity: Uses and Limitations. *Toxicol Sci* 2000;55:24–35. doi:10.1093/toxsci/55.1.24.
- [146] Pros and cons of instillation and inhalation. *Ecetoc* n.d. <http://www.ecetoc.org/report2/influence-of-methodology-used/pros-and-cons-of-instillation-and-inhalation/> (accessed August 26, 2018).
- [147] Steerenberg PA, Withagen CET, van Dalen WJ, Dormans JAMA, Cassee FR, Heisterkamp SH, et al. Adjuvant activity of ambient particulate matter of different sites, sizes, and seasons in a respiratory allergy mouse model. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2004;200:186–200. doi:10.1016/j.taap.2004.04.011.
- [148] Jia Y-Y, Wang Q, Liu T. Toxicity Research of PM_{2.5} Compositions in Vitro. *Int J Environ Res Public Health* 2017;14. doi:10.3390/ijerph14030232.

- [149] Upadhyay S, Palmberg L. Air-Liquid Interface: Relevant In Vitro Models for Investigating Air Pollutant-Induced Pulmonary Toxicity. *Toxicol Sci* 2018;164:21–30. doi:10.1093/toxsci/kfy053.
- [150] Guan L, Rui W, Bai R, Zhang W, Zhang F, Ding W. Effects of Size-Fractionated Particulate Matter on Cellular Oxidant Radical Generation in Human Bronchial Epithelial BEAS-2B Cells. *Int J Environ Res Public Health* 2016;13. doi:10.3390/ijerph13050483.
- [151] Mertens TCJ, Karmouty-Quintana H, Taube C, Hiemstra PS. Use of airway epithelial cell culture to unravel the pathogenesis and study treatment in obstructive airway diseases. *Pulm Pharmacol Ther* 2017;45:101–13. doi:10.1016/j.pupt.2017.05.008.
- [152] Loret T, Peyret E, Dubreuil M, Aguerre-Chariol O, Bressot C, le Bihan O, et al. Air-liquid interface exposure to aerosols of poorly soluble nanomaterials induces different biological activation levels compared to exposure to suspensions. *Particle and Fibre Toxicology* 2016;13:58. doi:10.1186/s12989-016-0171-3.
- [153] Bengalli R, Mantecca P, Camatini M, Gualtieri M. Effect of Nanoparticles and Environmental Particles on a Cocultures Model of the Air-Blood Barrier. *BioMed Research International* 2013. doi:10.1155/2013/801214.
- [154] Holder AL, Lucas D, Goth-Goldstein R, Koshland CP. Cellular response to diesel exhaust particles strongly depends on the exposure method. *Toxicol Sci* 2008;103:108–15. doi:10.1093/toxsci/kfn014.
- [155] Polk WW, Sharma M, Sayes CM, Hotchkiss JA, Clippinger AJ. Aerosol generation and characterization of multi-walled carbon nanotubes exposed to cells cultured at the air-liquid interface. *Part Fibre Toxicol* 2016;13:20. doi:10.1186/s12989-016-0131-y.
- [156] Savi M, Kalberer M, Lang D, Ryser M, Fierz M, Gaschen A, et al. A Novel Exposure System for the Efficient and Controlled Deposition of Aerosol Particles onto Cell Cultures. *Environ Sci Technol* 2008;42:5667–74. doi:10.1021/es703075q.
- [157] Frijns E, Verstraelen S, Stoehr LC, Van Laer J, Jacobs A, Peters J, et al. A Novel Exposure System Termed NAVETTA for In Vitro Lamina Flow Electrodeposition of Nanoaerosol and Evaluation of Immune Effects in Human Lung Reporter Cells. *Environ Sci Technol* 2017;51:5259–69. doi:10.1021/acs.est.7b00493.
- [158] Moldoveanu B, Otmishi P, Jani P, Walker J, Sarmiento X, Guardiola J, et al. Inflammatory mechanisms in the lung. *J Inflamm Res* 2009;2:1–11.
- [159] Xu X, Jiang SY, Wang T-Y, Bai Y, Zhong M, Wang A, et al. Inflammatory response to fine particulate air pollution exposure: neutrophil versus monocyte. *PLoS ONE* 2013;8:e71414. doi:10.1371/journal.pone.0071414.
- [160] Savill J, Dransfield I, Gregory C, Haslett C. A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses. *Nat Rev Immunol* 2002;2:965–75. doi:10.1038/nri957.
- [161] Freire MO, Van Dyke TE. Natural resolution of inflammation. *Periodontol 2000* 2013;63:149–64. doi:10.1111/prd.12034.
- [162] Perucci LO, Corrêa MD, Dusse LM, Gomes KB, Sousa LP. Resolution of inflammation pathways in preeclampsia—a narrative review. *Immunol Res* 2017;65:774–89. doi:10.1007/s12026-017-8921-3.
- [163] Bell ML, Davis DL, Fletcher T. A retrospective assessment of mortality from the London smog episode of 1952: the role of influenza and pollution. *Environ Health Perspect* 2004;112:6–8.
- [164] Chen S, Yin R, Mutze K, Yu Y, Takenaka S, Königshoff M, et al. No involvement of alveolar macrophages in the initiation of carbon nanoparticle induced acute lung inflammation in mice. *Part Fibre Toxicol* 2016;13:33. doi:10.1186/s12989-016-0144-6.
- [165] Miyata R, van Eeden SF. The innate and adaptive immune response induced by alveolar macrophages exposed to ambient particulate matter. *Toxicol Appl Pharmacol* 2011;257:209–26. doi:10.1016/j.taap.2011.09.007.
- [166] Wu W, Jin Y, Carlsten C. Inflammatory health effects of indoor and outdoor particulate matter. *J Allergy Clin Immunol* 2018;141:833–44. doi:10.1016/j.jaci.2017.12.981.

