
École Doctorale Biologie – Santé de Lille

THÈSE DE DOCTORAT

En vue de l'obtention du grade de

Docteur d'Université

Spécialité : **Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie - Toxicologie**

Soutenue publiquement par

Emeline BARBIER

Le 06 Novembre 2023

**Étude des mécanismes physiopathologiques impliqués
dans la toxicité des particules ultrafines chez un modèle
murin : une approche multi-organes**

Composition du jury :

- Président : **Pr Réjane PAUMELLE-LESTRELIN**
- Rapporteur : **Pr Armelle BAEZA**
- Rapporteur : **Dr Sophie LANONE**
- Examineur : **Pr Xavier COUMOUL**
- Examineur : **Dr Jean-Marc LO GUIDICE**
- Directeur de thèse : **Pr Guillaume GARÇON**

École Doctorale Biologie – Santé de Lille

THÈSE DE DOCTORAT

En vue de l'obtention du grade de

Docteur d'Université

Spécialité : **Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie - Toxicologie**

Soutenue publiquement par

Emeline BARBIER

Le 06 Novembre 2023

**Étude des mécanismes physiopathologiques impliqués
dans la toxicité des particules ultrafines chez un modèle
murin : une approche multi-organes**

Composition du jury :

- Président : **Pr Réjane PAUMELLE-LESTRELIN**
- Rapporteur : **Pr Armelle BAEZA**
- Rapporteur : **Dr Sophie LANONE**
- Examineur : **Pr Xavier COUMOUL**
- Examineur : **Dr Jean-Marc LO GUIDICE**
- Directeur de thèse : **Pr Guillaume GARÇON**

Financements

Le projet de recherche PUF-Expo-miR auquel est adossé ce travail de thèse a bénéficié du soutien financier des organismes ci-après :



Remerciements

Dans un premier temps, je souhaiterais vivement remercier Réjane Paumelle-Lestrelin, Armelle Baeza, Sophie Lanone, Xavier Coumoul et Jean-Marc Lo Guidice d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse ainsi que pour le temps consacré à l'évaluation de mon travail. Je sais d'avance que nos échanges seront passionnants !

Je remercie également chaleureusement mon directeur de thèse, le Pr Guillaume Garçon, pour m'avoir encadrée en Master puis en Doctorat, toujours dans la bienveillance. Vous avez su nourrir mon intérêt pour le monde de la recherche et surtout pour le domaine passionnant de la toxicologie ! Je vous remercie pour votre disponibilité, votre pédagogie et votre patience. Merci pour toute la confiance que vous avez pu m'accorder et que vous m'accordez encore aujourd'hui. Enfin, merci pour votre bonne humeur et vos plaisanteries quotidiennes, ne changez rien !

Je remercie une nouvelle fois le Dr. Jean-Marc Lo Guidice, directeur du laboratoire de recherche, pour son accueil chaleureux, sa gentillesse et ses précieux conseils.

Un grand merci au Dr Muriel Pichavant et au Dr Guillemette Crépeaux, membres de mon Comité de Suivi de Thèse, pour leurs conseils et suggestions toujours avisés, de même que pour leurs encouragements tout au long de mon parcours.

Je remercie l'ensemble de mes collègues et amis de l'ULR 4483 - IMPECS, et plus particulièrement la « team Luck » : Jessica Carpentier, Eva Guilloteau, Florence Jacob, Ophélie Simonin, Emma Theerens, Stephan Gabet et Gianni Zarcone, ainsi qu'à Céline et Djamal Achour pour votre bonne humeur et tous les moments de complicité que nous partageons au quotidien. Merci de contribuer activement à mon épanouissement professionnel !

J'ai, bien sûr, une pensée toute particulière pour mon binôme, Jessica Carpentier, qui m'a accompagné tout au long de ce projet de recherche. Merci pour ta patience, ta bienveillance et pour la transmission de ton savoir. La réalisation de ce projet n'aurait pas été possible sans ton expérience technique et scientifique ! Merci pour ta gentillesse et les moments de complicité partagés !

Merci à l'ensemble du corps enseignant de toxicologie et désormais collègues, qui ont su susciter en moi un vif intérêt pour cette discipline fascinante, notamment les Pr Delphine Allorge, Anne Garat, Sébastien Anthérieu et Guillaume Garçon.

La réalisation de ce projet de recherche n'aurait pas été possible sans les nombreuses collaborations. Ainsi, je remercie les Dr Esperanza Perdrix et Laurent Alleman ainsi que Bruno Malet [département SAGE (Sciences de l'Atmosphère et Génie de l'Environnement) de l'Institut Mines Télécom (IMT) Nord-Europe, à Douai] pour la réalisation des prélèvements atmosphériques et la caractérisation physico-chimique des particules. Merci Bruno, d'avoir pris le temps de m'expliquer toutes les subtilités de l'ICP-MS.

Merci au Dr Rodolphe Carpentier et Clément Herkt [Infinite – U1286] pour l'étude granulométrique des particules.

Merci à Kelly Timmerman [Laboratoire Lille Neurosciences et Cognition - U1172] pour avoir pris le temps de nous apprendre, à Jessica et moi, la réalisation des sacrifices par perfusion corps entier, de même que le traitement des échantillons de cerveaux.

Merci au Dr Charlotte Laloux [Laboratoire Lille Neurosciences et Cognition - U1172] pour l'apprentissage des tests comportementaux applicables à notre modèle murin et pour le temps consacré à l'interprétation des résultats obtenus.

Merci au Dr Pierre Gosset [Groupement des Hôpitaux de l'Institut Catholique de Lille] pour l'apprentissage et la réalisation des analyses histologiques, ainsi que pour les observations réalisées ensemble au microscope électronique ! Merci pour votre gentillesse et votre bienveillance. À ce titre, je remercie également Nathalie Goetinck [Centre de Biologie et Pathologie du Centre Hospitalier Universitaire de Lille] pour son accueil et sa gentillesse.

Merci au Dr Jérôme Kluza ainsi qu'à William Layne et Axel Chaumy [Canther – UMR 9020 – U1277] pour m'avoir familiarisée avec ce petit organite essentiel qu'est la mitochondrie ! Merci pour vos conseils avisés.

Merci à Martin Figeac et Shéhérazade Sebda [Plateformes Lilloises en Biologie et Santé, PLBS UAR 2014 – US 41] pour la réalisation des analyses transcriptomiques et l'aide dans l'interprétation des données générées.

Je remercie très affectueusement mes parents, mon frère Charles et ma belle-sœur Alisson, pour m'avoir soutenue et épaulée durant toutes ces années.

Merci à ma cousine Nadia pour avoir été une puissante source d'inspiration tout au long de mon parcours ! Merci également à ma petite cousine, Emma, pour son soutien sans faille !

Merci à ma belle-famille, Pauline, Francis, Lucile, Geoffrey, Patrick et Alexandre pour vos encouragements durant toutes ces années d'« étudiante professionnelle ». Avec un petit (pour ne pas dire immense !) brin de nostalgie, il est temps pour moi de dire aurevoir à ma carte étudiante (et les réductions qui vont avec !), ...à l'aube de mes 30 ans, n'était-il pas temps ?!

J'ai une pensée bienveillante pour mes neveux et nièce : Arthur, Aubin, Evan et Emma. Gardez vos esprits rêveurs et cette petite étincelle qui, j'en suis certaine, vous mènera loin !

Enfin, je dédie ce manuscrit à ma moitié, Gauthier, qui me soutient depuis maintenant 13 ans (et qui m'a donc toujours connue étudiante !). Merci pour ton soutien, tes encouragements mais aussi pour les fous rires partagés !

Je terminerai ces remerciements en ayant une pensée émue pour mes petites souris, dont je me suis occupée avec passion et bienveillance. Bien que vous n'ayez pas toujours été très coopératives lors des tests comportementaux, j'ai fortement apprécié le temps passé en votre compagnie !



Table des matières

Liste des abréviations	3
Valorisations scientifiques.....	16
Avant-propos	18
Partie I : Introduction.....	20
I. La pollution atmosphérique	20
1. Généralités et définitions	20
2. Principaux polluants atmosphériques	21
II. La pollution atmosphérique particulaire.....	25
1. Définition.....	25
2. Classification des particules	25
3. Caractérisation physico-chimique et biologique	32
4. Réglementation et normes internationales et nationales.....	34
5. Niveaux d'exposition des populations.....	35
III. Devenir des particules dans l'organisme	38
1. Physiologie de l'appareil respiratoire	38
2. Histologie de l'épithélium bronchique	39
3. Interactions des particules avec l'appareil respiratoire.....	40
4. Mécanismes de clairance pulmonaire.....	42
5. Translocation systémique des PUF et effets toxiques associés	43
IV. Mécanismes de toxicité des particules ultrafines.....	55
1. Stress oxydant.....	55
2. Inflammation	61
3. Altérations mitochondriales.....	68
4. Mort cellulaire	76
5. Remodelage tissulaire et cancérogénèse	92
6. Altérations épigénétiques : focus sur la dérégulation des miARN	97
Problématique.....	106
Partie II : Matériels et Méthodes	108
I. Matériels chimiques.....	108
1. Prélèvement des particules	108
2. Caractérisation physico-chimique et biologique des PUF.....	109
3. Évaluation du potentiel oxydant des PUF	110
II. Modèle murin	111
III. Protocole d'exposition.....	112
IV. Tests comportementaux.....	113
V. Prélèvement des échantillons biologiques	117
VI. Étude de la toxicité des PUF	118

1. Évaluation de la distribution des PUF	118
2. Mesure de marqueurs biologiques du stress oxydant	119
3. Mesure de la réponse inflammatoire.....	124
4. Évaluation des altérations transcriptomiques	126
5. Analyses statistiques.....	132
Partie III : Résultats et Discussions	134
I. Caractérisation physico-chimique et POTOX des PUF.....	134
1. Caractérisation physico-chimique et biologique des PUF.....	134
2. Potentiel oxydant	140
II. Protocole d'exposition et toxicocinétique des PUF	144
1. Description du protocole d'exposition des souris.....	144
2. Tests comportementaux.....	144
3. Étude de la distribution des PUF	152
III. Mesure de marqueurs biologiques du stress oxydant et de l'inflammation.....	157
1. Mesure des marqueurs biologiques du stress oxydant.....	157
2. Mesure de la réponse inflammatoire.....	167172
VI. Évaluation des altérations transcriptomiques	175
1. Étude du miRnome	175
2. Analyses de l'expression des ARN messagers pulmonaires	181
3. Analyse des voies de signalisation dérégulées par les PUF.....	182
4. Validation fonctionnelle des voies dérégulées par les PUF.....	183
Partie IV : Discussion générale	204
Conclusion et Perspectives	214
Bibliographie	216

Liste des abréviations

4-HNE : 4-Hydroxynonanal

8-IsoP : 8-IsoProstane

8-OHG : 8-HydroxyGuanosine

8-OhdG : 8-Oxo-2'-DésoxyGuanosine

AA : Acide Ascorbique

ADEME : Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ADNc : Acide DésoxyriboNucléique complémentaire

ADNmt : Acide DésoxyriboNucléique mitochondrial

ADP : Adénosine Diphosphate

AEE : Agence Européenne de l'Environnement

AGE : Advanced Glycation End Product

AIF : Apoptosis-Inducing Factor

α -SMA : Alpha Smooth Muscle Actin

AMPK : AMP-activated Protein Kinase

AOPP : Advanced Oxidation Protein Products

ARN : Acide RiboNucléique

ARNm : ARN messagers

ATF : Activating Transcription Factor

ATP : Adénosine Triphosphate

ATR : Ataxia Telangiectasia and Rad3 related

AVC : Accident Vasculaire Cérébral

AhR : Aryl Hydrocarbon Receptor

Akt : protéine kinase B

ApoE : Apolipoprotéine E

Atg : Autophagy Related Gene

BID : BH3 Interacting Domain death agonist

BPCO : Broncho Pneumopathie Chronique Obstructive

BSA : Bovine Serum Albumin

Bak : Bcl-2 Antagonist Killer

Bax : Bcl-2-associated X protein

Bcl2: B-cell leukemia/lymphoma 2
CAT : Catalase
CDH1/2 : Cadhérine 1/2
CDNB : 1-Chloro-2,4-dinitrobenzène
CHEK1 : Checkpoint Kinase 1
CHU : Centre Hospitalier Universitaire
CIRC : Centre International de Recherche sur le Cancer
CM-H2DCFDA : 6-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescéine
COV : Composé Organique Volatil
COVM : Composé Organique Volatil Méthanique
COVNM : Composé Organique Volatil Non Méthanique
COX2 : Cyclooxygénase 2
CREB : C-AMP Response Element-binding protein
CRP : Protéine C-Réactive
CYP : Cytochrome
DAMP : Damage Associated Molecular Pattern
DAPK1 : Death Associated Protein Kinase 1
DCF : 2, 7'-dichlorofluorescéine
DEP : Diesel Exhaust Particles
DIABLO : Diablo IAP-Binding Mitochondrial Protein
DISC : Death Inducing Signal Complex
DPBS : Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
DRP1 : Dynamin-Related Protein 1
DTNB : 5,5-dithio-bis-(acide 2-nitrobenzoïque)
DTT : DiThioThréitol
Dae : Diamètre Aérodynamique Equivalent
EDTA : Acide Ethylène Diamine Tétracétique
EGF : Epidermal Growth Factor
EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor
EOPS : Exempte d'Organismes Pathogènes Spécifiques
EPA : Environmental Protection Agency
EPM : Elevated Plus Maze

ERK : Extracellular signal-Regulated Kinase

ERO : Espèce Réactive de l'Oxygène

ETM : Eléments Traces Métalliques

FADD/MORT1 : Fas-Associated protein with Death Domain

FADH2 : Flavine Adénine Dinucléotide

FC : Fold Change

FELASA : Federation of European Laboratory Science Associations

FGF : Fibroblast Growth Factor

FIS1 : Mitochondrial Fission 1 protein

FMPR : Formylpeptide Receptor

FSP1 : Fibroblast-specific protein

FTH1 : Ferritin Heavy Chain 1

GCLC : Glutamate-Cysteine Ligase Catalytic subunit

GCLM : Glutamate-Cysteine Ligase Modifier subunit

GFAP : Glial Fibrillary Acidic Protein

GO : Gene Ontology

GPX : Glutathione peroxidase

GR : Glutathione reductase

GSEA : Gene Set Enrichment Analysis

GSH : Glutathion Réduit

GSSG : Glutathion Oxydé (disulfure de glutathion)

HAP : Hydrocarbure Aromatique Polycyclique

HBSS : Hank's Balanced Salt Solution

HCB : Hexachlorobenzène

HDL : High Density Lipoproteins

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

HES : Hématoxyline-Éosine-Safran

HIF α : Hypoxia-Inducible Factor α

HMGB1 : High Mobility Group Box 1

HO-1 : Hème Oxygénase 1

HPLC : High Performance Liquid Chromatography

HRP : Peroxydase de Raifor

HSP : Heat Shock Protein

ICP-MS : Spectrométrie de Masse à Plasma à Couplage Inductif

IFN- γ : Interféron γ

IHC : ImmunoHistoChimie

IL : Interleukine

IMT : Institut Mines Télécom

iNOS : Oxyde Nitrique Synthase

INSEE : Institut National de la Statistique et des Etudes Economiques

IP-10 : Interferon Gamma-Induced Protein 10

Ig : Immunoglobuline

InVS : Institut de Veille Sanitaire

JNK : c-Jun N-terminal Kinases

KEAP1 : Kelch-like ECH-Associated Protein 1

KEGG : Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes

KGF : Keratinocyte Growth Factor

LBA : Lavage Broncho Alvéolaire

LC3A/B : Autophagy marker Light Chain 3 A/B

LCN2 : Lipocalin-2

LDLR : Low Density Lipoprotein Receptor

MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase

MCP-1 : Monocyte Chemoattractant Protein

MDA : Malondialdéhyde

MET : Microscopie Electronique à Transmission

MFN : Mitofusine

MGG : May-Grünwald-Giemsa

MGST1 : Microsomal Glutathione S-Transferase 1

MIP : Macrophage Inflammatory Protein

MLKL : Mixed Lineage Kinase domain-Like protein

MMP : Matrix metalloproteinase

mPTP : Pore de Transition de Perméabilité Mitochondriale

MSD : Meso Scale Discovery

Mt : Métallothionéine

mTOR : Mammamao, Target of Rapamycin
MyD88 : Myeloid Differentiation primary response 88
NADH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide
NCOA4 : Nuclear receptor coactivator 4
NFκB : nuclear factor-kappa B
NGS : Next-Generation Sequencing
NOR : Novel Object Recognition
NOS2: Nitric Oxide Synthase 2
NOx : Oxyde d'azote
NQO1 : NAD(P)H Quinone Dehydrogenase 1
NRF2 : Nuclear Factor erythroid-2-related Factor 2
OCDD : Ochtachlorodibenzodioxine
OCDE : Organisation de Coopération et de Développement Économique
OCDF : Ochtachlorodibenzofurane
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
OPA-1 : Optic Atrophy 1
OXPHOS : Phosphorylation Oxydative
PAI-1 : Plasminogen Activator Inhibitor-1
PAMP : Pathogen Associated Molecular Pattern
PBS : Phosphate-Buffered Saline
PCB : PolyChloroBiphényle
PCDD : PolyChloroDibenzo-p-Dioxine
PCDF : PolyChloroDibenzo-Furane
PCR : Polymerase Chain Reaction
PGE2 : Prostaglandine E2
PGES : Prostaglandin E Synthase
PI3K : PhosphoInositide 3-Kinase
PINK1 : PTEN-induced putative kinase 1
PLBS : Plateforme Lilloise en Biologie & Santé
PM : Particulate Matter
pNA : p-NitroAniline
PNN : PolyNucléaire Neutrophile

POP : Polluant Organique Persistant

POTOX : Potentiel Oxydant

PPAR α : Peroxisome proliferator-activated receptor alpha

PPIA : Peptidylprolyl Isomerase A

PPR : Pattern Recognition Receptor

PRDX1 : Peroxirédoxine-1

Prot-CO : Protéine Carbonylée

PTS : Particules Totales en Suspension

PUF : Particules Ultrafines

PVDF : Polyfluorure de vinylidene

RANTES : Regulated on Activation, Normal T cell Expressed and Secreted

RIP : Receptor Interacting Protein

RISC : RNA Induced Silencing Complex

RT : Rétrotranscription

SAA : Serum Amyloid

SAGE : Sciences de l'Atmosphère et Génie de l'Environnement

SDRA : Syndrome de Détresse Respiratoire Aigüe

SIMP : Soluble Intermembrane Mitochondrial Protein

SMAC : Second Mitochondria-derived Activator of Caspase

SOD : SuperOxyde Dismutase

SOPF : Specific Opportunistic and Pathogen Free

SP : Sérum Physiologique

SPF : Santé Publique France

STAT : Signal Transducers and Activators of Transcription

TBS : Tris-Buffered Saline

TBS-T : Tween-Tris-Buffered Saline

TDP-43 : TAR DNA-binding protein 43

TEM : Transition Epithélio-Mésenchymateuse

TGF- β : Transforming Growth Factor Beta

TIMP1: Tissue Inhibitor of Metallo Proteinases 1

TLR : Toll-Like Receptor

TNF- α : Tumor Necrosis Factor alpha

TNFR : Tumor Necrosis Factor Receptor
TOMM20 : Translocase Of Outer Mitochondrial Membrane 20
TRAIL : TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand
TRXR1: Thioredoxin Reductase 1
TXN1/2 : Thiorédoxine ½
TXNIP: Thioredoxin Interacting Protein
UE : Union Européenne
ULK1 : Unc-51-like kinase 1
UMI : Indice Moléculaire Unique
US-EPA : Agence américaine de Protection de l'Environnement
VCAM-1 : Vascular cell adhesion protein 1
VDAC : Voltage-Dependent Anion Channel
ZEB1 : Zinc finger E-box-Binding homeobox 1
ZO-1 : Zonula Occludens-1
vWF : Facteur de Von Willebrand
 $\Delta\phi_m$: Potentiel de Membrane Mitochondrial

Liste des figures

<u>Figure 1</u> : Décès prématurés imputables à la pollution par les particules en suspension dans l'air en 2019, d'après l'OCDE - 2021 (2).....	20
<u>Figure 2</u> : Gamme de taille des particules atmosphériques, d'après ATMO Grand Est - 2021 (11).....	25
<u>Figure 3</u> : Représentation schématique des mécanismes de formation et de dépôt des particules en fonction de leur diamètre aérodynamique équivalent, d'après Whitby - 1976 (13).	27
<u>Figure 4</u> : Mécanismes de formation des particules secondaires, adapté de Falcon-Rodriguez - 2016 (14)...	29
<u>Figure 5</u> : Évolution des émissions dans l'air des Particules totales en suspension depuis 1990 en France (Métropole), selon CITEPA – 2023 (7).....	31
<u>Figure 6</u> : Évolution des émissions dans l'air des PM ₁ depuis 1990 en France (Métropole), selon CITEPA – 2023 (7).	31
<u>Figure 7</u> : Composition chimique moyenne des PM ₁ observées en Europe entre 2013 et 2019, d'après Chen – 2022 : zones urbaines indiquées en marron et zones rurales indiquées en vert (22).	32
<u>Figure 8</u> : Exposition annuelle moyenne de la population aux PM _{2,5} , en µg/m ³ en 1990 et en 2015, d'après l'OCDE - 2017 (48).....	36
<u>Figure 9</u> : Exposition moyenne de la population aux PM _{2,5} , en µg/m ³ , en 2019, d'après l'OCDE - 2022.....	36
<u>Figure 10</u> : Pourcentage de la population exposé à des concentrations de PM _{2,5} supérieures aux valeurs recommandées par l'OMS (10 µg/m ³) en 2019, d'après l'OCDE - 2022 (49).....	37
<u>Figure 11</u> : Anatomie de l'appareil respiratoire.....	38
<u>Figure 12</u> : Structure de l'épithélium des voies respiratoires, adaptée de Adam.D – 2014 (52).....	39
<u>Figure 13</u> : Mécanismes de dépôt des particules inhalées dans les voies respiratoires (55).....	40
<u>Figure 14</u> : Étendue de la biodistribution des particules dans l'organisme, en fonction de leur Dae (57).	41
<u>Figure 15</u> : Pénétration, dépôt et principaux mécanismes pulmonaires d'élimination des particules atmosphériques, adaptée de l'Institut National de Recherche et de Sécurité - 2023.	42
<u>Figure 16</u> : Toxicocinétique des PUF après inhalation, d'après l'Institut de Recherche en Santé et Sécurité du Travail – 2010 (56).....	44
<u>Figure 17</u> : Déséquilibre de la balance pro-oxydants et antioxydants, d'après Sabiha - 2013 (147).....	55
<u>Figure 18</u> : Hiérarchisation des processus biologiques en fonction du rapport GSH/GSSG, d'après Baeza - 2007 (155).	56
<u>Figure 19</u> : Altération intracellulaire du rapport GSH/GSSG et régulation redox des maladies pro-inflammatoires et anti-inflammatoires, d'après Biswas -2009 (149).	57
<u>Figure 20</u> : Voies de signalisation NRF2 et AhR, à l'état basal (à gauche) et en présence de PM (à droite)..	59
<u>Figure 21</u> : Réponse inflammatoire au sein des voies respiratoires, d'après Aghasafari - 2019 (173).....	61
<u>Figure 22</u> : Mécanismes de défense de l'épithélium respiratoire, d'après Jouan – 2016 (182).....	63
<u>Figure 23</u> : Interconnexion des voies de signalisation NFκB et NRF2, d'après Wardyn - 2015 (185).....	64
<u>Figure 24</u> : La chaîne respiratoire mitochondriale.....	69
<u>Figure 25</u> : La mitochondrie : Interactions, dynamique et production d'énergie.	70
<u>Figure 26</u> : Interactions entre la pollution, le stress oxydant et les mitochondries, d'après Geny - 2019.....	72
<u>Figure 27</u> : Deux voies principales de déclenchement de l'apoptose, d'après Couzinet - 227 (227).....	77
<u>Figure 28</u> : Changements morphologiques lors de l'apoptose, d'après Campeau-Péloquin - 2017 (232).	78
<u>Figure 29</u> : Les trois profils autophagiques chez les organismes eucaryotes : macroautophagie, microautophagie et autophagie médiée par les protéines chaperonnes, d'après Parzych - 2014 (235).....	79
<u>Figure 30</u> : Induction de la réponse inflammatoire lors de la nécrose, d'après Kono - 2008 (237).	80
<u>Figure 31</u> : Mécanisme de la mort cellulaire ferroptotique, d'après Lu - 2018 (242).	81
<u>Figure 32</u> : Voies de mort cellulaire induites par la génération d'ERO lors d'une exposition aux PM, d'après Peixoto - 2017 (247).....	83

<u>Figure 33</u> : Apoptose, autophagie et voies de signalisation associées, induites par les PM _{2,5} dans différents organes, d'après Wang - 2021 (249).	85
<u>Figure 34</u> : Processus de transition épithélio-mésenchymateuse et de transition mésenchymato-épithéliale, d'après l'Académie nationale de médecine - 2009 (292).	93
<u>Figure 35</u> : Voies d'induction potentielle de la transition épithélio-mésenchymateuse par les PM _{2,5} , d'après Xu – 2019 (295).	94
<u>Figure 36</u> : Modifications épigénétiques modulant l'expression génique, adapté de Melchior – 2015 (310). 97	
<u>Figure 37</u> : Biogénèse des miARN et dégradation de l'ARNm cible, d'après Dunoyer - 2009 (311).	98
<u>Figure 38</u> : Objectifs du projet de thèse.	107
<u>Figure 39</u> : Site de prélèvements des particules ultrafines et impacteurs en cascade à haut-débit Dekati DGI-1570.	108
<u>Figure 40</u> : Protocoles d'exposition sub-chronique des souris, avec ou sans période de recouvrement (S : Sacrifice).	112
<u>Figure 41</u> : Dispositif d'actimétrie (à gauche) et schéma représentatif du test d'actimétrie (à droite).	113
<u>Figure 42</u> : Dispositif de labyrinthe en croix surélevé (BF : Bras Fermé, BO : Bras Ouvert).	114
<u>Figure 43</u> : Dispositif d'évitement passif (à gauche) et schéma représentatif du test d'évitement passif (à droite).	115
<u>Figure 44</u> : Dispositif du Y-maze spatial et Schéma représentatif du test Y-maze spatial	115
<u>Figure 45</u> : Schéma représentatif du test de reconnaissance d'objet nouveau en 3 phases : habituation, acquisition et rétention.	116
<u>Figure 46</u> : Distribution granulométrique des PM _{0,1}	134
<u>Figure 47</u> : Quantification des endotoxines dans les PUF.	137
<u>Figure 48</u> : Étude du potentiel oxydant des PUF.	141
<u>Figure 49</u> : Suivi du poids corporel des souris lors des périodes d'exposition subchronique avec (b) ou sans (a) période de recouvrement.	144
<u>Figure 50</u> : Vitesse des souris en cm/s (A), distance parcourue en cm (B), temps passé dans le centre de l'arène versus périphérie en % (C), immobilité en % (D), lenteur en % (E) et rapidité en % (F) durant le test de l'actimétrie en openfield.	145
<u>Figure 51</u> : Temps passé dans le bras ouvert et le centre de l'arène (A), Nombre de head dipping (B), de Rearing (C), de grooming (D), de stretch posture (E), nombre de head dipping par seconde dans le bras ouvert (F), nombre de rearing par seconde dans le bras fermé (G), nombre de grooming par seconde dans le bras fermé (H), durant le test du labyrinthe en croix surélevé.	146
<u>Figure 52</u> : Latence d'entrée dans le compartiment sombre pendant les phases d'acquisition et de rétention	147
<u>Figure 53</u> : Temps passé dans le bras nouveau exprimé en % (A), temps passé dans le bras nouveau par rapport au bras connu (B), lors du test du Y-maze spatial	147
<u>Figure 54</u> : : Alternance spontanée exprimée en % (A) et nombre d'entrées dans le bras nouveau (B)	148
<u>Figure 55</u> : Analyses cytologiques de LBA de souris.	152
<u>Figure 56</u> : Observations histologiques de coupes de poumons de souris	152
<u>Figure 57</u> : Images de poumons de souris	153
<u>Figure 58</u> : Images de muscle cardiaque avec présence de mitochondries.	153
<u>Figure 59</u> : Images du corps cellulaire d'un neurone avec son axone chez une souris.	154
<u>Figure 60</u> : Expression génique du AhR, des métallothionéines (i.e., Mt1, 2, 3 et 4) et des cytochromes P450 (i.e., Cyp1a1 et 1b1) dans les organes-cibles, 24 h après l'exposition sub-chronique des souris aux PUF. .	155
<u>Figure 61</u> : Capacité de liaison à l'ADN du facteur de transcription NRF2 dans les organes-cibles.	157

<u>Figure 62</u> : Expression génique de Nrf2 et des gènes sous sa dépendance (i.e., Gclc, Gclm, Gpx1, Gsr, Hmox1, Keap1, Mgst1, Nqo1, Nrf2, Sod1, Txn1) dans les organes-cibles 24h après l'exposition sub-chronique des souris aux PUF	158
<u>Figure 63</u> : Activité enzymatique de la catalase (CAT), de la NAD(P)H quinone déshydrogénase 1 (NQO1) et de la Superoxyde Dismutase (SOD) dans les organes-cibles 24h après l'exposition sub-chronique des souris aux PUF	160
<u>Figure 64</u> : Activité enzymatique de la Glutathion Peroxydase (GPx), de la Glutathion Réductase (GR) et de la Glutathion -S-Transférase (GST) dans les organes-cibles 24h après l'exposition sub-chronique des souris aux PUF.....	161
<u>Figure 65</u> : Ratio GSSG/GSH dans les organes-cibles 24h après l'exposition sub-chronique des souris aux PUF.....	161
<u>Figure 66</u> : Concentrations en 8-OHdG, 4-HNE, Prot-CO, 8-OHG, AGE, AOPP dans les organes-cibles 24 h après l'exposition sub-chronique des souris aux PUF.....	162
<u>Figure 67</u> : Observations histologiques de coupes de poumons de souris.....	167
<u>Figure 68</u> : Capacité de liaison à l'ADN du facteur de transcription NFκB dans les organes-cibles,.....	168
<u>Figure 69</u> : Profils des cytokines dans les organes-cibles 24 h après l'exposition sub-chronique des souris aux PUF.....	171
<u>Figure 70</u> : Nombre de miARN circulants différemment exprimés 24 h après l'exposition sub-chronique des souris aux PUF (FC > 1,5, p < 0,05).	175
<u>Figure 71</u> : Intersections des miARN différemment exprimés 24 h après l'exposition sub-chronique des souris aux PUF (FC > 1,5, p < 0,05).	176
<u>Figure 72</u> : Visualisation des comptages des molécules en log2 par échantillon pour les 18 miARN les plus significatifs.	177
<u>Figure 73</u> : Expression dans les organes-cibles des 18 miARN circulants d'intérêt identifiés comme différemment exprimés 24 h après l'exposition sub-chronique des souris aux PUF (FC = Fold Change, p < 0,05* vs témoins, SP).....	178
<u>Figure 74</u> : Nombre de gènes différemment exprimés dans les poumons	181
<u>Figure 75</u> : Intersections des gènes différemment exprimés dans les poumons	182
<u>Figure 76</u> : Dotplot d'enrichissement avec la base de données Gene Ontology sur les processus biologiques des gènes différemment exprimés dans les poumons 24 h après l'exposition sub-chronique des souris aux PUF.....	182
<u>Figure 77</u> : Dotplot d'enrichissement avec la base de données Gene Ontology sur les fonctions moléculaires des gènes différemment exprimés dans les poumons 24 h après l'exposition sub-chronique des souris aux PUF.....	183
<u>Figure 78</u> : Ensemble de gènes enrichis pour les signatures relatives au stress oxydant chez les souris exposées à la dose de 30 µg de PUF/instillation vs souris témoins exposées au sérum physiologique.	184
<u>Figure 79</u> : Expression des protéines d'intérêt impliquées dans la voie de signalisation NRF2, 24h après l'exposition sub-chronique des souris au SP ou à 30 µg de PUF/instillation	184
<u>Figure 80</u> : Expression des protéines d'intérêt impliquées dans l'homéostasie redox, 24h après l'exposition sub-chronique des souris au SP ou à 30 µg de PUF/instillation.....	185
<u>Figure 81</u> : Ensemble de gènes enrichis pour les signatures relatives à la réponse immunitaire et inflammatoire chez les souris exposées à la dose de 30 µg de PUF/instillation vs souris témoins exposées au sérum physiologique.....	186
<u>Figure 82</u> : Expression des protéines F4/80, iNOS et CD163 exprimée dans %, 24h après l'exposition sub-chronique des souris aux PUF	187
<u>Figure 83</u> : Expression des protéines impliquées dans la polarisation macrophagique, 24h après l'exposition sub-chronique des souris au SP ou à 30 µg de PUF/instillation.....	187

<u>Figure 84</u> : Expression des protéines impliquées dans la voie de signalisation NFκB, 24h après l'exposition sub-chronique des souris au SP ou à 30 µg de PUF/instillation.....	188
<u>Figure 85</u> : Ensemble de gènes enrichis pour les signatures relatives à la fonction mitochondriale.....	190
<u>Figure 86</u> : Images de mitochondries pulmonaires.....	191
<u>Figure 87</u> : Capacité respiratoire mitochondriale pulmonaire, exprimée en pmol/min/µg de protéines, 24 h après l'exposition sub-chronique des souris aux PUF.....	191
<u>Figure 88</u> : Expression des protéines de la chaîne respiratoire mitochondriale (OXPHOS), 24h après l'exposition sub-chronique des souris au SP ou à 30 µg de PUF/instillation.....	192
<u>Figure 89</u> : Expression des protéines impliquées dans la masse mitochondriale, 24h après l'exposition sub-chronique des souris au SP ou à 30 µg de PUF/instillation.....	192
<u>Figure 90</u> : Expression des protéines impliquées dans la fission mitochondriale, 24h après l'exposition sub-chronique des souris au SP ou à 30 µg de PUF/instillation.....	192
<u>Figure 91</u> : Expression des protéines impliquées dans la fusion mitochondriale, 24h après l'exposition sub-chronique des souris au SP ou à 30 µg de PUF/instillation.....	193
<u>Figure 92</u> : Expression des protéines impliquées dans la mitophagie, 24h après l'exposition sub-chronique des souris au SP ou à 30 µg de PUF/instillation.....	193
<u>Figure 93</u> : Expression des protéines impliquées dans l'autophagie 24h après l'exposition sub-chronique des souris au SP ou à 30 µg de PUF/instillation.....	196
<u>Figure 94</u> : Expression des protéines impliquées dans l'apoptose, 24h après l'exposition sub-chronique des souris au SP ou à 30 µg de PUF/instillation.....	197
<u>Figure 95</u> : Expression des protéines impliquées dans la nécroptose, 24h après l'exposition sub-chronique des souris au SP ou à 30 µg de PUF/instillation.....	197
<u>Figure 96</u> : Expression de la protéine FTH1 impliquée dans la ferroptose, 24h après l'exposition sub-chronique des souris au SP ou à 30 µg de PUF/instillation.....	198
<u>Figure 97</u> : Ensemble de gènes enrichis pour les signatures relatives au remodelage tissulaire chez les souris exposées à la dose de 30 µg de PUF/instillation vs souris témoins exposées au sérum physiologique.	199
<u>Figure 98</u> : Expression des protéines impliquées dans le remodelage tissulaire et la transition épithélio-mésenchymateuse, 24h après l'exposition sub-chronique des souris au SP ou à 30 µg de PUF/instillation. .	200
<u>Figure 99</u> : Schéma récapitulatif des résultats obtenus dans le cadre de ce projet de recherche.	213