- [167] Geiser M, Rothen-Rutishauser B, Kapp N, Schürch S, Kreyling W, Schulz H, et al. Ultrafine Particles Cross Cellular Membranes by Nonphagocytic Mechanisms in Lungs and in Cultured Cells. *Environ Health Perspect* 2005;113:1555–60. doi:10.1289/ehp.8006.
- [168] Choi HS, Ashitate Y, Lee JH, Kim SH, Matsui A, Insin N, et al. Rapid translocation of nanoparticles from the lung airspaces to the body. *Nature Biotechnology* 2010;28:1300–3. doi:10.1038/nbt.1696.
- [169] Kreyling WG, Semmler-Behnke M, Takenaka S, Möller W. Differences in the biokinetics of inhaled nano- versus micrometer-sized particles. *Acc Chem Res* 2013;46:714–22. doi:10.1021/ar300043r.
- [170] Cao C, Lawrence DA, Strickland DK, Zhang L. A specific role of integrin Mac-1 in accelerated macrophage efflux to the lymphatics. *Blood* 2005;106:3234–41. doi:10.1182/blood-2005-03-1288.
- [171] Sun Q, Wang A, Jin X, Natanzon A, Duquaine D, Brook RD, et al. Long-term air pollution exposure and acceleration of atherosclerosis and vascular inflammation in an animal model. *JAMA* 2005;294:3003–10. doi:10.1001/jama.294.23.3003.
- [172] Siponen T, Yli-Tuomi T, Aurela M, Dufva H, Hillamo R, Hirvonen M-R, et al. Source-specific fine particulate air pollution and systemic inflammation in ischaemic heart disease patients. *Occup Environ Med* 2015;72:277–83. doi:10.1136/oemed-2014-102240.
- [173] Traboulsi H, Guerrina N, Lu M, Maysinger D, Ariya P, Baglolle CJ. Inhaled Pollutants: The Molecular Scene behind Respiratory and Systemic Diseases Associated with Ultrafine Particulate Matter. *Int J Mol Sci* 2017;18. doi:10.3390/ijms18020243.
- [174] Risom L, Møller P, Loft S. Oxidative stress-induced DNA damage by particulate air pollution. *Mutat Res* 2005;592:119–37. doi:10.1016/j.mrfmmm.2005.06.012.
- [175] Han JY, Takeshita K, Utsumi H. Noninvasive detection of hydroxyl radical generation in lung by diesel exhaust particles. *Free Radic Biol Med* 2001;30:516–25.
- [176] Ghio AJ, Richards JH, Carter JD, Madden MC. Accumulation of iron in the rat lung after tracheal instillation of diesel particles. *Toxicol Pathol* 2000;28:619–27. doi:10.1177/019262330002800416.
- [177] Hou L, Zhu Z-Z, Zhang X, Nordio F, Bonzini M, Schwartz J, et al. Airborne particulate matter and mitochondrial damage: a cross-sectional study. *Environ Health* 2010;9:48. doi:10.1186/1476-069X-9-48.
- [178] Xia T, Kovochich M, Nel AE. Impairment of mitochondrial function by particulate matter (PM) and their toxic components: implications for PM-induced cardiovascular and lung disease. *Front Biosci* 2007;12:1238–46.
- [179] Castellani P, Balza E, Rubartelli A. Inflammation, DAMPs, tumor development, and progression: a vicious circle orchestrated by redox signaling. *Antioxid Redox Signal* 2014;20:1086–97. doi:10.1089/ars.2012.5164.
- [180] Mittal M, Siddiqui MR, Tran K, Reddy SP, Malik AB. Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. *Antioxid Redox Signal* 2014;20:1126–67. doi:10.1089/ars.2012.5149.
- [181] Biswas SK. Does the Interdependence between Oxidative Stress and Inflammation Explain the Antioxidant Paradox? *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2016. doi:10.1155/2016/5698931.
- [182] Li J, Lan T, Zhang C, Zeng C, Hou J, Yang Z, et al. Reciprocal activation between IL-6/STAT3 and NOX4/Akt signalings promotes proliferation and survival of non-small cell lung cancer cells. *Oncotarget* 2015;6:1031–48. doi:10.18632/oncotarget.2671.
- [183] SAKS M, Upreti S, Rajendra SV, Dang R. *Genotoxicity : Mechanisms , Testing Guidelines and Methods*, 2017.
- [184] Turkez H, Arslan ME, Ozdemir O. Genotoxicity testing: progress and prospects for the next decade. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2017;13:1089–98. doi:10.1080/17425255.2017.1375097.

- [185] Kang SH, Kwon JY, Lee JK, Seo YR. Recent advances in in vivo genotoxicity testing: prediction of carcinogenic potential using comet and micronucleus assay in animal models. *J Cancer Prev* 2013;18:277–88.
- [186] Karlsson HL, Nilsson L, Möller L. Subway particles are more genotoxic than street particles and induce oxidative stress in cultured human lung cells. *Chem Res Toxicol* 2005;18:19–23. doi:10.1021/tx049723c.
- [187] Organic extracts of urban air pollution particulate matter (PM2.5)-induced genotoxicity and oxidative stress in human lung bronchial epithelial cel... - PubMed - NCBI n.d. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21524716> (accessed January 31, 2019).
- [188] Dumax-Vorzet AF, Tate M, Walmsley R, Elder RH, Povey AC. Cytotoxicity and genotoxicity of urban particulate matter in mammalian cells. *Mutagenesis* 2015;30:621–33. doi:10.1093/mutage/gev025.
- [189] Velali E, Papachristou E, Pantazaki A, Choli-Papadopoulou T, Argyrou N, Tsourouktsoglou T, et al. Cytotoxicity and genotoxicity induced in vitro by solvent-extractable organic matter of size-segregated urban particulate matter. *Environ Pollut* 2016;218:1350–62. doi:10.1016/j.envpol.2016.09.001.
- [190] Modrzynska J, Berthing T, Ravn-Haren G, Jacobsen NR, Weydahl IK, Loeschner K, et al. Primary genotoxicity in the liver following pulmonary exposure to carbon black nanoparticles in mice. *Particle and Fibre Toxicology* 2018;15:2. doi:10.1186/s12989-017-0238-9.
- [191] Corsini E, Vecchi R, Marabini L, Fermo P, Becagli S, Bernardoni V, et al. The chemical composition of ultrafine particles and associated biological effects at an alpine town impacted by wood burning. *Sci Total Environ* 2017;587–588:223–31. doi:10.1016/j.scitotenv.2017.02.125.
- [192] Krishna G, Nath J, Soler L, Ong T. Comparative in vivo and in vitro genotoxicity studies of airborne particle extract in mice. *Mutation Research/Genetic Toxicology* 1986;171:157–63. doi:10.1016/0165-1218(86)90049-2.
- [193] Landkocz Y, Ledoux F, André V, Cazier F, Genevray P, Dewaele D, et al. Fine and ultrafine atmospheric particulate matter at a multi-influenced urban site: Physicochemical characterization, mutagenicity and cytotoxicity. *Environ Pollut* 2017;221:130–40. doi:10.1016/j.envpol.2016.11.054.
- [194] Ji H, Hershey GKK. Genetic and epigenetic influence on the response to environmental particulate matter. *J Allergy Clin Immunol* 2012;129:33–41. doi:10.1016/j.jaci.2011.11.008.
- [195] Chen Z, Li S, Subramaniam S, Shyy JY-J, Chien S. Epigenetic Regulation: A New Frontier for Biomedical Engineers. *Annu Rev Biomed Eng* 2017;19:195–219. doi:10.1146/annurev-bioeng-071516-044720.
- [196] Chen Y, Hong T, Wang S, Mo J, Tian T, Zhou X. Epigenetic modification of nucleic acids: from basic studies to medical applications. *Chem Soc Rev* 2017;46:2844–72. doi:10.1039/c6cs00599c.
- [197] Li J, Li WX, Bai C, Song Y. Particulate matter-induced epigenetic changes and lung cancer. *Clin Respir J* 2017;11:539–46. doi:10.1111/crj.12389.
- [198] Handy DE, Castro R, Loscalzo J. Epigenetic Modifications: Basic Mechanisms and Role in Cardiovascular Disease. *Circulation* 2011;123:2145–56. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.110.956839.
- [199] Jin B, Li Y, Robertson KD. DNA Methylation. *Genes Cancer* 2011;2:607–17. doi:10.1177/1947601910393957.
- [200] Portela A, Esteller M. Epigenetic modifications and human disease. *Nat Biotechnol* 2010;28:1057–68. doi:10.1038/nbt.1685.
- [201] Wu H, Zhang Y. Reversing DNA methylation: mechanisms, genomics, and biological functions. *Cell* 2014;156:45–68. doi:10.1016/j.cell.2013.12.019.

- [202] Sun B, Shi Y, Yang X, Zhao T, Duan J, Sun Z. DNA methylation: A critical epigenetic mechanism underlying the detrimental effects of airborne particulate matter. *Ecotoxicol Environ Saf* 2018;161:173–83. doi:10.1016/j.ecoenv.2018.05.083.
- [203] Chen R, Meng X, Zhao A, Wang C, Yang C, Li H, et al. DNA hypomethylation and its mediation in the effects of fine particulate air pollution on cardiovascular biomarkers: A randomized crossover trial. *Environ Int* 2016;94:614–9. doi:10.1016/j.envint.2016.06.026.
- [204] Ding R, Jin Y, Liu X, Zhu Z, Zhang Y, Wang T, et al. Characteristics of DNA methylation changes induced by traffic-related air pollution. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen* 2016;796:46–53. doi:10.1016/j.mrgentox.2015.12.002.
- [205] Leclercq B, Platel A, Antherieu S, Alleman LY, Hardy EM, Perdrix E, et al. Genetic and epigenetic alterations in normal and sensitive COPD-diseased human bronchial epithelial cells repeatedly exposed to air pollution-derived PM 2.5. *Environmental Pollution* 2017;230:163–77. doi:10.1016/j.envpol.2017.06.028.
- [206] Wang FF, Geng CM, Hao WD, Zhao YD, Li Q, Wang HM, et al. The Cellular Toxicity of PM2.5 Emitted from Coal Combustion in Human Umbilical Vein Endothelial Cells. *Biomed Environ Sci* 2016;29:107–16. doi:10.3967/bes2016.012.
- [207] Miousse IR, Chalbot M-CG, Aykin-Burns N, Wang X, Basnakian A, Kavouras IG, et al. Epigenetic alterations induced by ambient particulate matter in mouse macrophages. *Environ Mol Mutagen* 2014;55:428–35. doi:10.1002/em.21855.
- [208] Hou L, Zhang X, Wang D, Baccarelli A. Environmental chemical exposures and human epigenetics. *Int J Epidemiol* 2012;41:79–105. doi:10.1093/ije/dyr154.
- [209] Shukla A, Bunkar N, Kumar R, Bhargava A, Tiwari R, Chaudhury K, et al. Air pollution associated epigenetic modifications: Transgenerational inheritance and underlying molecular mechanisms. *Science of The Total Environment* 2019;656:760–77. doi:10.1016/j.scitotenv.2018.11.381.
- [210] Gilmour PS, Rahman I, Donaldson K, MacNee W. Histone acetylation regulates epithelial IL-8 release mediated by oxidative stress from environmental particles. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003;284:L533-540. doi:10.1152/ajplung.00277.2002.
- [211] Cao D, Bromberg PA, Samet JM. COX-2 expression induced by diesel particles involves chromatin modification and degradation of HDAC1. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2007;37:232–9. doi:10.1165/rcmb.2006-0449OC.
- [212] Ding R, Jin Y, Liu X, Ye H, Zhu Z, Zhang Y, et al. Dose- and time- effect responses of DNA methylation and histone H3K9 acetylation changes induced by traffic-related air pollution. *Scientific Reports* 2017;7:43737. doi:10.1038/srep43737.
- [213] Kresovich JK, Zhang Z, Fang F, Zheng Y, Sanchez-Guerra M, Joyce BT, et al. Histone 3 modifications and blood pressure in the Beijing Truck Driver Air Pollution Study. *Biomarkers* 2017;22:584–93. doi:10.1080/1354750X.2017.1347961.
- [214] Liu C, Xu J, Chen Y, Guo X, Zheng Y, Wang Q, et al. Characterization of genome-wide H3K27ac profiles reveals a distinct PM2.5-associated histone modification signature. *Environmental Health* 2015;14:65. doi:10.1186/s12940-015-0052-5.
- [215] Cantone L, Nordio F, Hou L, Apostoli P, Bonzini M, Tarantini L, et al. Inhalable metal-rich air particles and histone H3K4 dimethylation and H3K9 acetylation in a cross-sectional study of steel workers. *Environ Health Perspect* 2011;119:964–9. doi:10.1289/ehp.1002955.
- [216] O’Brien J, Hayder H, Zayed Y, Peng C. Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2018;9. doi:10.3389/fendo.2018.00402.
- [217] Vasudevan S. Posttranscriptional upregulation by microRNAs. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 2012;3:311–30. doi:10.1002/wrna.121.
- [218] Li Y, Kowdley KV. MicroRNAs in Common Human Diseases. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 2012;10:246–53. doi:10.1016/j.gpb.2012.07.005.
- [219] Peng Y, Croce CM. The role of MicroRNAs in human cancer. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 2016;1:15004. doi:10.1038/sigtrans.2015.4.