Liste des tableaux

<u>Tableau 1</u> : Evolution des émissions de polluants organiques persistants entre 1990 et 2021 en % (7).	23
<u>Tableau 2</u> : Evolution des émissions de métaux lourds entre 1990 et 2021 en % (7).	24
<u>Tableau 3</u> : Classification granulométrique des particules (12).	26
<u>Tableau 4</u> : Classification des particules en fonction de leur mode de formation (13).	27
<u>Tableau 5</u> : Classification des particules en fonction de leur nature primaire ou secondaire (14, 15).	28
<u>Tableau 6</u> : Origine et composition des différentes sources d'émissions naturelles (15).	30
<u>Tableau 7</u> : Sources et répartition par Dae des différents secteurs responsables des sources d'émissions anthropiques (7).	30
<u>Tableau 8</u> : Valeurs guides préconisées par l'OMS et valeurs limites réglementaires	35
<u>Tableau 9</u> : Mécanismes d'élimination des PUF déposées au niveau pulmonaire (54).	43
<u>Tableau 10</u> : Résumé des études in vivo citées analysant les effets des PUF sur la santé respiratoire	46
<u>Tableau 11</u> : Résumé des études épidémiologiques citées analysant les effets des PUF sur la santé respiratoire	47
<u>Tableau 12</u> : Résumé des études in vivo citées analysant les effets des PUF sur la santé cardiovasculaire... ..	49
<u>Tableau 13</u> : Résumé des études épidémiologiques citées analysant les effets des PUF sur la santé cardiovasculaire	50
<u>Tableau 14</u> : Résumé des études in vivo citées analysant les effets des PUF sur la santé neurologique.....	52
<u>Tableau 15</u> : Résumé des études épidémiologiques citées analysant les effets des PUF sur la santé neurologique	53
<u>Tableau 16</u> : Résumé des études citées analysant l'induction d'un stress oxydant par les PUF	60
<u>Tableau 17</u> : Résumé des études citées analysant l'induction d'une inflammation par les PUF	66
<u>Tableau 18</u> : Résumé des études citées analysant l'induction d'altérations mitochondriales par les PUF.....	73
<u>Tableau 19</u> : Comparaison des caractéristiques de l'apoptose, de l'autophagie, de la nécrose et de la ferroptose	82
<u>Tableau 20</u> : Résumé des études citées analysant l'induction de l'apoptose, de l'autophagie, de la nécrose et de la ferroptose par les PM _{2,5}	87
<u>Tableau 21</u> : Résumé des études citées analysant l'induction de l'apoptose et de l'autophagie par les PUF. ..	90
<u>Tableau 22</u> : Résumé des études citées analysant l'induction de la transition épithélio-mésenchymateuse par les PUF.	95
<u>Tableau 23</u> : Principaux miARN pouvant potentiellement servir de biomarqueurs d'exposition et/ou d'effet aux PM.	102
<u>Tableau 24</u> : Tissus, matrices, stockage et volets d'étude utilisés pour les approches toxicologiques.....	117
<u>Tableau 25</u> : Liste des amorces utilisés pour étudier le métabolisme des HAP et la séquestration des métaux.	119
<u>Tableau 26</u> : Liste des amorces utilisés pour étudier la voie de signalisation NRF2.	120
<u>Tableau 27</u> : Liste des anticorps employés lors des Western Blot ciblant des protéines d'intérêt impliquées dans l'homéostasie redox et la voie de signalisation Nrf2.	122
<u>Tableau 28</u> : Liste des anticorps employés lors des Western Blot ciblant des protéines d'intérêt impliquées dans la polarisation macrophagique M1-M2.	125
<u>Tableau 29</u> : Liste des anticorps employés lors des Western Blot ciblant des protéines d'intérêt impliquées dans la voie de signalisation NFκB	126
<u>Tableau 30</u> : Liste des miARN d'intérêt sélectionner à rechercher dans les organes-cibles.	127
<u>Tableau 31</u> : Liste des miARN candidats sélectionnés comme références dans chaque organe-cible.	128
<u>Tableau 32</u> : Liste des anticorps employés lors des Western Blot ciblant des protéines d'intérêt impliquées dans la biogénèse, la dynamique et la masse mitochondriales	130

<u>Tableau 33</u> : Liste des anticorps employés lors des Western Blot ciblant des protéines d'intérêt impliquées dans l'autophagie, l'apoptose, la nécroptose et la ferroptose.	131
<u>Tableau 34</u> : Liste des anticorps employés lors des Western Blot ciblant des protéines d'intérêt impliquées dans la transition épithélio-mésenchymateuse.	132
<u>Tableau 35</u> : Composition élémentaire relative des PUF (n = 3).	135
<u>Tableau 36</u> : Quantification de la composition en HAP des PUF par HPLC.	135
<u>Tableau 37</u> : Quantification de la composition en PCB par GC/HRMS.	136
<u>Tableau 38</u> : Quantification de la composition en dioxines et furannes par GC/HRMS.	137
<u>Tableau 39</u> : Enrichissement en métaux des organes-cibles après l'exposition sub-chronique des souris aux PUF.	154
<u>Tableau 40</u> : Numération cellulaire des LBA 24h après l'exposition sub-chronique des souris aux PUF (en %) (D1 = 10 µg, D2 = 30 µg de PUF, n = 6/groupe).	167
<u>Tableau 41</u> : Tableau récapitulatif des résultats obtenus.	204

Valorisations scientifiques

➤ Publications internationales à comité de lecture :

- **Barbier E.**, Carpentier J., Simonin O., Gosset P., Platel A., Happillon M., Alleman L.Y., Perdrix E., Véronique Riffault, Chassat Thierry, Lo Guidice J.-M., Anthérieu S., Garçon G. (2023). Oxidative stress and inflammation induced by air pollution-derived PM_{2.5} persist in the lungs of mice after cessation of their sub-chronic exposure. (Environ Int. 181:108248. doi: 10.1016/j.envint.2023.108248).
- **Barbier E.**, Simonin O., Carpentier J., Theerens E., Happillon M., Alleman L.Y., Perdrix E., Véronique Riffault, Nessler F., Lo Guidice J.-M., Anthérieu S., Platel A., Garçon G. Persistence of air pollution-derived PM_{2.5}-related genetic and epigenetic alterations in mouse lungs after cessation of sub-chronic exposure. (submitted for publication in Environment International).

➤ Communications internationales ou nationales orales :

1. **Barbier, E.**, Anthérieu, S., Grare, C., Theerens, E., Alleman, L.Y., Perdrix, E., Lo Guidice, J.-M., Garçon, G. (2021) Emerging role of epigenetic alterations in the lung inflammation and tissue remodeling induced by air pollution-derived PM_{2.5} in mice. EUROTOX 2021 Virtual Congress.
2. **Barbier, E.**, Anthérieu, S., Happillon, M., Alleman, L.Y., Perdrix, E., Chassat, T., Lo Guidice, J.-M., Garçon, G. (2021) Oxidative stress and inflammation induced by air pollution-derived PM_{2.5} persist in the lungs of mice after cessation of their subchronic exposure. Journée des doctorants de l'IREPSE, 2022, Villeneuve d'Ascq, France.
3. **Barbier, E.**, Anthérieu, S., Gosset, P., Simonin, O., Grare, C., Carpentier, J., Alleman, L.Y., Perdrix, E., Lo Guidice, J.-M., Garçon, G. (2022). Transcriptomic alterations trigger lung inflammation and tissue remodeling in mice exposed to air pollution-derived PM_{2.5}. Webinaire STCM, 2022, France.
4. **Barbier, E.**, Carpentier, J., Gosset, P., Simonin, O., Anthérieu, S., Alleman, L.Y., Perdrix, E., Lo Guidice, J.-M., Garçon, G. (2022). Oxidative stress, inflammation, and transcriptomic alterations induced by air pollution-derived PM_{2.5} persist in the lungs of mice after cessation of their subchronic exposure. 2ème réunion annuelle - FHU RESPIRE 2022 (Webinaire).
5. **Barbier, E.**, Carpentier, J., Gosset, P., Simonin, O., Anthérieu, S., Alleman, L.Y., Perdrix, E., Lo Guidice, J.-M., Garçon, G. (2022). Oxidative stress and inflammation induced by air pollution-derived ultrafine particles chronic exposure in mice: a multiorgan approach. ICT 2022, Maastricht, The Netherlands.
6. **Barbier, E.**, Carpentier, J., Gosset, P., Simonin, O., Anthérieu, S., Alleman, L.Y., Perdrix, E., Lo Guidice, J.-M., Garçon, G. (2022). Oxidative stress and inflammation induced by air pollution-derived ultrafine particles chronic exposure in mice: a multiorgan approach. 1er congrès annuel - FHU RESPIRE 2022, Forges-les-Eaux, France. **Prix de la meilleure présentation orale.**
7. **Barbier, E.**, Carpentier, J., Gosset, P., Simonin, O., Anthérieu, S., Alleman, L.Y., Perdrix, E., Lo Guidice, J.-M., Garçon, G. (2022). Oxidative stress and inflammation induced by air pollution-derived ultrafine particles chronic exposure in mice: a multiorgan approach. Journée André Verbert de l'Ecole Doctorale Biologie-Santé de Lille, Faculté de médecine de Lille, France. **Prix de la meilleure présentation orale.**

8. **Barbier, E.** (2022). Utilisation des profils de miARN circulants comme indicateurs de l'exposition chronique aux particules ultrafines chez un modèle murin. Save your Friday's – Colloque de l'UFR3S- Université de Lille, Lille, France.
9. **E. Barbier, J. Carpentier, O. Simonin, A. Chaumy, W. Laine, S. Anthérieu, P. Marchetti, J.-M. Lo Guidice, J. Kluza, G. Garçon** (2023). Mitochondrial dysfunction triggered by air pollution-derived ultrafine particles chronic exposure in the lungs of Balb/cJRj mice. EUROTOX 2023, Ljubljana, Slovénie.

➤ **Communications internationales ou nationales affichées :**

1. **Barbier, E., Anthérieu, S., Hapillon, M., Alleman, L.Y., Perdrix, E., Chassat, T., Lo Guidice, J.-M., Garçon, G.** (2021) Oxidative stress and inflammation induced by air pollution-derived PM_{2.5} persist in the lungs of mice after cessation of their subchronic exposure. EUROTOX 2021 Virtual Congress.
2. **Barbier, E., Anthérieu, S., Grare, C., Theerens, E., Alleman, L.Y., Perdrix, E., Lo Guidice, J.-M., Garçon, G.** (2021) Emerging role of epigenetic alterations in the lung inflammation and tissue remodeling induced by air pollution-derived PM_{2.5} in mice. EUROTOX 2021 Virtual Congress.
3. **Barbier, E., Carpentier, J., Gosset, P., Simonin, O., Anthérieu, S., Alleman, L.Y., Perdrix, E., Lo Guidice, J.-M., Garçon, G.** (2022). Oxidative stress and inflammation induced by air pollution-derived ultrafine particles chronic exposure in mice: a multiorgan approach. ICT 2022, Maastricht, The Netherlands.
4. **Barbier, E., Carpentier, J., Simonin, O., Figeac, M., Anthérieu, S., Alleman, L.Y., Perdrix, E., Lo Guidice, J.-M., Garçon, G.** (2022). Profile signatures of circulating miRNAs and contribution of organ-specific miRNAs in a mouse model chronically exposed to air pollution-derived ultrafine particles. ICT 2022, Maastricht, The Netherlands.
5. **Barbier, E., Carpentier, J., Gosset, P., Simonin, O., Anthérieu, S., Alleman, L.Y., Perdrix, E., Lo Guidice, J.-M., Garçon, G.** (2022). Oxidative stress and inflammation induced by air pollution-derived ultrafine particles chronic exposure in mice: a multiorgan approach. 1er congrès annuel - FHU RESPIRE 2022, Forges-les-Eaux, France.
6. **E. Barbier, J. Carpentier, O. Simonin, M. Figeac, S. Sebda, L.Y. Alleman, E. Perdrix, J.-M. Lo-Guidice, S. Antherieu, G. Garçon** (2023). Transcriptomic alterations induced by air pollution-derived ultrafine particles in lungs of mice chronically exposed - EUROTOX 2023, Ljubljana, Slovénie.
7. **E. Barbier, J. Carpentier, O. Simonin, A. Chaumy, W. Laine, S. Anthérieu, P. Marchetti, J.-M. Lo Guidice, J. Kluza, G. Garçon** (2023). Mitochondrial dysfunction triggered by air pollution-derived ultrafine particles chronic exposure in the lungs of Balb/cJRj mice. EUROTOX 2023, Ljubljana, Slovénie.

Avant-propos

Bien que la pollution atmosphérique ait nettement diminuée ces dernières décennies, elle demeure la première cause environnementale de mortalité dans le monde, l'ensemble de la population humaine étant incontestablement exposé aux effets néfastes d'une exposition prolongée, les risques encourus à court terme demeurant le plus souvent relativement modestes. Les données épidémiologiques suggèrent que l'impact sanitaire à long terme reste très élevé du fait de la densité des populations vivant en sites urbains influencés par de multiples sources d'émissions. Dans de nouvelles estimations publiées en 2019, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) indique que 4,2 millions de décès prématurés ont été causés par la pollution de l'air extérieur dans le monde, par cardiopathies ischémiques (40%), accidents vasculaires cérébraux (40%), bronchopneumopathies chroniques obstructives (11%), cancers du poumon (6%) et infections aiguës des voies respiratoires inférieures chez l'enfant (3%). En dépit du fait qu'il soit, à l'heure actuelle, difficile d'identifier avec précision le(s) polluant(s) responsable(s) de l'impact sanitaire de la pollution atmosphérique, les données expérimentales et épidémiologiques issues de la littérature soulignent l'importance capitale de la matière particulaire (ou particulate matter, PM), et plus particulièrement des particules fines ($PM_{2,5}$), faute de données à ce jour suffisantes vis-à-vis des particules ultrafines ($PM_{0,1}$ ou PUF). En effet, ce n'est que plus récemment que le rôle clé des PUF a émergé, les teneurs atmosphériques de ces polluants n'évoluant plus favorablement en raison de la multiplicité de leurs sources (*e.g.*, secteur résidentiel, trafic automobile, combustion de biomasse, industries métallurgiques). Cependant, même si les PUF n'entrent pas en tant que telles dans la réglementation en vigueur et qu'elles ne correspondent qu'à une faible masse des $PM_{2,5}$ (*i.e.*, de l'ordre de 1 à 8 %), elles sont, en nombre, très présentes dans la fraction fine des aérosols atmosphériques (*i.e.*, de l'ordre de 90%). A masse égale, la réactivité de surface et la solubilité supérieures des PUF laissent augurer une activité biologique plus importante que celles des particules de diamètres aérodynamiques équivalents supérieurs, ce qui suggère qu'un même composé serait plus toxique après inhalation sous forme de PUF que de PM_{10} ou de $PM_{2,5}$. Or, du fait de leur capacité à migrer profondément dans l'arbre respiratoire, à échapper aux clairances mucociliaire et alvéolaire, et à transloquer dans la circulation systémique, les PUF peuvent atteindre l'ensemble des organes périphériques, bien que leur cible privilégiée soit l'appareil respiratoire. Leur interaction avec l'épithélium bronchique est à l'origine de divers processus physiopathologiques ayant pour conséquences le développement et/ou l'exacerbation de pathologies respiratoires telles que des maladies inflammatoires chroniques ou des cancers. Même si de nombreuses études expérimentales montrent que les PUF constituent une réelle préoccupation sanitaire, elles n'ont porté que rarement sur les PUF urbaines et de nombreuses inconnues subsistent sur leur comportement physique et leur impact biologique au sein des organismes après leur inhalation. De plus, la toxicodynamie des PUF a le plus souvent été décrite suite à l'extrapolation de résultats issus de modèles murins exposés à des nanoparticules manufacturées ou des PUF spécifiques (*i.e.*, particules diesel = DEP) selon des protocoles (*i.e.*, doses, modes d'administration) le plus souvent trop peu représentatifs des expositions environnementales. C'est pourquoi, afin de mieux appréhender la toxicité des cocktails de polluants, présents généralement à de très faibles concentrations, que représentent les PUF, de définir des valeurs réglementaires de protection, et de guider les programmes de prévention, il est urgent de développer des outils d'estimation de l'exposition chronique et/ou cumulée aux PUF ou de l'effet des PUF, en intégrant, de par l'étude des interactions de type gène/environnement, les différences de sensibilité des individus face à ces polluants. C'est dans ce contexte que s'est inscrit mon projet de thèse, dont l'objectif général était d'apporter des éléments novateurs et originaux sur la toxicocinétique et la toxicodynamie des PUF, nécessaires à l'amélioration des connaissances scientifiques, de même qu'à l'instauration et/ou à l'actualisation de mesures de prévention ayant pour finalité la protection des populations les plus exposées aux PUF.

Partie I : Introduction

I. La pollution atmosphérique

1. Généralités et définitions

La pollution atmosphérique, considérée en 2019 comme étant le premier facteur de risque environnemental pour la santé par l'OMS, représente à ce jour une préoccupation majeure de santé publique. En effet, cette pollution, définie en 2011 par l'OMS comme étant « *la contamination de l'environnement intérieur ou extérieur par tout agent chimique, physique ou biologique qui modifie les caractéristiques naturelles de l'atmosphère* », touche près de 99 % de la population humaine et est responsable, pour ce qui est de la pollution extérieure, de près de 4,2 millions de décès prématurés par an dans le monde (OMS, 2022) (1). En outre, l'Organisation de Coopération et de Développement Économique (OCDE) estime que 20 et 29 décès sur 100 000 lui serait respectivement imputable en France et au sein des pays membres de l'OCDE, et qu'elle pourrait entraîner le décès prématuré de 6 à 9 millions de personnes par an, à l'échelle mondiale, d'ici 2060 (figure 1) (2). Par ailleurs, l'Agence Européenne de l'Environnement (AEE) estimait qu'au sein de l'Union Européenne, 307 000 décès prématurés étaient imputables à la pollution de l'air en 2019 et que près de 58 % de ces décès auraient pu être évités si les préconisations de l'OMS avaient alors été respectées. L'AEE a également estimé qu'en 2021, les particules fines étaient responsables de 238 000 décès prématurés en Europe, contre respectivement 49 000 et 24 000 pour le dioxyde d'azote (NO₂) et l'ozone (O₃) troposphérique (3). Selon une estimation de Santé Publique France (SPF), datant de 2021, au niveau national, les particules fines seraient responsables d'une diminution de l'espérance de vie de près de 8 mois avec près de 40 000 décès de personnes âgées de 30 ans et plus chaque année, représentant 7% de la mortalité en France (4). En 2019, la pollution de l'air a également été considérée par l'Health Effects Institute comme étant le 4^{ème} facteur de risque de mortalité dans le monde après l'hypertension artérielle, le tabagisme et la mauvaise alimentation (5).

Graphique 4.21. Décès prématurés imputables à la pollution par les particules en suspension dans l'air, 2019

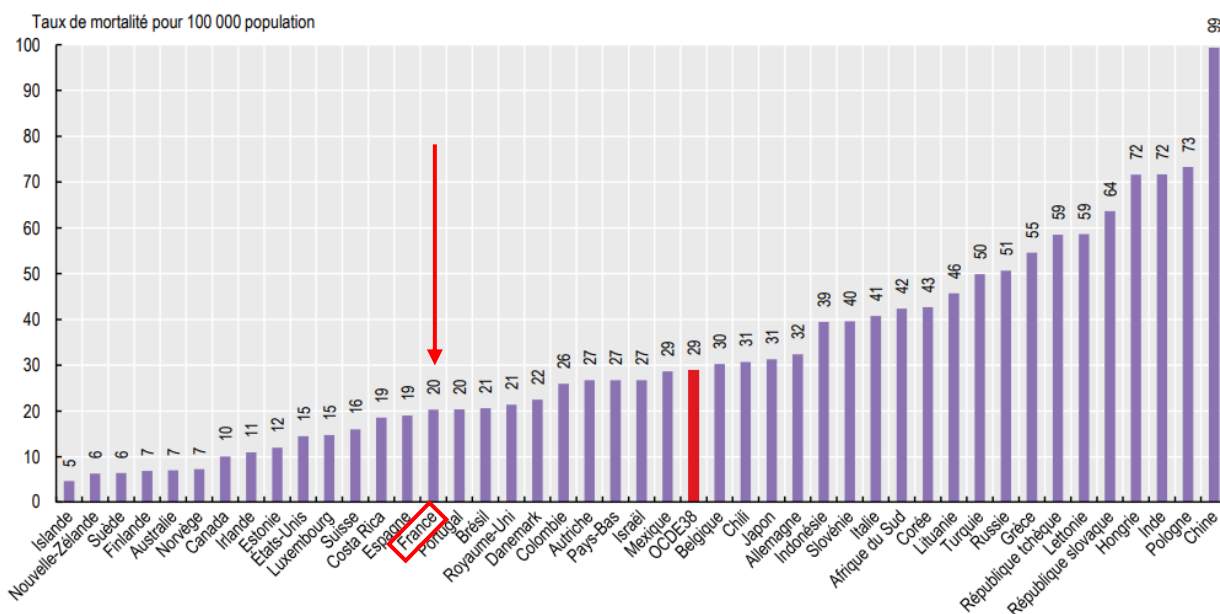


Figure 1 : Décès prématurés imputables à la pollution par les particules en suspension dans l'air en 2019, d'après l'OCDE - 2021 (2).

Contrairement aux idées reçues, la pollution atmosphérique n'est pas une problématique récente, des vestiges de pollution datant de l'Antiquité ayant été identifiés dans les Alpes par des techniques de datation au 14C (6). À l'époque, la principale source de pollution incriminée était l'extraction minière intensive, indispensable à l'élaboration des pièces de monnaie et des systèmes de conduits desservant les villes, émettrice de particules métalliques chargées en plomb et en antimoine. L'apparition des premières lois et normes relatives à la pollution de l'air n'apparaîtront pourtant qu'à la suite du Grand Smog de 1952 qui provoqua le décès de près de 12000 londoniens. C'est plus particulièrement l'adoption du « Clean Air Act » britannique en 1956 qui a permis de réduire la pollution des sources dites « fixes » en restreignant essentiellement l'utilisation de combustibles polluants par l'industrie. Avec l'expansion du trafic routier, l'impact sur les sources dites « mobiles » n'a été, quant à lui, que limité.

2. Principaux polluants atmosphériques

La pollution atmosphérique est constituée d'aérosols qui se répartissent en deux phases :

- La phase **gazeuse**, composée en majorité de dioxyde d'azote (NO₂), de dioxyde de soufre (SO₂), de monoxyde de carbone (CO), d'ammoniac (NH₃), d'ozone (O₃), de composés organiques volatils (COV) et d'hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) dits « légers » ne comprenant que 2 ou 3 cycles aromatiques.
- La phase **particulaire**, constituée de métaux lourds et de matières particulaires, plus souvent désignées par le terme anglais « particulate matter » (PM).

1. Monoxyde de carbone

Le monoxyde de carbone est un gaz qui trouve son origine dans la combustion incomplète de matières carbonées (bois, charbon, pétrole...) du fait d'un apport insuffisant en oxygène. Outre ses sources naturelles (feux de forêt, éruptions volcaniques, orages...), ce dernier est issu d'activités anthropiques. En effet, en 2021, le secteur des bâtiments et activités tertiaires et résidentielles représentait 52 % des émissions du fait de l'utilisation d'appareils de chauffage mal entretenus et/ou mal employés tandis que le secteur des industries de l'énergie et manufacturières représentait 26 %, provenant notamment des métallurgies, des raffineries ou encore des incinérateurs de déchets (7). Le trafic routier représentait quant à lui 15 % de ces émissions de CO, s'expliquant par le relargage des gaz d'échappement. Enfin, seuls 5 % des émissions provenaient du secteur agricole et sylvicole. Ces émissions ont néanmoins diminué de 82 % depuis 1990, du fait de l'utilisation d'appareils plus performants, l'utilisation de pots catalytiques et de moteurs diesel.

L'affinité du CO pour l'hémoglobine étant 210 fois supérieure à celle de l'oxygène, il empêche ce dernier de se fixer, créant un phénomène d'hypoxie cellulaire. Si le taux de carboxyhémoglobine est trop important, divers symptômes pourront se manifester tels que des vomissements, des vertiges, des céphalées voire le coma.

2. Oxydes d'azote

Les oxydes d'azote (NO_x) sont un ensemble de gaz irritants contenant de l'azote et de l'oxygène dont les deux principaux représentants sont le monoxyde d'azote (NO) et le dioxyde d'azote (NO₂). Ces composés sont issus de 3 modes de formation distincts (ADEME, 2018) :

- L'oxydation de l'azote présents dans les combustibles lors d'un processus de combustion, qui donne les **NO_x combustibles**.

- La combinaison chimique de l'oxygène et de l'azote durant un processus de combustion à très haute température, qui donne les **NOx thermiques**.
- La combinaison chimique de l'azote présent dans l'air avec des radicaux hydrocarbonés, qui se recombinaient ensuite avec de l'oxygène, et qui donne les **NOx précoces**.

En 2021, ces molécules trouvaient majoritairement leurs sources dans le secteur des transports à hauteur de 49 % (combustion de combustibles fossiles ou biomasse), dans le secteur de l'agriculture/sylviculture à hauteur de 23 % et enfin dans le dans le secteur de l'industrie de l'énergie et manufacturière (métallurgies, cimenteries) à hauteur de 13 %. Néanmoins, ces émissions ont diminué de 63 % depuis 1990 grâce à l'utilisation de dispositifs d'épuration catalytiques sur les voitures, au développement de systèmes de traitement dans l'industrie et au développement d'énergies renouvelables (7).

Après pénétration dans les alvéoles pulmonaires, ces gaz sont susceptibles d'entraîner de graves troubles pulmonaires et une susceptibilité aux infections accrue.

3. Ozone

L'ozone est un gaz résultant de transformations photochimiques entre polluants primaires de l'atmosphère (*e.g.*, CO, NOx, COV). Il nécessite donc la présence de précurseurs chimiques pour être formé. En effet, les émissions naturelles ou anthropiques de ce gaz sont quasiment inexistantes.

Au niveau stratosphérique, ce gaz forme une couche protectrice vis-à-vis des rayonnements ultraviolets appelée « couche d'ozone ». A contrario, au niveau troposphérique, il a un effet néfaste sur la santé humaine et les écosystèmes. En effet, des études ont montré qu'il était responsable de maladies cardiovasculaires et de divers troubles respiratoires tels que l'asthme (8,9).

4. Ammoniac

L'ammoniac est un composé chimique en grande partie issu du secteur agricole/sylvicole. En effet, ce dernier était responsable de 94 % des émissions d'ammoniac en 2021, notamment du fait de l'utilisation des déjections animales et d'engrais azotés pour la fertilisation des cultures, résultant en l'acidification et l'eutrophisation des écosystèmes (7). Cette molécule participe activement à la formation de particules fines sous forme de sels d'ammonium, en fusionnant avec des oxydes d'azote ou de soufre. Depuis 1990, les émissions d'ammoniac n'ont diminué que de 8 % malgré la réduction du nombre de bétail, la réduction de l'utilisation des engrais azotés et le développement de l'agriculture biologique.

5. Composés Organiques Volatils

Les COV sont un groupe de molécules hétérogènes, de structures variables appartenant à des familles chimiques distinctes (aldéhydes, cétones, hydrocarbures halogénés et aromatiques, alcanes, ...) et dont les représentants les plus connus sont le benzène, le toluène, le xylène et le formaldéhyde. Ces composés sont caractérisés par la présence d'au moins un atome de carbone et d'un ou plusieurs atomes d'hydrogènes, d'halogènes, d'oxygène, de soufre, de phosphore, de silicium ou d'azote, à l'exception des oxydes de carbone, des carbonates et des bicarbonates inorganiques, et par une grande volatilité dans l'atmosphère.

La directive européenne n°1999/13/CE du 11 mars 1999 offre une définition plus précise et définit le COV comme « tout composé organique ayant une pression de vapeur de 0,01 kPa ou plus à une température de 293,15 K (20 °C) ou ayant une volatilité correspondante dans les conditions d'utilisation particulières.

Il est communément admis de distinguer les COV méthaniques (COVM) des COV non méthaniques (COVNM), le méthane (CH₄) étant un gaz naturellement présent dans l'air. En 2021, ces COVNM provenaient majoritairement des processus de combustion et d'évaporation et avaient pour principales sources les secteurs tertiaire et résidentiel (37 %), le secteur agricole et sylvicole (35%), le secteur industriel (22 %) et le secteur des transports (5 %). Cela s'explique notamment par l'utilisation de solvants et de peintures par les particuliers et les industriels mais également par les installations de combustion industrielles et domestiques. Depuis 1990, ces émissions de COVNM ont diminué de 67 %, notamment grâce à l'utilisation des pots catalytiques et de filtres à charbon actif, à la diésélisation et également à la réduction de l'utilisation des solvants (7).

La toxicité des COV est très variable et dépendante du composé considéré, constituant un enjeu sanitaire majeur à l'heure actuelle. Des études ont identifié les COV fortement volatils comme étant les plus nocifs. Parmi eux, sont retrouvés certains COV de la famille des hydrocarbures aromatiques tels que le benzène ou le toluène qui, sur le long terme, ont des effets cancérogènes, mutagènes et reprotoxiques et font donc l'objet d'une réglementation plus stricte notamment dans le cadre professionnel. En parallèle, sont retrouvés des COV ayant des effets sanitaires moindres tels qu'une gêne respiratoire, un pouvoir allergisant ou une irritation des muqueuses.

6. Polluants organiques persistants

Les polluants organiques persistants (POP) sont un groupe de molécules caractérisées par 4 propriétés fondamentales : la toxicité, la persistance dans l'environnement, la bioaccumulation et la capacité de transport sur de très longues distances (ADEME, 2017). Les principaux représentants de cette catégorie de substances sont : les dioxines et furanes (PCDD-F), les HAP, les polychlorobiphényles (PCB) et l'hexachlorobenzène (HCB). Ces composés trouvent leur origine dans les processus de combustion des déchets, des combustibles minéraux solides, de biomasse mais également lors de la production d'électricité et de produits chlorés, la métallurgie et l'épandage de pesticides. Ainsi, les principaux secteurs impliqués sont ceux de l'énergie, de l'industrie, de la gestion des déchets de l'agriculture (tableau 1). Depuis 1990, les émissions de POP sont en nette diminution notamment grâce au traitement des effluents atmosphériques des usines de traitement des déchets, du renouvellement des équipements domestiques, de la diminution de la consommation de charbon et de l'interdiction de l'utilisation de l'hexachloroéthane durant l'affinage de l'aluminium.

Tableau 1 : Evolution des émissions de polluants organiques persistants entre 1990 et 2021 en %, d'après Citepa - 2023 (7).

		PCDD-F	HAP	PCB	HCB
Répartition par secteur en 2021 (%)	Industrie de l'énergie	9	2	11	15
	Industrie manufacturière et construction	9	3	56	11
	Traitement des déchets	0	0	1	14
	Usage des bâtiment et activités résidentielles/tertiaires	72	82	31	6
	Agriculture, Sylviculture	2	2	1	54
	Transports	8	11	0	0
Évolution des émissions entre 1990 et 2021		-93 %	-19 %	-80 %	-99 %

7. Métaux lourds

De nombreux métaux de densité élevée sont émis dans l'atmosphère sous forme particulaire à la suite de processus de combustion. Il s'agit principalement du plomb (Pb), du cadmium (Cd), du cuivre (Cu), du nickel (Ni), de l'arsenic (As), du chrome (Cr), du zinc (Zn), du sélénium (Se) et également du mercure (Hg) qui, quant à lui, est retrouvé sous forme gazeuse. Ces métaux sont issus de la combustion de carburants, de fioul, de combustibles minéraux solides et de biomasse, de l'incinération des déchets, de la métallurgie, de la verrerie et de la sidérurgie, de la fabrication de batteries électriques et également par l'usure des routes. À l'exception du cuivre, ces émissions ont très largement diminué depuis 1990 principalement du fait de la diminution des émissions industriels (tableau 2). L'augmentation des émissions de cuivre, quant à elle, s'explique par l'accroissement du trafic routier et l'usure des plaquettes de freins.

Tableau 2 : Évolution des émissions de métaux lourds entre 1990 et 2021 en %, d'après Citepa - 2023 (7).

		As	Cd	Cr	Cu	Hg	Ni	Pb	Se	Zn
Répartition par secteur en 2021 (%)	Industrie de l'énergie	8	12	7	1	19	15	4	5	6
	Industrie manufacturière et construction	31	44	27	3	51	49	37	74	19
	Traitement des déchets	0	6	0	0	9	1	4	0	1
	Usage des bâtiment et activités résidentielles/tertiaires	32	12	29	3	10	11	21	14	23
	Agriculture, Sylviculture	2	7	1	0	2	3	1	1	2
	Transports	27	19	36	93	9	21	33	6	49
Évolution des émissions entre 1990 et 2021		-68%	-87%	-92%	- 3%	-90%	-92%	-98%	-26%	-81%

8. Matières particulaires

Les matières particulaires, plus connues sous l'acronyme « PM » pour « Particulate Matter » sont des particules solides et/ou liquides en suspension dans la phase gazeuse de la pollution atmosphérique. Du fait de la multiplicité de leurs sources d'émission, ces particules présentent des compositions physico-chimique et biologique complexes et très hétérogènes, en faisant des éléments singuliers difficiles à caractériser. C'est pourquoi dans le cadre de ce projet, il a été décidé de se focaliser sur cette fraction spécifique de la pollution atmosphérique pour laquelle les données sont encore très limitées.

II. La pollution atmosphérique particulaire

1. Définition

Les particules peuvent être définies comme « toute unité continue de solide ou de liquide, constituée de molécules maintenues entre elles par des forces intermoléculaires, et d'une taille supérieure à 1 nm » mais aussi comme « l'union de deux ou plusieurs de ces unités par des forces d'adhésion interparticulaires de telle sorte qu'elles agissent comme une seule unité en termes de suspension ou de déposition » (10). Bien que le terme « aérosols » soit très régulièrement employé pour désigner les particules dans la littérature, cela est totalement inapproprié, cette expression englobant à la fois les particules, solides et liquides, et les gaz dans lesquels elles sont en suspension. En résumé, les aérosols sont des suspensions de particules dans un gaz, tandis que les particules peuvent exister sous différentes formes et états sans nécessairement être en suspension dans l'air.

2. Classification des particules

A. En fonction de leur granulométrie

Loin d'être homogènes, les particules en suspension dans l'air, qu'elles soient liquides ou solides, diffèrent en fonction de leurs tailles, de leurs formes géométriques mais aussi de leurs masses et densités. C'est pourquoi, une métrique permettant de comparer des particules ayant des caractéristiques hétérogènes s'est avérée nécessaire. La notion de « diamètre aérodynamique équivalent » (D_{ae}) qui correspond au diamètre d'une particule sphérique de masse volumique 1 g/cm^3 et dont la vitesse de chute est égale à celle de la particule considérée, en absence de turbulences et de vent, répond à cette problématique en permettant la séparation des particules en 3 groupes distincts : les particules **grossières**, **fines** et **ultrafines** (tableau 3) (figure 2) (tableau 3) (11,12).