- [220] Patton JG, Franklin JL, Weaver AM, Vickers K, Zhang B, Coffey RJ, et al. Biogenesis, delivery, and function of extracellular RNA. *Journal of Extracellular Vesicles* 2015;4:27494. doi:10.3402/jev.v4.27494.
- [221] Sadik N, Cruz L, Gurtner A, Rodosthenous RS, Dusoswa SA, Ziegler O, et al. Extracellular RNAs: A New Awareness of Old Perspectives. *Methods Mol Biol* 2018;1740:1–15. doi:10.1007/978-1-4939-7652-2_1.
- [222] Kim JH, Park SG, Song S-Y, Kim JK, Sung J-H. Reactive oxygen species-responsive miR-210 regulates proliferation and migration of adipose-derived stem cells via PTPN2. *Cell Death Dis* 2013;4:e588. doi:10.1038/cddis.2013.117.
- [223] He J, Jiang B-H. Interplay Between Reactive Oxygen Species and MicroRNAs in Cancer. *Curr Pharmacol Rep* 2016;2:82–90. doi:10.1007/s40495-016-0051-4.
- [224] Vriens A, Nawrot TS, Saenen ND, Provost EB, Kicinski M, Lefebvre W, et al. Recent exposure to ultrafine particles in school children alters miR-222 expression in the extracellular fraction of saliva. *Environ Health* 2016;15. doi:10.1186/s12940-016-0162-8.
- [225] Chew W-S, Poh K-W, Siddiqi NJ, Alhomida AS, Yu LE, Ong W-Y. Short- and long-term changes in blood miRNA levels after nanogold injection in rats—potential biomarkers of nanoparticle exposure. *Biomarkers* 2012;17:750–7. doi:10.3109/1354750X.2012.727030.
- [226] Motta V, Angelici L, Nordio F, Bollati V, Fossati S, Frascati F, et al. Integrative Analysis of miRNA and inflammatory gene expression after acute particulate matter exposure. *Toxicol Sci* 2013;132:307–16. doi:10.1093/toxsci/kft013.
- [227] Pergoli L, Cantone L, Favero C, Angelici L, Iodice S, Pinatel E, et al. Extracellular vesicle-packaged miRNA release after short-term exposure to particulate matter is associated with increased coagulation. *Part Fibre Toxicol* 2017;14:32. doi:10.1186/s12989-017-0214-4.
- [228] Rodosthenous RS, Coull BA, Lu Q, Vokonas PS, Schwartz JD, Baccarelli AA. Ambient particulate matter and microRNAs in extracellular vesicles: a pilot study of older individuals. *Part Fibre Toxicol* 2016;13:13. doi:10.1186/s12989-016-0121-0.
- [229] Krewski D, Acosta D, Andersen M, Anderson H, Bailar JC, Boekelheide K, et al. Toxicity testing in the 21st century: a vision and a strategy. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 2010;13:51–138. doi:10.1080/10937404.2010.483176.
- [230] Council NR. Toxicity Testing in the 21st Century: A Vision and a Strategy. 2007. doi:10.17226/11970.
- [231] Kim HJ, Choi MG, Park MK, Seo YR. Predictive and Prognostic Biomarkers of Respiratory Diseases due to Particulate Matter Exposure. *J Cancer Prev* 2017;22:6–15. doi:10.15430/JCP.2017.22.1.6.
- [232] Yang Y, Hu Z, Zhou Y, Zhao G, Lei Y, Li G, et al. The clinical use of circulating microRNAs as non-invasive diagnostic biomarkers for lung cancers. *Oncotarget* 2017;8:90197–214. doi:10.18632/oncotarget.21644.
- [233] Luo L-J, Zhang L-P, Duan C-Y, Wang B, He N-N, Abulimiti P, et al. The inhibition role of miR-22 in hepatocellular carcinoma cell migration and invasion via targeting CD147. *Cancer Cell International* 2017;17:17. doi:10.1186/s12935-016-0380-8.
- [234] Wang J, Li Y, Ding M, Zhang H, Xu X, Tang J. Molecular mechanisms and clinical applications of miR-22 in regulating malignant progression in human cancer (Review). *Int J Oncol* 2016;50:345–55. doi:10.3892/ijo.2016.3811.
- [235] Mbengue S, Alleman LY, Flament P. Size-distributed metallic elements in submicronic and ultrafine atmospheric particles from urban and industrial areas in northern France. *Atmospheric Research* 2014;135–136:35–47. doi:10.1016/j.atmosres.2013.08.010.
- [236] Crenn V, Chakraborty A, Fronval I, Petitprez D, Riffault V. Fine particles sampled at an urban background site and an industrialized coastal site in Northern France—Part 2: Comparison of offline and online analyses for carbonaceous aerosols. *Aerosol Science and Technology* 2018;52:287–99. doi:10.1080/02786826.2017.1403008.

- [237] Landsiedel R, Kapp MD, Schulz M, Wiench K, Oesch F. Genotoxicity investigations on nanomaterials: methods, preparation and characterization of test material, potential artifacts and limitations--many questions, some answers. *Mutat Res* 2009;681:241–58. doi:10.1016/j.mrrev.2008.10.002.
- [238] Test No. 489: In Vivo Mammalian Alkaline Comet Assay n.d. https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-489-in-vivo-mammalian-alkaline-comet-assay_9789264264885-en (accessed April 4, 2019).
- [239] Test No. 474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test - en - OECD n.d. <http://www.oecd.org/env/test-no-474-mammalian-erythrocyte-micronucleus-test-9789264264762-en.htm> (accessed April 4, 2019).
- [240] Dertinger SD, Phonethepswath S, Weller P, Nicolette J, Murray J, Sonders P, et al. International Pig-a gene mutation assay trial: evaluation of transferability across 14 laboratories. *Environ Mol Mutagen* 2011;52:690–8. doi:10.1002/em.20672.
- [241] Dobrovolsky VN, Miura D, Heflich RH, Dertinger SD. The in vivo Pig-a gene mutation assay, a potential tool for regulatory safety assessment. *Environ Mol Mutagen* 2010;51:825–35. doi:10.1002/em.20627.
- [242] Hartmann A, Schumacher M, Plappert-Helbig U, Lowe P, Suter W, Mueller L. Use of the alkaline in vivo Comet assay for mechanistic genotoxicity investigations. *Mutagenesis* 2004;19:51–9.
- [243] Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, et al. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen* 2000;35:206–21.
- [244] Dertinger SD, Heflich RH. In vivo assessment of Pig-a gene mutation—recent developments and assay validation. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 2011;52:681–4. doi:10.1002/em.20685.
- [245] Mbengue S, Alleman LY, Flament P. Erratum to “Metal-bearing fine particle sources in a coastal industrialized environment” [*Atmos. Res.* 183 (2017) 202–211]. *Atmospheric Research* 2017;189:162. doi:10.1016/j.atmosres.2016.12.012.
- [246] Dergham M, Lepers C, Verdin A, Billet S, Cazier F, Courcot D, et al. Prooxidant and Proinflammatory Potency of Air Pollution Particulate Matter (PM_{2.5}–0.3) Produced in Rural, Urban, or Industrial Surroundings in Human Bronchial Epithelial Cells (BEAS-2B). *Chem Res Toxicol* 2012;25:904–19. doi:10.1021/tx200529v.
- [247] Dergham M, Lepers C, Verdin A, Cazier F, Billet S, Courcot D, et al. 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* 2015;137:256–67. doi:10.1016/j.envres.2014.12.015.
- [248] Brown DM, Dickson C, Duncan P, Al-Attili F, Stone V. Interaction between nanoparticles and cytokine proteins: impact on protein and particle functionality. *Nanotechnology* 2010;21:215104. doi:10.1088/0957-4484/21/21/215104.
- [249] Veranth JM, Kaser EG, Veranth MM, Koch M, Yost GS. Cytokine responses of human lung cells (BEAS-2B) treated with micron-sized and nanoparticles of metal oxides compared to soil dusts. *Part Fibre Toxicol* 2007;4:2. doi:10.1186/1743-8977-4-2.
- [250] Comas M, Gordon CJ, Oliver BG, Stow NW, King G, Sharma P, et al. A circadian based inflammatory response – implications for respiratory disease and treatment. *Sleep Science and Practice* 2017;1:18. doi:10.1186/s41606-017-0019-2.
- [251] Chen S-C, Tsai C-J, Huang C-Y, Chen H-D, Chen S-J, Lin C-C, et al. Chemical Mass Closure and Chemical Characteristics of Ambient Ultrafine Particles and other PM Fractions. *Aerosol Science and Technology* 2010;44:713–23. doi:10.1080/02786826.2010.486385.
- [252] Alleman LY, Lamaison L, Perdrix E, Robache A, Galloo J-C. PM₁₀ metal concentrations and source identification using positive matrix factorization and wind sectoring in a French industrial zone. *Atmospheric Research* 2010;96:612–25. doi:10.1016/j.atmosres.2010.02.008.

- [253] Marris H, Deboudt K, Augustin P, Flament P, Blond F, Fiani E, et al. Fast changes in chemical composition and size distribution of fine particles during the near-field transport of industrial plumes. *Science of The Total Environment* 2012;427–428:126–38. doi:10.1016/j.scitotenv.2012.03.068.
- [254] Saarnio K, Sillanpää M, Hillamo R, Sandell E, Pennanen AS, Salonen RO. Polycyclic aromatic hydrocarbons in size-segregated particulate matter from six urban sites in Europe. *Atmospheric Environment* 2008;42:9087–97. doi:10.1016/j.atmosenv.2008.09.022.
- [255] Martin S, Dawidowski L, Mandalunis P, Cereceda-Balic F, Tasat DR. Characterization and biological effect of Buenos Aires urban air particles on mice lungs. *Environ Res* 2007;105:340–9. doi:10.1016/j.envres.2007.04.009.
- [256] Southam DS, Dolovich M, O’Byrne PM, Inman MD. Distribution of intranasal instillations in mice: effects of volume, time, body position, and anesthesia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002;282:L833–839. doi:10.1152/ajplung.00173.2001.
- [257] van Berlo D, Albrecht C, Knaapen AM, Cassee FR, Gerlofs-Nijland ME, Kooter IM, et al. Comparative evaluation of the effects of short-term inhalation exposure to diesel engine exhaust on rat lung and brain. *Arch Toxicol* 2010;84:553–62. doi:10.1007/s00204-010-0551-7.
- [258] Van Winkle LS, Bein K, Anderson D, Pinkerton KE, Tablin F, Wilson D, et al. Biological dose response to PM_{2.5}: effect of particle extraction method on platelet and lung responses. *Toxicol Sci* 2015;143:349–59. doi:10.1093/toxsci/kfu230.
- [259] Kusaka T, Nakayama M, Nakamura K, Ishimiya M, Furusawa E, Ogasawara K. Effect of silica particle size on macrophage inflammatory responses. *PLoS ONE* 2014;9:e92634. doi:10.1371/journal.pone.0092634.
- [260] Madsen AM, Saber AT, Nordly P, Sharma AK, Wallin H, Vogel U. Inflammation but no DNA (deoxyribonucleic acid) damage in mice exposed to airborne dust from a biofuel plant. *Scandinavian Journal of Work, Environment & Health* 2008;34:278–87. doi:10.5271/sjweh.1272.
- [261] Kyjovska ZO, Jacobsen NR, Saber AT, Bengtson S, Jackson P, Wallin H, et al. DNA damage following pulmonary exposure by instillation to low doses of carbon black (Printex 90) nanoparticles in mice. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 2015;56:41–9. doi:10.1002/em.21888.
- [262] Hussain T, Al-Attas OS, Al-Daghri NM, Mohammed AA, De Rosas E, Ibrahim S, et al. Induction of CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, increased oxidative stress and inflammation in the lung and liver tissues of rats exposed to incense smoke. *Mol Cell Biochem* 2014;391:127–36. doi:10.1007/s11010-014-1995-5.
- [263] Schins RPF, Lightbody JH, Borm PJA, Shi T, Donaldson K, Stone V. Inflammatory effects of coarse and fine particulate matter in relation to chemical and biological constituents. *Toxicol Appl Pharmacol* 2004;195:1–11. doi:10.1016/j.taap.2003.10.002.
- [264] Vattanasit U, Navasumrit P, Khadka MB, Kanitwithayanun J, Promvijit J, Autrup H, et al. Oxidative DNA damage and inflammatory responses in cultured human cells and in humans exposed to traffic-related particles. *Int J Hyg Environ Health* 2014;217:23–33. doi:10.1016/j.ijheh.2013.03.002.
- [265] Ock C-Y, Kim E-H, Choi DJ, Lee HJ, Hahm K-B, Chung MH. 8-Hydroxydeoxyguanosine: Not mere biomarker for oxidative stress, but remedy for oxidative stress-implicated gastrointestinal diseases. *World J Gastroenterol* 2012;18:302–8. doi:10.3748/wjg.v18.i4.302.
- [266] Song S, Paek D, Park C, Lee C, Lee J-H, Yu S-D. Exposure to ambient ultrafine particles and urinary 8-hydroxyl-2-deoxyguanosine in children with and without eczema. *Sci Total Environ* 2013;458–460:408–13. doi:10.1016/j.scitotenv.2013.04.011.
- [267] Al Bakheet SA, Attafi IM, Maayah ZH, Abd-Allah AR, Asiri YA, Korashy HM. Effect of long-term human exposure to environmental heavy metals on the expression of detoxification and DNA repair genes. *Environ Pollut* 2013;181:226–32. doi:10.1016/j.envpol.2013.06.014.