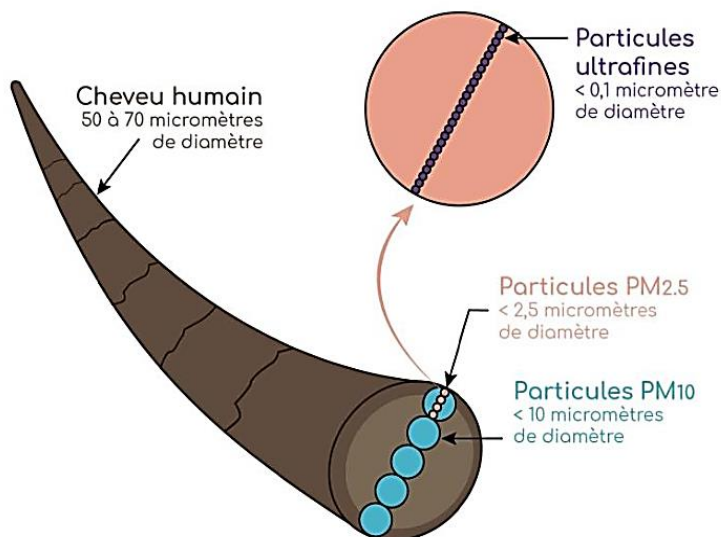


Figure 2 : Gamme de taille des particules atmosphériques, d'après ATMO Grand Est - 2021 (11).

Tableau 3 : Classification granulométrique et principales sources des particules, d'après ATMO Grand-Est – 2022 (12).

		Particules grossières	Particules fines	Particules ultrafines
Dénomination		PM ₁₀	PM _{2,5}	PM _{0,1}
Dae (µm)		10 < Dae < 2,5	2,5 ≤ Dae	0,1 ≤ Dae
Sources principales	Naturelles	Érosion minérale, génération d'embruns marins		
	Anthropiques	Remise en suspension de poussières ; Usure de la chaussée et des pneus ; Génération de poussières lors des chantiers de construction	Émissions des moteurs diesel ; Résidus de processus de combustion	Déchets de combustion de biomasse et de combustibles fossiles

B. En fonction de leur processus de formation

Prenant en compte à la fois la distribution granulométrique et le processus de formation des particules, cette troisième classification, décrite en 1978 par Whitby, permet de distinguer ces dernières selon 3 modes granulométriques (tableau 4) (figure 3) (13):

- Le mode **nucléation** permet la formation des PM_{0,1}, dites « noyaux d'Aitken » par condensation de vapeurs chaudes au cours de phénomènes de combustion, de la température et de l'humidité. Ces particules, de petits diamètres, ne participent que faiblement à la masse des aérosols atmosphériques bien qu'elles soient très riches en nombre.
- Le mode **accumulation** permet la formation des PM_{2,5} par condensation de vapeurs sur les PM_{0,1} issues du mode nucléation, ou par coagulation de ces dernières. Ces particules, de plus gros diamètres, participent sensiblement à la masse des aérosols atmosphériques et demeurent en suspension dans l'air pendant plusieurs jours à plusieurs semaines avant d'être éliminées par dépôts secs et humides dits de lessivages par précipitations.
- Le mode **sédimentation** permet la formation des PM₁₀₀ par l'intermédiaire de procédés mécaniques qu'ils soient naturels ou anthropiques. Ces particules, de diamètres nettement plus importants, ne participent que faiblement à la concentration en nombre des aérosols atmosphériques mais contribuent activement à leur masse totale. En raison de leur taille considérable, ces particules ne restent que quelques heures à quelques jours dans l'atmosphère.

Tableau 4 : Classification des particules en fonction de leur mode de formation, d'après Whitby - 1976 (13).

Mode	Nucléation	Accumulation	Sédimentation
Particules concernées	PM _{0,1} = « Noyaux d'Aitken »	PM _{2,5-0,1}	PM _{100-2,5}
Processus de formation des particules	Condensation de vapeurs chaudes au cours de phénomènes de combustion, dépendante de la concentration en précurseurs gazeux, de la température et de l'humidité	Condensation de vapeurs sur les particules issues du mode nucléation ou par coagulation de ces dernières	Procédés mécaniques d'origine naturelle (mise en suspension de poussières volcaniques ou désertiques, soulèvement d'embruns marins...) ou anthropique (érosion éolienne, pollution industrielle...).
Contribution à la masse des aérosols	-	+	+
Contribution à la concentration en nombre	+	-	-
Elimination	Lente Transformation en particules de taille supérieure	Lente → Restent en suspension dans l'atmosphère pendant plusieurs semaines avant d'être éliminées par dépôts secs et humides dits de lessivages par précipitations.	Rapide → Éliminées en quelques heures/jours dans l'atmosphère

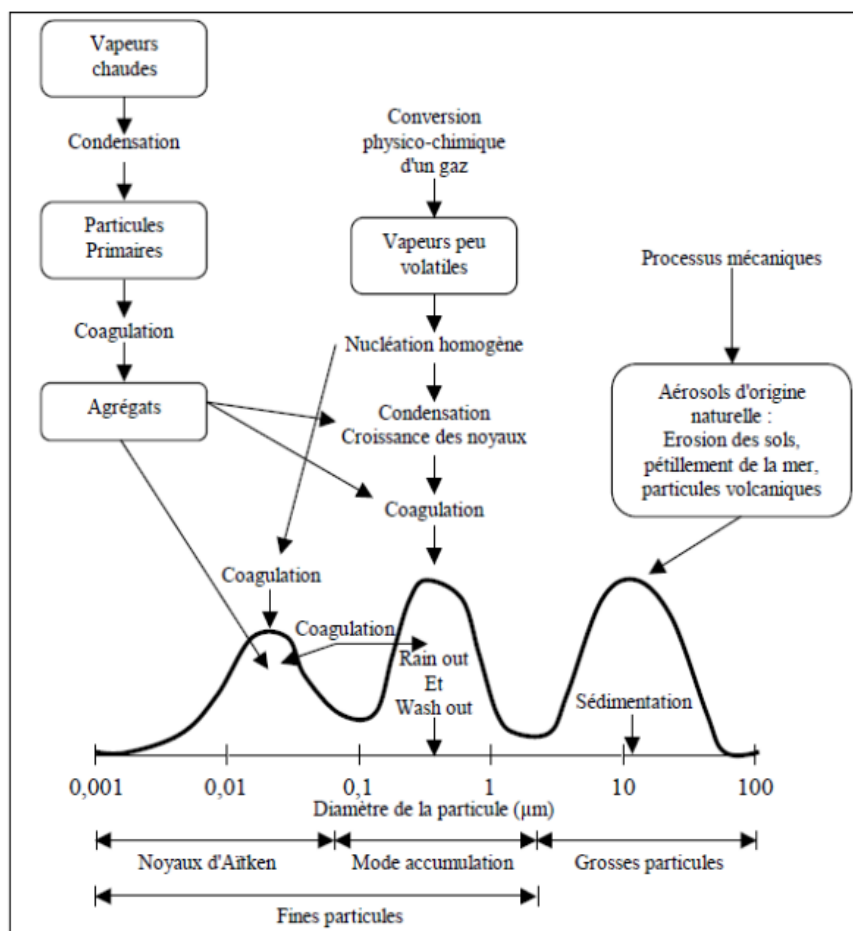


Figure 3 : Représentation schématique des mécanismes de formation et de dépôt des particules en fonction de leur diamètre aérodynamique équivalent, d'après Whitby - 1976 (13).

C. En fonction de leur nature primaire ou secondaire

Cette deuxième classification permet de classer les particules en fonction de leur mécanisme de formation, permettant ainsi de distinguer les **particules primaires** directement rejetées dans l’atmosphère, des **particules secondaires** issues de la transformation chimique de précurseurs préalablement présents dans l’atmosphère (tableau 5). La formation des particules secondaires fait tout d’abord intervenir une étape de nucléation qui consiste en l’association de particules primaires directement rejetées dans l’atmosphère avec des précurseurs gazeux naturellement présents dans ce dernier et condensation, générant des $PM_{0,1}$. S’enchaînent ensuite les étapes de condensation et agglomération qui conduisent respectivement à la formation des $PM_{2,5}$ et PM_{10} ; ces dernières étant principalement issues de processus mécaniques (14,15) (figure 4).

Tableau 5 : Classification des particules en fonction de leur nature primaire ou secondaire, d’après Falcon-Rodriguez – 2016 et Rorat - 2020 (14, 15).

Dénomination		Particules primaires	Particules secondaires
Origine		Directement rejetées dans l’atmosphère	Issues de transformations chimiques (oxydation, nucléation, condensation, coagulation) à partir de polluants gazeux déjà présents dans l’atmosphère
Sources	Naturelles	Embruns marins, Cendres volcaniques, Feux de forêt, Sable désertique, dépôts terrigènes	Cendres volcaniques, Terpènes volatils (isoprène, monoterpènes) issus des végétaux, Bactéries nitrifiantes des sols
	Anthropiques	<ul style="list-style-type: none"> • <u>Secteur du transport automobile</u> : Usure de freins, de pneus, combustion du carburant • <u>Secteur industriel et énergétique</u> : Chantiers, traitement des déchets, raffineries • <u>Secteur résidentiel et tertiaire</u> : Combustion des énergies fossiles pour le chauffage domestique au fioul et au charbon <ul style="list-style-type: none"> • <u>Secteur agricole</u> 	<ul style="list-style-type: none"> • <u>Secteur du transport automobile</u> : conversion des oxydes d’azote issus du trafic routier en nitrates. • <u>Secteur industriel et énergétique</u> : conversion des oxydes d’azote issus des activités industrielles en nitrates. • <u>Secteur résidentiel et tertiaire</u> : conversion du dioxyde de soufre issu des combustibles domestiques soufrés (charbon, gazole, lignite...) en sulfates ; Ammoniac et composés organiques volatils non méthaniques provenant de l’utilisation de solvants et de la combustion de bois.

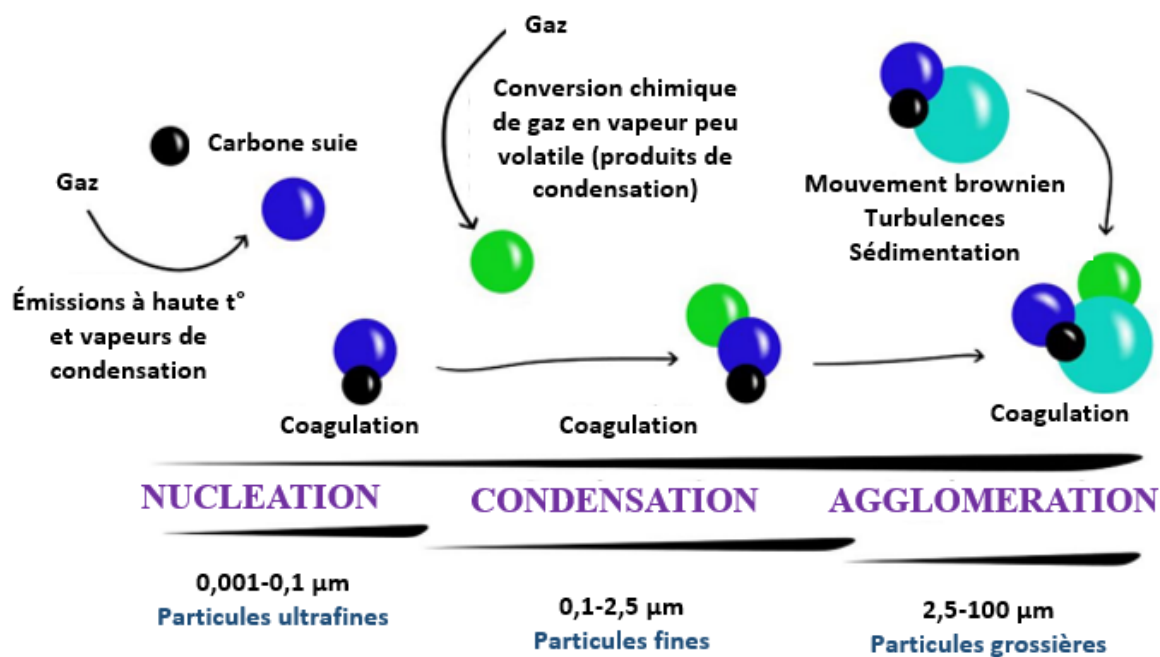


Figure 4 : Mécanismes de formation des particules secondaires, adapté de Falcon-Rodriguez - 2016 (14).

D. En fonction de leur source

i. Sources naturelles

Contrairement aux émissions de particules liées aux activités humaines dites « anthropogéniques », les émissions naturelles ne sont pas contrôlables. L'origine de ces dernières est principalement issue des sources terrigène, marine et biogénique auxquelles s'ajoutent des sources épisodiques (tableau 6) (15).

La source **terrigenè**, dont les sources principales sont l'érosion éolienne des sols et les sables désertiques, est génératrice de particules dont la composition varie en fonction de la provenance géographique et de la géologie du milieu d'origine. Plusieurs études épidémiologiques ont par ailleurs démontré que les particules de poussières sahariennes, capables de migrer sur de longues distances, sont responsables d'une élévation du nombre de personnes souffrant de troubles respiratoires et d'une augmentation du taux de mortalité journalier dans plusieurs pays européens (16–19). Les sels et embruns marins, riches en chlorure de sodium (NaCl), sulfates de sodium (Na₂SO₄), magnésium (MgSO₄) et potassium (K₂SO₄), provenant de l'assèchement des gouttelettes d'eau de mer éjectées dans l'atmosphère suite aux déferlements des vagues, constituent, quant à eux, les principales origines de la source **marine** (20). Enfin, les émissions de particules par les végétaux sont responsables de la source **biogénique**. À ces dernières s'ajoutent les sources **épisodiques** tels que les feux de forêt ou les éruptions volcaniques émettrices de cendres riches en calcium, silice et potassium.

Tableau 6 : Origine et composition des différentes sources d'émissions naturelles des particules, d'après Rorat – 2020 (15).

Source	Origine	Composition
Terrigène	Érosion éolienne des sols, Sables désertiques	Silicates, Carbonates, Sulfates de calcium, Oxydes de fer
Marine	Sels et embruns marins	Chlorure de sodium (NaCl), de sulfates de sodium (Na ₂ SO ₄), de magnésium (MgSO ₄) ou de potassium (K ₂ SO ₄)
Biogénique	Végétaux	Spores, Pollens, Terpènes (isoprène, monoterpènes), Débris végétaux
Épisodique	Feux de forêt, éruptions volcaniques	Cendres riches en calcium, silice et potassium

ii. Les sources anthropiques

Bien que les émissions totales de particules en suspension dans l'air aient diminuées de l'ordre de 40 % depuis 1990, les activités humaines continuent d'activement contribuer à la pollution atmosphérique en dépit de l'instauration de stratégies visant à réduire ces émissions (7). À titre d'exemple, une diminution des émissions liées au trafic routier a été permise grâce à l'optimisation du parc automobile, l'utilisation de filtres à particules, le développement des normes Euro et l'apparition des certificats de qualité de l'air. De la même manière, l'utilisation de dépoussiéreurs sur les sites de production minérale et la diminution des chantiers de construction à la suite de la crise économique de 2008 ont permis de réduire les rejets industriels. Enfin, l'amélioration des chauffages au bois a atténué les émissions du secteur résidentiel (21).

Ces émissions anthropiques sont principalement issues de 5 secteurs distincts, à savoir le secteur des **bâtiments** et activités **tertiaires** et **résidentielles**, le secteur de l'**industrie manufacturière**, le secteur **agricole et sylvicole**, le secteur du **transport** et le secteur de l'**énergie** (7) (figures 5 et 6). La part relative de chacun de ces secteurs dans les émissions respectives de particules totales en suspension (PTS), PM₁₀, PM_{2,5} et PM_{0,1}, de même que leurs sources spécifiques sont décrites dans le tableau 7.

Tableau 7 : Sources et répartition par Dae des différents secteurs responsables des sources d'émissions anthropiques des particules, d'après Citepa - 2023 (7).

Secteur	Sources	Répartition par Dae en 2021 (en %)			
		PTS	PM ₁₀	PM _{2,5}	PM _{0,1}
Bâtiments, activités tertiaires et résidentielles	Produits de combustion des appareils de chauffage (<i>i.e.</i> , bois, fioul et charbon), Utilisation de solvants, Emploi de l'air conditionné, Consommation de tabac	18	52	73	85
Industrie manufacturière	Métallurgie, Cimenterie, Chantiers de construction, Traitement des déchets et des eaux usées	25	20	11	8
Agriculture, Sylviculture	Élevages, cultures, engins et moteurs agricoles : labours des sols, fermentation des fourrages, consommation de combustibles fossiles	53	18	6	1
Transport	Trafic routier, activités ferroviaires, maritimes et aériennes	4	9	9	5
Énergie	Extraction, production et distribution de l'énergie	0	1	1	1

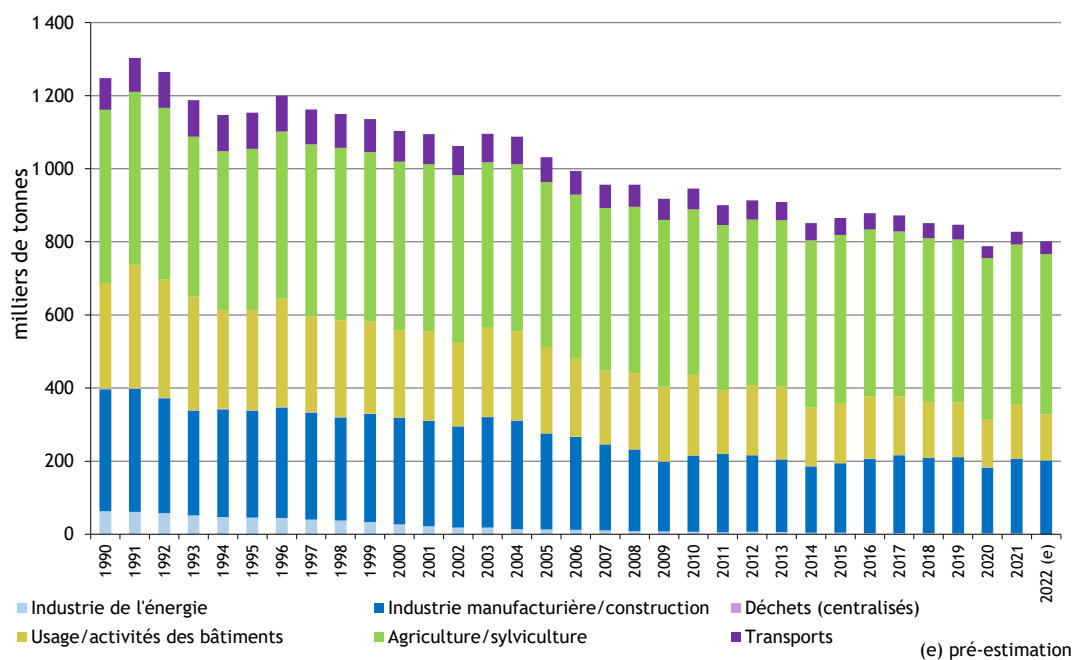


Figure 5 : Évolution des émissions dans l'air des Particules totales en suspension depuis 1990 en France (Métropole), selon CITEPA – 2023 (7).

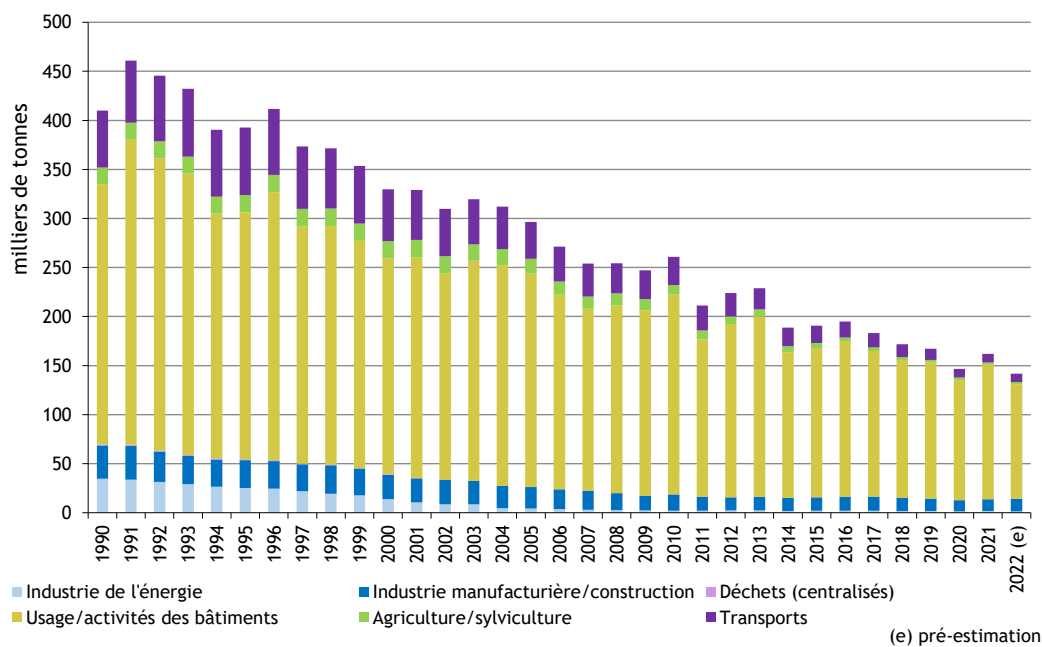


Figure 6 : Évolution des émissions dans l'air des PM₁ depuis 1990 en France (Métropole), selon CITEPA – 2023 (7).

3. Caractérisation physico-chimique et biologique

L'importante hétérogénéité et variabilité de la composition des particules rend leur caractérisation physico-chimique et biologique délicate. Cette complexité s'explique par la diversité des sources d'émissions de ces dernières, qu'elles soient naturelles ou anthropiques, mais aussi des conditions météorologiques jouant un rôle essentiel dans le transport, la dispersion et la transformation de celles-ci. Les propriétés physico-chimiques des particules, de même que leur toxicocinétique, c'est-à-dire leur distribution et/ou leur persistance dans l'organisme, dépendent de la composition de ces dernières. Leur richesse en composés hautement nocifs détermine leur pouvoir oxydant, allergisant et cancérigène, soulignant l'importance de s'intéresser à leur composition afin d'évaluer leur toxicité. A titre d'exemple, l'évaluation de la composition chimique moyenne des PM_{10} réalisée au sein de 22 stations de prélèvements au sein de l'Europe entre 2013 et 2019 montre une variation de la composition chimique en fonction du lieu de prélèvement bien que les composants majoritaires soient similaires (figure 7) (22). Les concentrations mesurées dans les zones urbaines, indiquées en marron sur la figure 7, présentaient des concentrations supérieures en PM_{10} par rapport aux stations situées en zones rurales, indiquées en vert sur cette même figure : $12,2 \pm 9,3 \mu\text{g}/\text{m}^3$ versus $6,2 \pm 3,3 \mu\text{g}/\text{m}^3$, respectivement. Cela a également été démontré dans une autre étude ayant estimé qu'en moyenne, la concentration typique de $PM_{0.1}$ dans l'air ambiant des zones rurales était de 2610 particules/cm³ alors que la concentration en bord de route se situait aux alentours de 48 180/cm³. La concentration moyenne globale en $PM_{0.1}$ dans l'air serait ainsi de 10 760/cm³ (23). Une forte humidité, une faible circulation de l'air, un nombre accru de véhicules diesel, l'accélération des véhicules après l'arrêt du trafic, de même que la saison hivernale sont tant de facteurs favorisant des concentrations élevées en $PM_{0.1}$ (24).

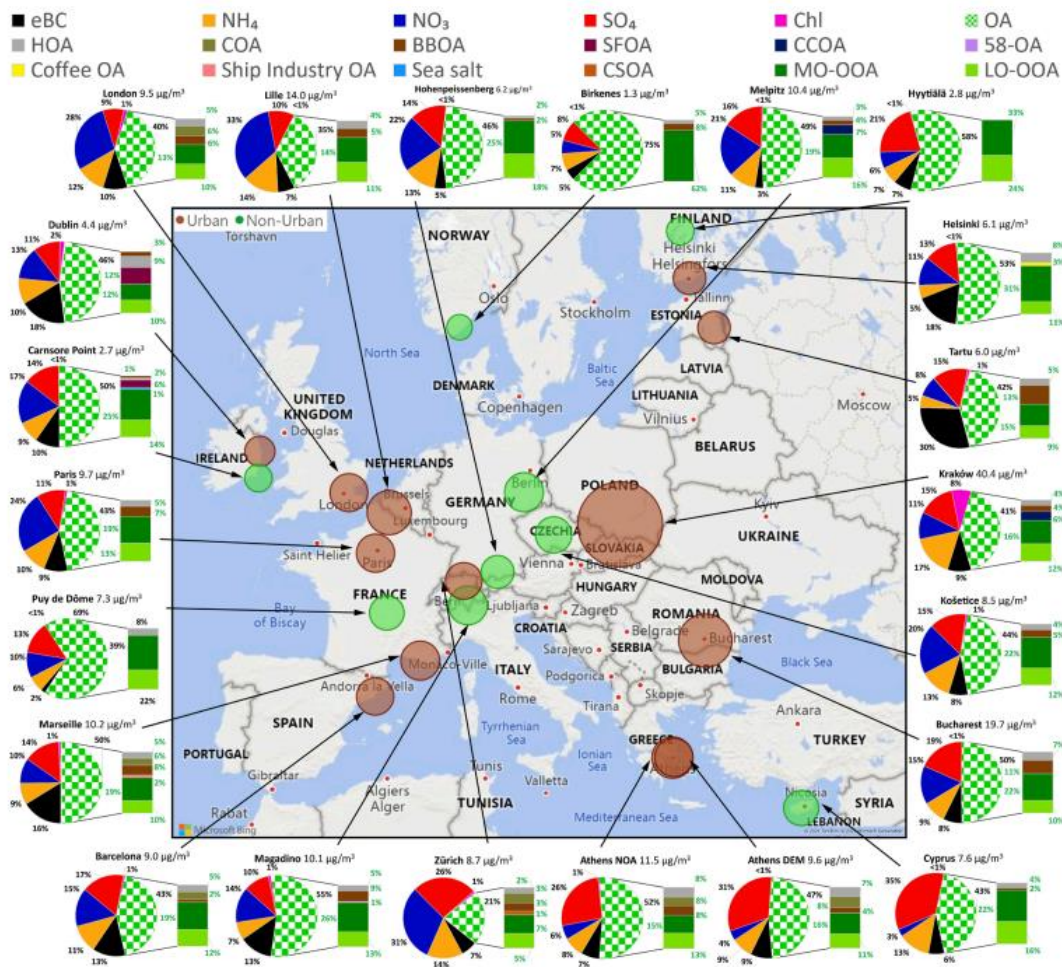


Figure 7 : Composition chimique moyenne des PM_{10} observées en Europe entre 2013 et 2019, d'après Chen – 2022 : zones urbaines indiquées en marron et zones rurales indiquées en vert (22).

A. Fraction carbonée

Représentant 20 à 50 % de la masse totale des particules atmosphériques, la fraction carbonée est constituée d'une composante organique et d'une composante élémentaire également désignée par le terme de « carbone noir » (« black carbon ») ou « carbone suie » (25). Il a également été estimé que cette fraction carbonée constituerait 25 à 40 % de la masse totale des PM₁₀ en Europe et 30 à 50% de celle des PM_{2,5}, en faisant l'un des composants majeurs des particules atmosphériques (26).

- Le **carbone élémentaire**, principalement d'origine primaire, est issu de sources anthropiques à la suite de processus de combustion incomplète de combustibles fossiles (*e.g.*, gaz, charbon, fioul) ou de biomasse (*e.g.*, bois, matières végétales). Cet élément, qui constitue le cœur des particules, peut donc provenir de différentes sources, notamment du trafic routier (*e.g.*, utilisation de moteurs diesels, abrasion des pneus), des émissions industrielles ou encore des chauffages domestiques. A la surface de ce noyau carboné, des xénobiotiques, notamment des composés organiques semi-volatils tels que des HAP ou des pesticides, sont capables de se condenser et peuvent avoir des effets délétères sur l'organisme. Cette capacité d'absorption est directement liée à la surface spécifique de la particule. Cette dernière est une mesure s'appliquant aux solides granulaires ou particuliers et qui correspond à la surface totale par unité de masse d'un solide. Elle prend en compte la surface individuelle de chaque grain ainsi que la surface présentée par les pores entre les grains. Elle s'oppose donc à la notion de surface apparente d'un solide puisqu'il s'agit donc de considérer toute la surface de chaque particule, porosité ouverte comprise. Elle est déterminée à partir de la quantité de molécules de gaz pouvant être adsorbée à la surface du solide et s'exprime en m²/g. Ainsi, les particules les plus petites (PM_{2,5} et PM_{0,1}) possèdent une surface spécifique élevée, de l'ordre de quelques m²/g pour les PM_{2,5} à quelques centaines de m²/g pour les PM_{0,1} (*e.g.*, dioxyde de titane : 10 à 300 m²/g), faisant d'elles des entités sur lesquelles des molécules organiques gazeuses pourront s'adsorber et pouvant être à l'origine de multiples réactions physico-chimiques au niveau de l'interface entre les particules et le milieu ambiant. Ce phénomène est appelé « réactivité de surface ». La surface spécifique et la porosité influencent à la fois la pénétration, l'absorption, la rétention et l'excrétion dans l'arbre respiratoire de ces composés gazeux, et sont donc responsables de leurs effets sur la santé.
- Le **carbone organique**, d'origine primaire ou secondaire, peut quant à lui être issu de sources anthropiques (combustion) ou naturelles (*e.g.*, émissions biogéniques, sels marins). Il s'agit d'un mélange complexe de centaines de composés aux propriétés physico-chimiques variées. Parmi eux sont retrouvés des alcanes, des alcènes, des aldéhydes, des cétones, des quinones, des acides carboxyliques mais aussi des HAP, des COV et des PCB, connus pour leur capacité à induire des effets cancérigènes et mutagènes (10). En effet, parmi les centaines d'HAP connus à ce jour, 16 ont été classés parmi les polluants prioritaires en matière d'exposition potentielle et d'effets néfastes sur la santé humaine par l'Agence américaine de Protection de l'Environnement (US-EPA). Or, il a été estimé que 59 à 97 % des HAP présents dans l'air étaient adsorbés par les particules atmosphériques (27).

B. Fraction métallique

Les éléments métalliques, présents en très faibles proportions au sein des particules, proviennent de sources multiples (28). Les métaux provenant de sources anthropiques (*e.g.*, As, Cd, Cr, Cu, Ni, Pb, V, Zn) telles que les activités métallurgiques (*e.g.*, sidérurgie, raffinerie), de combustion (*e.g.* incinération des déchets) ou le trafic routier (*e.g.*, abrasion des pneus, usure des freins), sont retrouvés en plus grande proportion dans la fraction fine des particules. *A contrario*, les métaux issus de sources naturelles (*e.g.*, Al, Ca, Fe, K, Mn, Mg, Si), notamment des éruptions volcaniques, de l'érosion des roches ou de la croûte terrestre, sont

majoritairement retrouvés dans la fraction grossières des particules. Bien que les concentrations en métaux composant les particules soient faibles, ceux-ci ont un impact sanitaire important. Cela s'explique par la capacité de certains métaux de transition (*e.g.*, Cr, Cu, Fe, Ni, V) à générer des espèces radicalaires, notamment des radicaux hydroxyles ($^{\circ}\text{OH}$) par l'intermédiaire de la réaction de Fenton (14,29–32). Cette dernière consiste en la décomposition d'un oxydant puissant, le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , par les oxydes de fer, aboutissant à la formation d'un radical hydroxyle, espèce radicalaire très réactive. Ce radical est capable de réagir avec l'ensemble des macromolécules cellulaires (*e.g.*, protéines, lipides, ADN) et d'induire un stress oxydant (33,34). Des études expérimentales ont ainsi montré que les métaux de transition composant les particules avaient des conséquences cardiovasculaires et pulmonaires néfastes telles qu'une augmentation de la fréquence cardiaque et/ou une diminution de la fonction pulmonaire, responsables d'une augmentation du nombre d'hospitalisations et de la mortalité (35–38).

C. Fraction inorganique

Cette fraction est l'une des fractions majoritaires des particules atmosphériques, pouvant atteindre en Europe, 43 % de la masse totale des $\text{PM}_{2,5}$ prélevées dans un site rural et jusqu'à 56 % des PM_{10} prélevées dans un site urbain (39,40). Elle regroupe l'ensemble des espèces ioniques dont principalement les ions hydrosolubles de sulfate (SO_4^{2-}), nitrate (NO_3^-) et ammonium (NH_4^+) dont la somme des concentrations peut atteindre 40 à 65 % du poids total des particules fines (41). Ces derniers sont retrouvés en proportion importante sous forme de sels (sulfates d'ammonium $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, nitrate d'ammonium (NH_4NO_3) formés dans l'atmosphère à partir de précurseurs gazeux tels que l'ammoniac (NH_3), l'acide nitrique (HNO_3) et l'acide sulfurique (H_2SO_4). Le terme d'« aérosols inorganiques secondaires » est alors utilisé. Les ions chlorure (Cl^-), sodium (Na^+), calcium (Ca^{2+}), magnésium (Mg^{2+}) et potassium (K^+) sont également retrouvés de manière importante au sein de cette fraction. L'origine de ces derniers est multiple, pouvant être naturelle (*e.g.*, crustale ou marine) ou anthropique (*e.g.*, engrais, sidérurgie). En effet, les embruns marins sont majoritairement composés des ions Cl^- , Mg^{2+} et Na^+ tandis que les poussières crustales renferment plutôt des ions Ca^{2+} , Mg^{2+} et K^+ (42,43). Ce dernier est également associé à la combustion de biomasse et de charbon (44).

D. Fraction biologique

La fraction biologique, bien que pouvant contribuer jusqu'à 5% de la composition des $\text{PM}_{10-2,5}$, est souvent négligée dans la caractérisation chimique des particules (45). Elle présente une importante hétérogénéité, puisque constituée de nombreux microorganismes tels que des bactéries dont le diamètre est compris entre 2 et 5 μm , des virus dont le diamètre est inférieur à 2 μm , des champignons et des protozoaires, mais également des spores fongiques, des pollens, des algues, des débris organiques et des constituants membranaires des bactéries à Gram négatif, appelées endotoxines. C'est pourquoi les PM constituent un vecteur considérable pour le transport d'allergènes et de microorganismes potentiellement pathogènes. Ceci est le cas, par exemple, pour *Pseudomonas aeruginosa* et SARS-COV-2 (46).

4. Réglementation et normes internationales et nationales

C'est à la suite du grand smog de Londres de 1952 que sont apparues les premières réglementations visant à améliorer la qualité de l'air au Royaume-Uni, avec la publication de la loi du « clean air act » en 1956. Cette problématique deviendra une préoccupation politique européenne majeure dans les années qui suivirent. La réglementation européenne actuelle impose, par l'intermédiaire de la directive 2008/50/CE du 21 mai 2008, des valeurs réglementaires de concentration des polluants atmosphériques et notamment des particules (tableau 8), qui se doivent d'être respectées par l'ensemble des états membres sous peine de sanction. Cette directive,

qui a par la suite été transposée au droit français par le biais de l'article R 221-1 du code de l'environnement, intègre des normes de qualité de l'air qui diffèrent selon les polluants (47). Ces normes ne sont adossées qu'à l'aspect massique des PM et ne prennent pas en compte la source ni la composition physico-chimique de ces dernières. En ce qui concerne les particules atmosphériques, la réglementation française actuelle ne prend en compte que les PM₁₀ et PM_{2,5}, et n'inclut donc pas les PM_{0,1} du fait des connaissances encore très limitées les concernant à ce jour. Ainsi, pour les PM₁₀, la valeur limite pour la protection de la santé est de 40 µg/m³ en moyenne annuelle tandis qu'elle est de 25 µg/m³ pour les PM_{2,5}. La moyenne journalière de 50 µg/m³ ne doit également pas être dépassée plus de 35 jours par an pour les PM₁₀. Néanmoins, cette limite de 35 dépassements annuels est fréquemment observée dans les grandes agglomérations françaises. En 1987, l'OMS a également publié des lignes directrices relatives à la qualité de l'air concernant 28 polluants atmosphériques. Ces dernières ont fait l'objet d'une mise à jour en 2005 puis plus récemment en 2021 (tableau 8) et visent à « informer les responsables de l'élaboration des politiques et à fournir des cibles appropriées à toute une série d'actions à mener pour la prévention de la pollution atmosphérique dans les différentes parties du monde (1). Elles constituent l'évaluation la plus largement reconnue et la plus actuelle des effets de la pollution aérienne sur la santé. Elles préconisent des objectifs de qualité de l'air qui réduisent fortement les risques sanitaires ». Elles recommandent ainsi de respecter les limites de 15 µg/m³ en moyenne annuelle et 45 µg/m³ en moyenne journalière pour les PM₁₀ et de 5 µg/m³ en moyenne annuelle et 15 µg/m³ en moyenne journalière pour les PM_{2,5}.