- [268] Kim H, Liu X, Kobayashi T, Kohyama T, Wen F-Q, Romberger DJ, et al. Ultrafine carbon black particles inhibit human lung fibroblast-mediated collagen gel contraction. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003;28:111–21. doi:10.1165/rcmb.4796.
- [269] Elovaara E, Mikkola J, Stockmann-Juvala H, Luukkanen L, Keski-Hynnälä H, Kostianen R, et al. Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) metabolizing enzyme activities in human lung, and their inducibility by exposure to naphthalene, phenanthrene, pyrene, chrysene, and benzo(a)pyrene as shown in the rat lung and liver. *Arch Toxicol* 2006;81:169. doi:10.1007/s00204-006-0135-8.
- [270] Danielsen PH, Møller P, Jensen KA, Sharma AK, Wallin H, Bossi R, et al. Oxidative stress, DNA damage, and inflammation induced by ambient air and wood smoke particulate matter in human A549 and THP-1 cell lines. *Chem Res Toxicol* 2011;24:168–84. doi:10.1021/tx100407m.
- [271] Levy BD, Serhan CN. Resolution of Acute Inflammation In The Lung. *Annu Rev Physiol* 2014;76:467–92. doi:10.1146/annurev-physiol-021113-170408.
- [272] Wang H, Song L, Ju W, Wang X, Dong L, Zhang Y, et al. The acute airway inflammation induced by PM2.5 exposure and the treatment of essential oils in Balb/c mice. *Scientific Reports* 2017;7. doi:10.1038/srep44256.
- [273] de Haar C, Hassing I, Bol M, Bleumink R, Pieters R. Ultrafine but not fine particulate matter causes airway inflammation and allergic airway sensitization to co-administered antigen in mice. *Clin Exp Allergy* 2006;36:1469–79. doi:10.1111/j.1365-2222.2006.02586.x.
- [274] Cox G. IL-10 enhances resolution of pulmonary inflammation in vivo by promoting apoptosis of neutrophils. *Am J Physiol* 1996;271:L566–571. doi:10.1152/ajplung.1996.271.4.L566.
- [275] Renwick LC, Donaldson K, Clouter A. Impairment of alveolar macrophage phagocytosis by ultrafine particles. *Toxicol Appl Pharmacol* 2001;172:119–27. doi:10.1006/taap.2001.9128.
- [276] Churg A, Brauer M, del Carmen Avila-Casado M, Fortoul TI, Wright JL. Chronic exposure to high levels of particulate air pollution and small airway remodeling. *Environ Health Perspect* 2003;111:714–8.
- [277] Caramori G, Casolari P, Barczyk A, Durham AL, Di Stefano A, Adcock I. COPD immunopathology. *Semin Immunopathol* 2016;38:497–515. doi:10.1007/s00281-016-0561-5.
- [278] Shaikh M, Sood RG, Sarkar M, Thakur V. Quantitative Computed Tomography (CT) Assessment of Emphysema in Patients with Severe Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) and its Correlation with Age, Sex, Pulmonary Function Tests, BMI, Smoking, and Biomass Exposure. *Pol J Radiol* 2017;82:760–6. doi:10.12659/PJR.903278.
- [279] Kariisa M, Foraker R, Pennell M, Buckley T, Diaz P, Criner GJ, et al. Short- and long-term effects of ambient ozone and fine particulate matter on the respiratory health of chronic obstructive pulmonary disease subjects. *Arch Environ Occup Health* 2015;70:56–62. doi:10.1080/19338244.2014.932753.
- [280] Adar SD, Kaufman JD, Diez-Roux AV, Hoffman EA, D'Souza J, Stukovsky KH, et al. Air pollution and percent emphysema identified by computed tomography in the Multi-Ethnic study of Atherosclerosis. *Environ Health Perspect* 2015;123:144–51. doi:10.1289/ehp.1307951.
- [281] Madrigano J, Baccarelli A, Vokonas P, Suh H, Bollati V, Schwartz J. Prolonged Exposure to Particulate Air Pollution and Decreased DNA Methylation. *Epidemiology* 2009;20:S45. doi:10.1097/01.ede.0000362313.22573.d6.
- [282] Ferrari KJ, Scelfo A, Jammula S, Cuomo A, Barozzi I, Stützer A, et al. Polycomb-dependent H3K27me1 and H3K27me2 regulate active transcription and enhancer fidelity. *Mol Cell* 2014;53:49–62. doi:10.1016/j.molcel.2013.10.030.
- [283] Heintzman ND, Stuart RK, Hon G, Fu Y, Ching CW, Hawkins RD, et al. Distinct and predictive chromatin signatures of transcriptional promoters and enhancers in the human genome. *Nat Genet* 2007;39:311–8. doi:10.1038/ng1966.

- [284] Ernst J, Kheradpour P, Mikkelsen TS, Shores N, Ward LD, Epstein CB, et al. Mapping and analysis of chromatin state dynamics in nine human cell types. *Nature* 2011;473:43–9. doi:10.1038/nature09906.
- [285] Heintzman ND, Hon GC, Hawkins RD, Kheradpour P, Stark A, Harp LF, et al. Histone modifications at human enhancers reflect global cell-type-specific gene expression. *Nature* 2009;459:108–12. doi:10.1038/nature07829.
- [286] Ji X, Yue H, Ku T, Zhang Y, Yun Y, Li G, et al. Histone modification in the lung injury and recovery of mice in response to PM2.5 exposure. *Chemosphere* 2019;220:127–36. doi:10.1016/j.chemosphere.2018.12.079.
- [287] Essandoh K, Li Y, Huo J, Fan G-C. MiRNA-Mediated Macrophage Polarization and its Potential Role in the Regulation of Inflammatory Response. *Shock* 2016;46:122–31. doi:10.1097/SHK.0000000000000604.
- [288] Bourdon JA, Saber AT, Halappanavar S, Jackson PA, Wu D, Hougaard KS, et al. Carbon black nanoparticle intratracheal installation results in large and sustained changes in the expression of miR-135b in mouse lung. *Environ Mol Mutagen* 2012;53:462–8. doi:10.1002/em.21706.
- [289] Hou T, Liao J, Zhang C, Sun C, Li X, Wang G. Elevated expression of miR-146, miR-139 and miR-340 involved in regulating Th1/Th2 balance with acute exposure of fine particulate matter in mice. *International Immunopharmacology* 2018;54:68–77. doi:10.1016/j.intimp.2017.10.003.
- [290] Yang F, Wei K, Qin Z, Liu W, Shao C, Wang C, et al. MiR-598 Suppresses Invasion and Migration by Negative Regulation of Derlin-1 and Epithelial-Mesenchymal Transition in Non-Small Cell Lung Cancer. *Cell Physiol Biochem* 2018;47:245–56. doi:10.1159/000489803.
- [291] Watterson TL, Hamilton B, Martin RS, Coulombe RA. Urban particulate matter activates Akt in human lung cells. *Arch Toxicol* 2012;86:121–35. doi:10.1007/s00204-011-0739-5.
- [292] Cuadrado A, Nebreda AR. Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. *Biochemical Journal* 2010;429:403–17. doi:10.1042/BJ20100323.
- [293] Hershko DD, Robb BW, Luo G, Hasselgren P-O. Multiple transcription factors regulating the IL-6 gene are activated by cAMP in cultured Caco-2 cells. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 2002;283:R1140–8. doi:10.1152/ajpregu.00161.2002.
- [294] Wen AY, Sakamoto KM, Miller LS. The Role of the Transcription Factor CREB in Immune Function. *The Journal of Immunology* 2010;185:6413–9. doi:10.4049/jimmunol.1001829.
- [295] Fallahi M, Amelio AL, Cleveland JL, Rounbehler RJ. CREB targets define the gene expression signature of malignancies having reduced levels of the tumor suppressor tristetraprolin. *PLoS ONE* 2014;9:e115517. doi:10.1371/journal.pone.0115517.

ARTICLE

Exposure to Atmospheric Ultrafine Particles Induces Severe Lung Inflammatory Response and Tissue Remodeling in Mice

Yara Saleh ¹, Sébastien Antherieu ¹, Romain Dusautoir ¹, Laurent Y. Alleman ², Jules Sotty ¹, Corentin De Sousa ¹, Anne Platel ¹, Esperanza Perdrix ², Véronique Riffault ², Isabelle Fronval ², Fabrice Nesslany ¹, Ludivine Canivet ¹, Guillaume Garçon ¹ and Jean-Marc Lo-Guidice ^{1,*}

¹ EA4483-IMPECS, Université de Lille, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, 59045 Lille Cédex, France; yara.saleh@univ-lille.fr (Y.S.); sebastien.antherieu@univ-lille.fr (S.A.); romain.dusautoir@univ-lille.fr (R.D.); jules.sotty@univ-lille.fr (J.S.); corentin.de-sousa@univ-lille.fr (C.D.S.); anne.platel@pasteur-lille.fr (A.P.); fabrice.nesslany@univ-lille.fr (F.N.); ludivine.canivet@univ-lille.fr (L.C.); guillaume.garcon@univ-lille.fr (G.G.)

² Département Sciences de l'Atmosphère et Génie de l'Environnement (SAGE), IMT Lille Douai, Université de Lille, 59000 Lille, France; laurent.alleman@imt-lille-douai.fr (L.Y.A.); esperanza.perdrix@imt-lille-douai.fr (E.P.); veronique.riffault@imt-lille-douai.fr (V.R.); isabelle.fronval@imt-lille-douai.fr (I.F.);

* Correspondence: jean-marc.lo-guidice@univ-lille.fr; Tel.: +33 -320626819

Received: 23 January 2019; Accepted: 1 April 2019; Published: date

Abstract: Exposure to particulate matter (PM) is leading to various respiratory health outcomes. Compared to coarse and fine particles, less is known about the effects of chronic exposure to ultrafine particles, despite their higher number and reactivity. In the present study, we performed a time-course experiment in mice to better analyze the lung impact of atmospheric ultrafine particles, with regard to the effects induced by fine particles collected on the same site. Trace element and PAH analysis demonstrated the almost similar chemical composition of both particle fractions. Mice were exposed intranasally to FF or UFP according to acute (10, 50 or 100 µg of PM) and repeated (10 µg of PM 3 times a week during 1 or 3 months) exposure protocols. More particle-laden macrophages and even greater chronic inflammation were observed in the UFP-exposed mice lungs. Histological analyses revealed that about 50% of lung tissues were damaged in mice exposed to UFP for three months versus only 35% in FF-exposed mice. These injuries were characterized by alveolar wall thickening, macrophage infiltrations, and cystic lesions. Taken together, these results strongly motivate the update of current regulations regarding ambient PM concentrations to include UFP and limit their emission.

Keywords: Ultrafine particles; mice; (sub)chronic exposure; inflammation; lung tissue remodeling

ANNEXE

Tableau annexe montrant les gènes dérégulés (FC ≥ 2) après 1 mois ou 3 mois d'exposition aux PF ou PUF.

1 mois			
PF		PUF	
Cyp1a1	9,10	Il1r2	7,90
Psors1c2	7,65	Bcl2l15	5,64
Il1r2	3,33	4933432I03Rik	5,58
Cyp1b1	2,88	Doc2b	5,06
Hif3a	2,82	Bcl2l15	4,72
E030003E18Rik	2,80	Mmp8	4,50
Fkbp5	2,57	Fkbp5	4,28
Doc2b	2,43	Hif3a	4,10
Ttpal	2,32	Cyp1a1	3,47
Mmp8	2,25	Rax	3,46
4933432I03Rik	2,19	C530044C16Rik	3,37
Dhrs9	2,17	E030003E18Rik	3,32
Casz1	2,15	4930459C07Rik	3,30
Klra17	2,12	Fam107a	3,24
5730422E09Rik	2,10	Gm5483	3,18
Khdc3	2,08	Celsr3	3,07
Ip6k3	2,06	Scrg1	2,98
Fcrla	-2,07	Lmcd1	2,93
Kcne4	-2,10	Ip6k3	2,85
3110027N22Rik	-2,13	Dhrs9	2,74
1700109H08Rik	-2,16	Mettl21e	2,70
Csrnp1	-2,19	AA467197	2,68
Rgs1	-2,26	Cdkn1a	2,60
Olfr170	-2,28	Cd33	2,60
C130026I21Rik	-2,29	Gm10872	2,56
5031434C07Rik	-2,35	Clec4d	2,55
P2ry10	-2,35	1700060C20Rik	2,51
LOC102634459	-2,39	AU019990	2,50
Gm614	-2,44	Ovgp1	2,49
Scn3a	-2,48	Gm5416	2,45
Nr5a2	-2,57	Kcnip3	2,43
LOC102638047	-2,57	Cyp1b1	2,40
Fos	-2,70	Slfn4	2,40
Egr1	-2,73	Trim30b	2,39
Cyr61	-2,94	Pilrb2	2,38
Tnc	-3,95	Map3k6	2,33
Nr4a1	-4,22	Pram1	2,32
		Zfand4	2,31
		Lmcd1	2,30
		LOC102641377	2,30

3 mois			
PF		PUF	
Cyp1b1	3,11	Hspa1a	10,85
Pde4b	2,07	Il6	7,37
Nqo1	2,06	Nr4a1	6,92
Il6	2,03	Ly6d	3,60
Cd209c	2,03	Cyp1b1	3,57
Gapt	-2,00	Pde4b	3,34
Pira2	-2,01	1110006E14Rik	3,28
Lcp2	-2,04	Rgs1	3,20
Alox5ap	-2,04	D030020J04Rik	3,02
Trem12	-2,05	C2cd4b	3,01
Ptpn22	-2,05	Kcnn3	3,01
Gm10693	-2,06	C2cd4a	2,98
Slfn3	-2,06	Scn3a	2,97
Relt	-2,06	Dnaja1	2,94
Tespa1	-2,07	C2cd4b	2,94
Pira7	-2,07	Pde4b	2,93
A630081J09Rik	-2,07	Fam129c	2,93
Dfna5	-2,07	Plk2	2,91
Gda	-2,08	Pcdh18	2,75
Fgd4	-2,09	G0s2	2,70
Lilrb4	-2,09	Dact1	2,69
Gm14548	-2,10	Antxr1	2,53
Gm2511	-2,11	Cyr61	2,50
Pira11	-2,11	Fos	2,46
Klra2	-2,11	Cd83	2,43
Klra9	-2,12	Dusp8	2,39
Prkcb	-2,13	Plcb1	2,38
P2ry13	-2,14	Cd209c	2,38
Zfand4	-2,15	C2cd4a	2,38
I830077J02Rik	-2,15	Tmem200a	2,37
Entpd3	-2,15	Klf4	2,37
Lilra6	-2,17	9,13E+15	2,36
Klra16	-2,18	Tox3	2,36
Gm10693	-2,18	Gm11128	2,31
Pla2g7	-2,19	Sox17	2,29
Gm10872	-2,24	4930426D05Rik	2,29
Itga4	-2,24	Gbp4	2,29
Pira2	-2,24	Foxf2	2,28
Raet1b	-2,25	Icos	2,23
Fcgr4	-2,25	Tox3	2,23

Arrdc2	2,26
Arrdc2	2,24
Cd300lf	2,22
Bcl2l1	2,19
LOC102636048	2,18
Sema7a	2,18
Trpm2	2,14
9330198I05Rik	2,13
Trp53inp1	2,12
Nr1h4	2,11
Cpne2	2,09
Adam8	2,08
Plekhg4	2,07
2810468N07Rik	2,06
Sla	2,04
Tbc1d8	2,04
1500009L16Rik	2,03
Hist1h2bq	2,00
Cyp4f18	2,00
Cx3cr1	-2,09
Antxr1	-2,12
Egr1	-2,25
Ms4a1	-2,32
Pax5	-2,40
Nr4a1	-2,44
Nr5a2	-2,62
Scn3a	-2,71
Tnc	-3,22