Tableau 8 : Valeurs guides préconisées par l'OMS et valeurs limites réglementaires pour la qualité de l'air extérieur, d'après le Code de l'Environnement (1, 47).

	Durée	PM ₁₀	PM _{2,5}
		Concentration (µg/m ³)	
Valeurs guides de l'OMS	24h	45	15
	1 an	15	5
Valeurs limites réglementaires européennes et françaises	24h	50 (à ne pas dépasser plus de 35 jours par an)	
	1 an	40	25

5. Niveaux d'exposition des populations

Afin d'orienter les autorités publiques et les dirigeants politiques mondiaux dans l'élaboration de campagnes de prévention, l'OCDE publie annuellement des repères environnementaux destinés à évaluer le degré d'exposition des populations aux polluants atmosphériques. Pour ce qui est de la fraction particulaire, ces indicateurs ne prennent en compte à ce jour que les PM_{2,5}, faute de données suffisantes relatives aux niveaux d'exposition des populations. Il est ainsi possible de constater une réduction des concentrations annuelles en PM_{2,5} au sein des pays membres de l'OCDE, évoluant de 19,4 µg/m³ en 1990 à 13,9 µg/m³ en 2019. En dépit de cet effort collectif, ces concentrations restent supérieures au seuil de 10 µg/m³ recommandé en 2019 par l'OMS dans la moitié des états membres de l'OCDE (figures 8 et 9) (48,49). L'OMS estime encore aujourd'hui que près de 92 % de la population humaine vit dans des lieux où les niveaux de qualité de l'air dépassent ses valeurs guides (figure 10) ; ceci étant particulièrement le cas dans certains pays d'Afrique, du Moyen-Orient et d'Asie, en raison de la forte densité de population vivant en milieu urbain et de l'expansion majeure du trafic routier. Estimant que l'impact sanitaire des PM_{2,5}, même à de très faibles niveaux d'exposition, n'était à ce jour plus à démontrer, l'OMS a réactualisé son seuil de recommandation relatif aux PM_{2,5} en 2021, passant de 10 µg/m³ à 5 µg/m³.

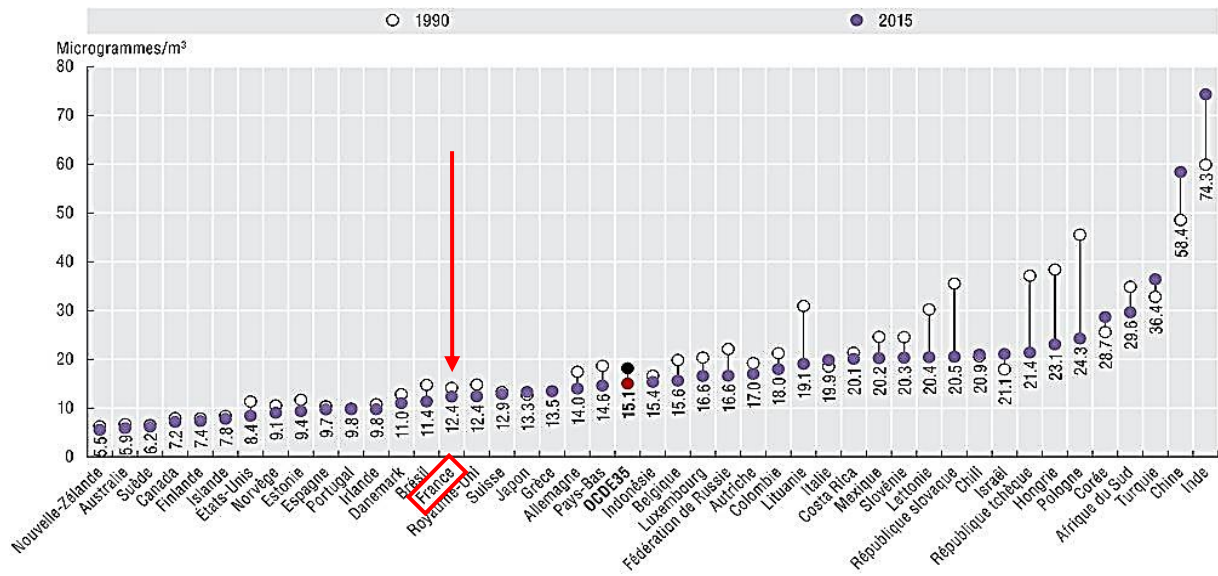


Figure 8 : Exposition annuelle moyenne de la population aux $PM_{2.5}$, en $\mu g/m^3$ en 1990 et en 2015, d'après l'OCDE - 2017 (48).

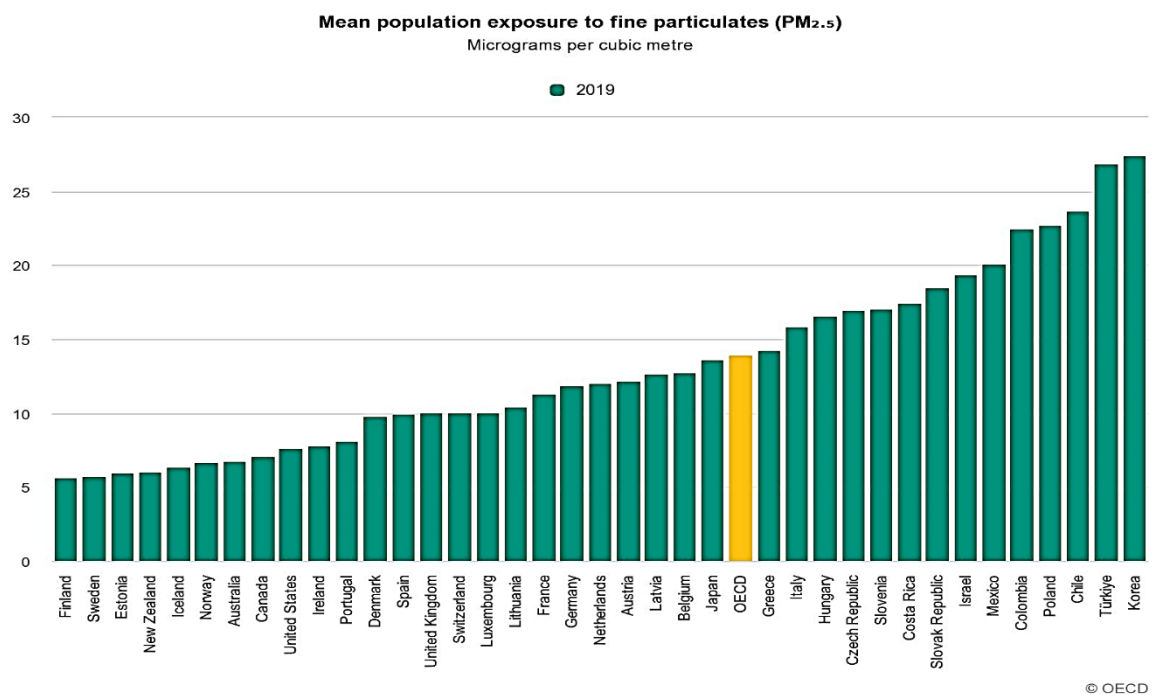


Figure 9 : Exposition moyenne de la population aux $PM_{2.5}$, en $\mu g/m^3$, en 2019, d'après l'OCDE - 2022 (49).

Population exposed to fine particulates (PM_{2.5}) concentrations exceeding WHO guidelines (10 micrograms per cubic meter)

Percentage of population

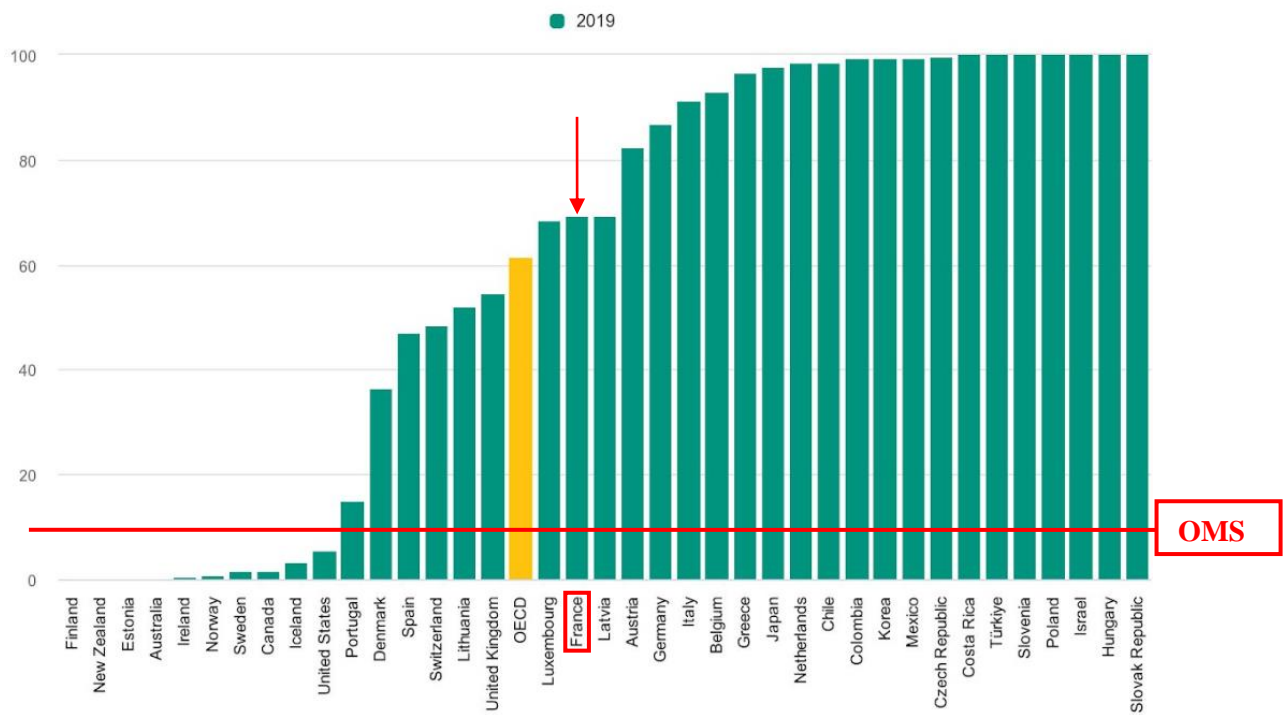


Figure 10 : Pourcentage de la population exposé à des concentrations de PM_{2.5} supérieures aux valeurs recommandées par l'OMS (10 µg/m³) en 2019, d'après l'OCDE - 2022 (49).

III. Devenir des particules dans l'organisme

1. Physiologie de l'appareil respiratoire

Les échanges entre le flux sanguin et le milieu extérieur, qui permettent à la fois l'assimilation du dioxygène O₂ et l'expulsion du dioxyde de carbone CO₂, sont permises grâce aux alvéoles pulmonaires (figure 11). Porte d'entrée de nombreux xénobiotiques et notamment des polluants particulaires, le tractus respiratoire est richement vascularisé et pourvu d'une quarantaine de types cellulaires, ce qui lui confère une surface d'échange de l'ordre de 75 à 100 m². Sont généralement distinguées deux parties :

- Les **voies aériennes supérieures** qui incluent les fosses nasales, le pharynx et le larynx. Ce sont des structures tubulaires flexibles dont le rôle est la filtration, l'humidification et le réchauffement de l'air inspiré.
- Les **voies aériennes inférieures**, ou appareil broncho-pulmonaire, qui incluent la trachée, les bronches, les bronchioles et alvéoles.

Ainsi, les voies aériennes inférieures peuvent être divisées en deux zones distinctes :

- La zone **conductrice** de l'air qui s'étend de la trachée aux bronchioles et assure le transport de l'air.
- La zone **respiratoire** qui s'étend des bronchioles terminales aux alvéoles et qui permet les échanges gazeux avec le sang

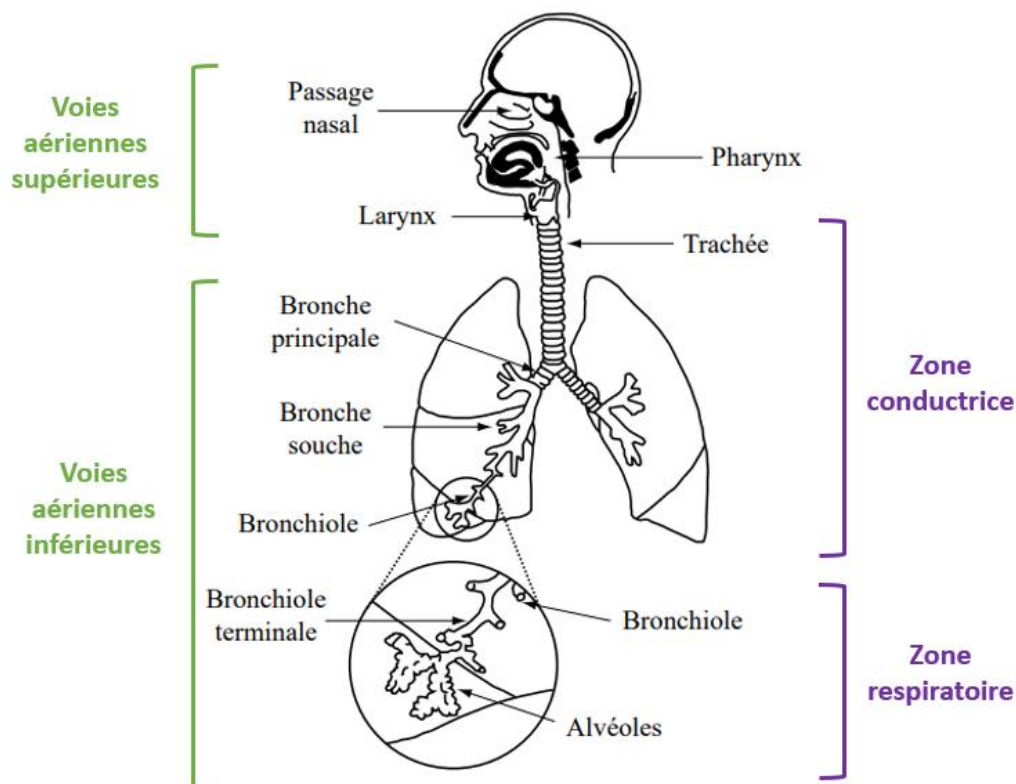


Figure 11 : Anatomie de l'appareil respiratoire.

2. Histologie de l'épithélium bronchique

Afin d'assurer les fonctions spécifiques aux différentes régions des voies aériennes inférieures, les types cellulaires évoluent tout au long du tractus respiratoire (figure 12). Ainsi, l'épithélium bronchique, qui constitue la première ligne de défense face aux agressions extérieures, est prismatique pseudostratifié et comprend un épithélium de revêtement composé de cellules ciliées participant à la clairance mucociliaire, de cellules caliciformes sécrétant du mucus recouvrant cette formation ciliaire et formant un tapis muqueux ainsi que des cellules basales constituant une population de réserve et de renouvellement cellulaire (50). Cet ascenseur muco-ciliaire permet de faire remonter 90 % des particules inhalées vers le carrefour aéro-digestif où elles seront dégluties ou expectorées, constituant ainsi la première ligne de défense des voies aériennes (51). En plus des cellules ciliées et basales, l'épithélium bronchiolaire, quant à lui, comprend également des cellules Club, cellules sécrétoires prismatiques non ciliées. Ces dernières sont les uniques cellules présentes dans les bronchioles les plus distales et constituent ainsi des cellules de transition entre la zone conductrice de l'air et la zone respiratoire servant aux échanges gazeux (52). Enfin, l'épithélium alvéolaire est un épithélium non cilié constitué de pneumocytes de type 1, cellules aplaties et incapables de se diviser et ayant une fonction de fine barrière à travers laquelle s'effectuent les échanges gazeux entre le sang et l'air, et de pneumocytes de type 2 qui produisent et sécrètent le surfactant qui possède des propriétés tensio-actives permettant le maintien de la structure de l'alvéole. Le tapis mucociliaire n'étant plus effectif à cet étage, ceux sont les macrophages alvéolaires qui vont prendre le relais face aux agents extérieurs par l'intermédiaire du mécanisme de phagocytose, constituant la seconde ligne de défense de l'appareil respiratoire. Ces macrophages sentinelles sont majoritairement éliminés par l'ascenseur mucociliaire au niveau bronchiolaire ou par le système lymphatique. Ainsi, tout au long des voies respiratoires inférieures, la structure de l'épithélium varie, passant progressivement d'un épithélium prismatique pseudostratifié à un épithélium cylindrique unistratifié puis cubique simple. La troisième ligne de défense est assurée par la présence de jonctions serrées qui jouent le rôle de barrière physique et assurent l'imperméabilité de l'épithélium vis-à-vis des agents extérieurs (53).