Pirb	-2,27	Egr1	2,23
Pira6	-2,28	Edn1	2,22
Zfp831	-2,30	Hist2h3c2	2,21
F630028O10Rik	-2,30	Slc5a3	2,21
Pdzd3	-2,31	Spib	2,20
Cd300lf	-2,32	Sox4	2,19
Tlr13	-2,34	Btg2	2,17
Itgam	-2,37	Egr2	2,17
Sell	-2,38	Pcdh12	2,16
Piwil2	-2,41	Runx1t1	2,14
Pla2g7	-2,42	Frem3	2,11
Hist1h2bq	-2,43	Mrc2	2,09
Ccr1l1	-2,43	Klf2	2,08
Cxcr2	-2,44	Arhgap20	2,07
Sirpb1b	-2,45	Bcl6b	2,07
Cd300lf	-2,45	Meox2	2,06
Krt86	-2,46	Plcb1	2,04
Ctse	-2,48	Sox17	2,03
Sirpb1a	-2,49	Sox4	2,02
Pirb	-2,50	Malat1	2,01
Ncf4	-2,52	2310047D07Rik	-2,00
Bcl2l15	-2,52	Lcp2	-2,01
Gm5150	-2,53	Krtap21-1	-2,02
Klra7	-2,53	Slc40a1	-2,02
Bcl2l15	-2,53	LOC102641377	-2,02
4930459C07Rik	-2,54	Klra2	-2,03
Vcan	-2,54	Klra17	-2,04
LOC102642410	-2,55	Nlrp1b	-2,05
Gm5150	-2,55	Mcf2l	-2,06
AB124611	-2,55	Nr1d2	-2,07
Sirpb1b	-2,58	Ppp1r3d	-2,07
Sirpb1a	-2,59	Ggt5	-2,07
Slfn1	-2,64	Foxred2	-2,07
Pram1	-2,66	Itgam	-2,07
Slfn4	-2,66	Prmt8	-2,09
B430306N03Rik	-2,67	Map3k6	-2,10
Gpr141	-2,68	Lmcd1	-2,10
B430306N03Rik	-2,69	Gm16894	-2,12
F13a1	-2,75	Klra17	-2,13
Lhx1	-2,76	Tgfb1	-2,13
Mmp8	-2,76	Lrrc25	-2,15
2810037O22Rik	-2,77	Nr1d1	-2,15
Celsr3	-2,80	Ttpal	-2,15
AU019990	-2,82	Rasgef1c	-2,17

Il1rap	-2,84	Fam46b	-2,19
4933432I03Rik	-2,87	Dgkg	-2,21
Klra17	-2,88	Pira6	-2,22
Gm16894	-2,93	Pira2	-2,23
Il1r2	-2,93	Cpne2	-2,25
Trim30b	-2,94	Lilrb4	-2,26
Mefv	-2,96	Lilra6	-2,26
Mmp9	-3,00	Gm10693	-2,27
Dhrs9	-3,01	Fam107a	-2,28
Klra17	-3,03	Ccr1l1	-2,29
Slc28a2	-3,07	Sirpb1a	-2,29
Stfa2l1	-3,10	Il1rap	-2,29
Gm14085	-3,21	Sell	-2,30
1100001G20Rik	-3,22	Pirb	-2,31
Gm5416	-3,29	Tlr7	-2,31
Tarm1	-3,31	Al607873	-2,32
Slc22a20	-3,33	P2ry13	-2,32
Gm14085	-3,39	Pira7	-2,32
F13a1	-3,41	Ncf4	-2,32
Gm14010	-3,42	Fgd4	-2,32
Stfa2	-3,47	Raet1b	-2,35
LOC102636866	-3,51	Pira11	-2,35
Mrgpra2b	-3,65	Gm14548	-2,36
Mefv	-3,69	Gpr64	-2,38
Soat2	-3,69	Krt86	-2,38
Wfdc17	-3,80	I830077J02Rik	-2,38
BC100530	-3,85	Pla1a	-2,40
Mrgpra2a	-3,92	Gda	-2,40
Apoc2	-4,16	Slfn3	-2,43
Asprv1	-4,24	Alox5ap	-2,45
Stfa3	-4,27	Ovgp1	-2,46
Wfdc18	-4,29	AB124611	-2,47
Redrum	-4,69	Dennd4a	-2,48
Mrgpra5	-5,69	Pirb	-2,48
Raet1e	-6,43	Clca2	-2,49
Mrgpra7	-6,66	Sirpb1b	-2,50
Prok2	-18,26	Pira2	-2,50
Ambp	-20,01	Gm10693	-2,50
		Pla2g7	-2,52
		Slc28a2	-2,55
		Sirpb1b	-2,59
		Mmp9	-2,60
		Pla2g7	-2,61
		Gm5150	-2,62

LOC102642410	-2,63
Relt	-2,63
Fcgr4	-2,64
Pdzd3	-2,64
Gm5150	-2,65
Entpd3	-2,66
Sirpb1a	-2,66
Cpne2	-2,67
S100a8	-2,67
Gm14085	-2,70
Gm14085	-2,74
Slfn1	-2,78
Gda	-2,79
Cxcr2	-2,81
Ptpn22	-2,89
4930459C07Rik	-2,90
Gm10872	-2,91
B430306N03Rik	-2,93
Tas2r126	-2,93
Scrg1	-2,95
Tlr13	-2,97
B430306N03Rik	-2,98
Pram1	-2,98
Lhx1	-3,00
Mefv	-3,05
LOC102636866	-3,12
Slfn4	-3,12
Sla	-3,15
F13a1	-3,15
Slc22a20	-3,22
Cd300lf	-3,24
Cd300lf	-3,28
F630028O10Rik	-3,32
Cd33	-3,36
E030003E18Rik	-3,38
Vcan	-3,46
Mrgpra2b	-3,60
Wfdc18	-3,60
Gpr141	-3,66
Mrgpra2a	-3,69
Apoc2	-3,71
Wfdc17	-3,72
Trim30b	-3,75
Gm5416	-3,82

Redrum	-3,88
Rax	-3,88
Il1rap	-3,89
Piwil2	-3,92
AU019990	-4,08
5830415G21Rik	-4,17
Mefv	-4,19
Soat2	-4,29
Gm2511	-4,32
Celsr3	-4,32
F13a1	-4,34
Stfa211	-4,38
Asprv1	-4,46
1100001G20Rik	-4,51
Tarm1	-4,54
Mrgpra5	-4,58
Zfand4	-4,66
Dhrs9	-4,66
Mrgpra7	-4,79
Stfa2	-4,80
BC100530	-5,38
Fkbp5	-5,43
Hif3a	-5,66
Stfa3	-5,84
Gm14010	-5,92
Mmp8	-6,16
Doc2b	-7,23
4933432I03Rik	-8,58
Raet1e	-8,67
Bcl2l15	-8,75
Ambp	-9,06
Il1r2	-10,20
Bcl2l15	-10,24
Prok2	-19,62
Pde4b	3,34
Cd209c	2,38