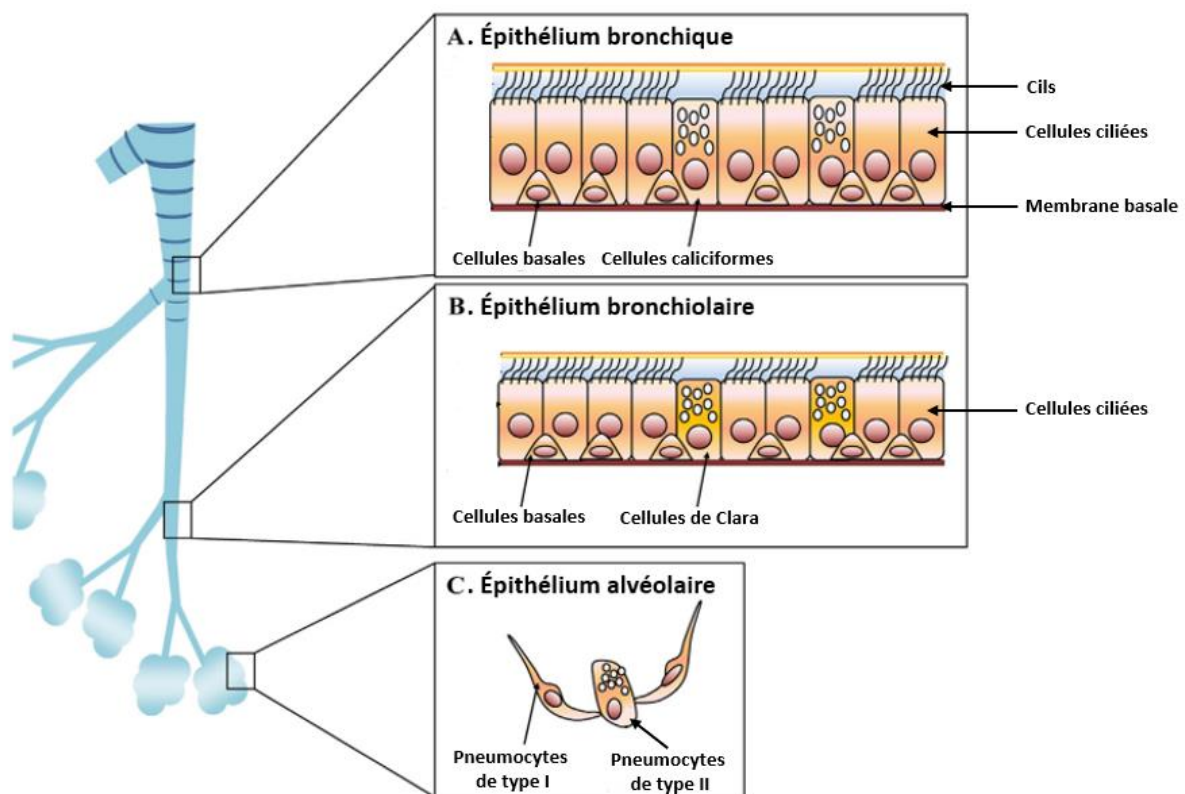


Figure 12 : Structure de l'épithélium des voies respiratoires, adaptée de Adam. D – 2014 (52).

3. Interactions des particules avec l'appareil respiratoire

Les principales voies d'entrée des particules atmosphériques sont le nez et la bouche, faisant de l'appareil respiratoire la cible principale de ces dernières. La toxicité des particules ne dépend pas uniquement de leur composition chimique mais aussi de leur niveau de pénétrance au niveau pulmonaire et de la localisation de leur dépôt. Ces derniers peuvent être influencés par différents facteurs dont (54) :

- Leurs **caractéristiques intrinsèques** telles que la densité, la charge, la granulométrie, la forme, le degré d'agglomération, la capacité hygroscopique qui conditionnent leur comportement aérodynamique et physicochimique.
- La **morphologie pulmonaire** qui est propre à chaque individu, la température et l'humidité de l'arbre bronchique. • La physiologie respiratoire : fréquence respiratoire, débit et la turbulence résultante du flux d'air. La morphologie pulmonaire qui est propre à chaque individu, la température et l'humidité de l'arbre bronchique
 - La **physiologie respiratoire** : fréquence respiratoire, débit et la turbulence résultante du flux d'air.
 - Les **paramètres individuels** tels que l'âge, le sexe et les antécédents médicaux, notamment la présence de pathologies sous-jacentes de type asthme et BPCO.

Le dépôt de ces particules dans l'appareil respiratoire dépend de 5 mécanismes principaux (figure 13) (55):

- **Diffusion brownienne** : la particule adopte une trajectoire aléatoire sous l'effet de collisions avec les molécules de gaz. Ce mécanisme est d'autant plus grand que le diamètre de la particule est petit. Cet effet est prédominant pour les particules ultrafines.
- **Effet de charge** : une particule chargée peut-être attirée par la paroi ou être soumise à des forces de répulsions exercées par les particules entre elles.
- **Impaction inertielle** : la particule en suspension maintient sa trajectoire malgré les changements d'orientation du flux d'air et entre en collision avec les parois des intersections du tractus respiratoire. Cet effet augmente avec la taille, la densité et la vitesse du flux d'air.
- **Interception** : la particule entre en contact avec la paroi alors qu'elle se trouvait dans le flux d'air. Ce phénomène dépend du diamètre de la particule et du conduit respiratoire. Il est plus important pour les particules allongées et les agglomérats.
- **Sédimentation** : la particule se dépose sous l'effet de la gravité. Ce phénomène augmente avec la taille, la densité et le temps de résidence des particules.

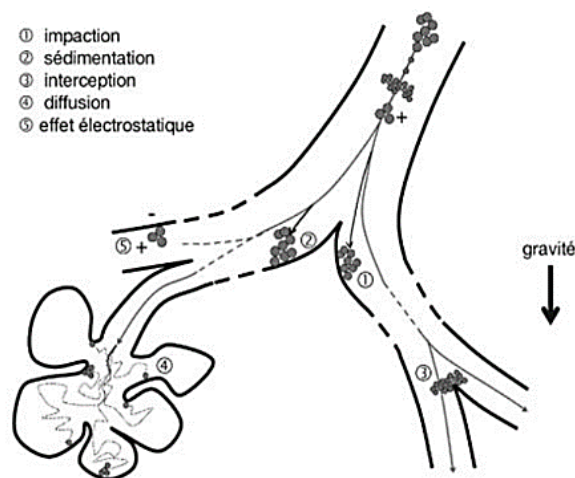


Figure 13 : Mécanismes de dépôt des particules inhalées dans les voies respiratoires, d'après Hervé-Bazin - 2012 (55).

Bien que les particules puissent pénétrer dans l'organisme par absorption cutanée et digestive, la principale voie d'entrée des particules est indubitablement la voie respiratoire. Cependant, seule une partie des particules inhalées atteint réellement le tractus respiratoire. Une fraction de ces particules y sera déposée et retenue, tandis qu'une autre sera quant à elle directement éliminée par exhalation. Il a par ailleurs été estimé que le taux de pénétration dans le système respiratoire est proche de 100 % pour les particules ayant un Dae de quelques micromètres ou moins, et qu'il n'est que d'environ 50 % pour les particules d'environ 100 μm (56). Le dépôt de ces particules tout au long du tractus respiratoire dépend donc bien de leur Dae ; plus leur taille est faible, plus leur pénétration se fera en profondeur au sein de l'appareil respiratoire (57) (figure 14).

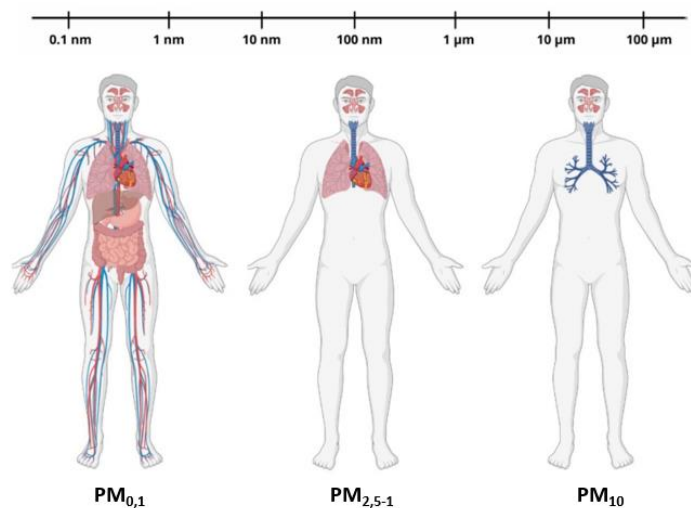


Figure 14 : Étendue de la biodistribution des particules dans l'organisme, en fonction de leur Dae, d'après Flood-Garibay - 2023 (57).

Ainsi, après s'être déposées par impaction au niveau de l'épithélium de la trachée et des bronches, les particules inhalables dont le Dae est supérieur à 10 μm et inférieures à 100 μm sont évacuées au niveau du nasopharynx sous l'action de l'ascenseur muco-ciliaire, avant d'être dégluties et/ou expectorées. Les PM₁₀, quant à elles, pénètrent jusqu'à l'étage trachéobronchique, se déposent préférentiellement par sédimentation ou impaction du fait de la ramification de l'arbre bronchique, avant d'être éliminées par clairance mucociliaire. Cette dernière permet une élimination des aérocontaminants en moins de 24 heures (56). Les PM_{2,5} migrent jusqu'aux régions profondes de l'arbre respiratoire, les alvéoles pulmonaires, se déposent par diffusion brownienne et sont éliminées par la clairance macrophagique. Cette dernière se déroule beaucoup plus lentement que la clairance mucociliaire, ayant pour conséquence une possible rétention des particules durant plusieurs semaines et un remodelage bronchique. Le taux de déposition dans cette région est de l'ordre de 20% pour les PM_{2,5} mais peut atteindre jusqu'à 50% pour les PM_{0,1}. Enfin, les PM_{0,1} se déposent tout au long de l'arbre respiratoire et sont capables d'atteindre d'autres organes cibles par translocation systémique (figure 15) (57). Il est ainsi possible de distinguer 3 régions principales de dépôt des particules : les régions **nasopharyngées, trachéobronchique et alvéolaire**. Les particules ultrafines se déposent essentiellement au niveau des régions trachéobronchique et alvéolaire, de façon plus importante que les particules fines. Dans ces deux régions de l'arbre respiratoire, le dépôt est idéal pour les particules ayant un diamètre compris entre 1 et 100 nm. En dessous de 1 nm, les particules sont soumises au mouvement brownien et ont une absorption moindre. *A contrario*, les particules ayant un diamètre supérieur à 100 nm se déposent majoritairement dans la région nasopharyngée, étant soumises aux phénomènes d'impaction et d'interception.

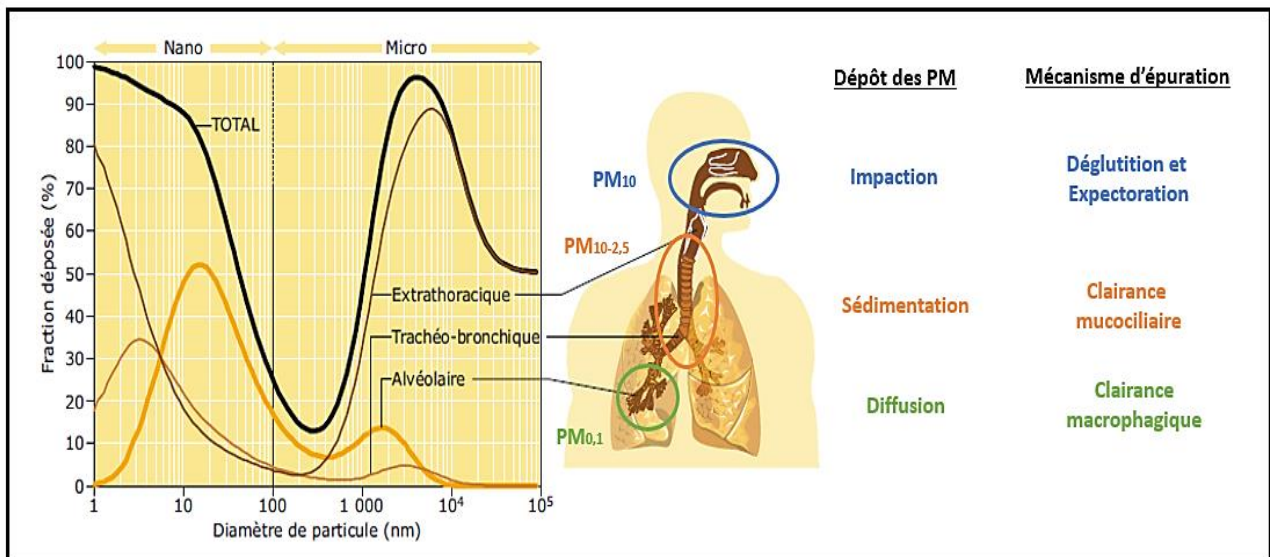


Figure 15 : Pénétration, dépôt et principaux mécanismes pulmonaires d'élimination des particules atmosphériques, adaptée de l'Institut National de Recherche et de Sécurité - 2023.

4. Mécanismes de clairance pulmonaire

Après inhalation et déposition, la fraction soluble des particules est rapidement métabolisée tandis que l'efficacité d'élimination de la fraction insoluble est, quant à elle, dépendante de la région de dépôt de ces dernières où les procédés d'épuration physique et/ou chimique décrits ci-après seront plus ou moins efficaces (tableau 9) :

- Les processus d'élimination chimique des particules se déroulent tout au long du tractus pulmonaire par **dissolution totale ou partielle** (*i.e.*, lixiviation), ou par **fixation à des protéines**, afin d'être éliminées par la circulation sanguine et/ou lymphatique.
- Les processus d'élimination physique des particules varient quant à eux en fonction des 3 régions du système respiratoire. Ainsi, au niveau de la région nasopharyngée, les particules seront préférentiellement éliminées par intervention de l'**ascenseur muco-ciliaire** avant d'être dégluties et/ou expectorées. Certaines PUF seront également évacuées du système pulmonaire vers d'autres organes périphériques par **endocytose épithéliale** avant d'atteindre la circulation sanguine et/ou lymphatique mais aussi par passage le long des axones des **nerfs sensitifs** vers le système nerveux central. L'épithélium cilié s'arrêtant aux bronchioles terminales, les alvéoles ne sont pas directement sujettes à la clairance mucociliaire mais à l'intervention des macrophages alvéolaires qui, après phagocytose des particules, migrent jusqu'à l'épithélium cilié des bronchioles terminales et sont éliminés avec les sécrétions bronchiques. Ainsi, au niveau alvéolaire, l'élimination des particules se fait préférentiellement par **phagocytose macrophagique** dans les 6 à 12 heures suivant l'inhalation de ces dernières mais ne permet pas une élimination rapide de l'ensemble des $PM_{2,5}$ et $PM_{0,1}$ qui auront alors une demi-vie pouvant atteindre jusqu'à 700 jours chez l'Homme (58). Lorsque ce système n'est pas totalement efficace, certaines PUF pourront une nouvelle fois atteindre d'autres organes cibles par endocytose épithéliale et **translocation interstitielle** avant de rejoindre la circulation sanguine et/ou lymphatique. Enfin, dans la région intermédiaire trachéo-bronchique, l'ensemble de ces mécanismes d'épuration se complètent, à l'exception du passage par les neurones sensitifs, en faisant la zone d'épuration la plus efficace.

Tableau 9 : Mécanismes d'élimination des PUF déposées au niveau des régions nasale, trachéo-bronchique et alvéolaire, d'après Oberdörster - 2005 (58).

	Région nasale	Région trachéo-bronchique	Région alvéolaire
Élimination physique			
Mouvement mucociliaire	X	X	
Phagocytose par les macrophages		X	X
Endocytose épithéliale	X	X	X
Translocation interstitielle		X	X
Drainage lymphatique		X	X
Circulation sanguine	X	X	X
Neurones sensitifs	X		
Élimination chimique			
Dissolution	X	X	X
Lixiviation	X	X	X
Fixation à des protéines	X	X	X

5. Translocation systémique des PUF et effets toxiques associés

Comme mentionné dans la partie précédente (Partie I, III, 4), après avoir été inhalées, les particules ayant le Dae le plus faible sont susceptibles d'être retenues et absorbées au niveau de l'épithélium pulmonaire, notamment au niveau des régions alvéolaires les plus profondes. À cet étage, la persistance des particules et notamment des PM_{0,1}, est favorisée par l'épuration phagocytaire qui est nettement moins efficace. L'interaction de ces PUF avec le surfactant pulmonaire est ainsi susceptible d'induire une rétention de ces dernières allant de plusieurs semaines à plusieurs mois voire années (59,60). Ces dernières peuvent alors interagir de façon accrue avec les cellules épithéliales et subir des phénomènes d'endocytose et de translocation interstitielle, conduisant à leur transport vers des organes cibles périphériques via les circulations sanguine et lymphatique. L'hypothèse d'une translocation directe des PUF de l'épithélium olfactif vers le cerveau a également déjà été avancée (61,62). L'excrétion cérébrale étant limitée, une accumulation des PUF peut se produire dans ce dernier. La translocation systémique des PM_{0,1} a déjà été décrite dans la littérature mais principalement suite à l'extrapolation de résultats obtenus *in vivo* à partir d'exposition de modèles murins à des nanomatériaux (*e.g.*, dioxyde de titane : TiO₂, oxyde de zinc : ZnO) ou certaines PUF spécifiques (*i.e.*, Diesel Exhaust Particles : DEP), à des doses et par des modes d'administration le plus souvent peu représentatifs des expositions environnementales (63–65). Bien que le système respiratoire reste à court terme le principal organe cible des PUF, d'autres organes dont le cœur, le cerveau, le foie et les reins ont déjà été cités parmi les organes-cibles des PUF, après translocation et distribution systémique via le sang et la lymphe (figure 16) (56,66–70).

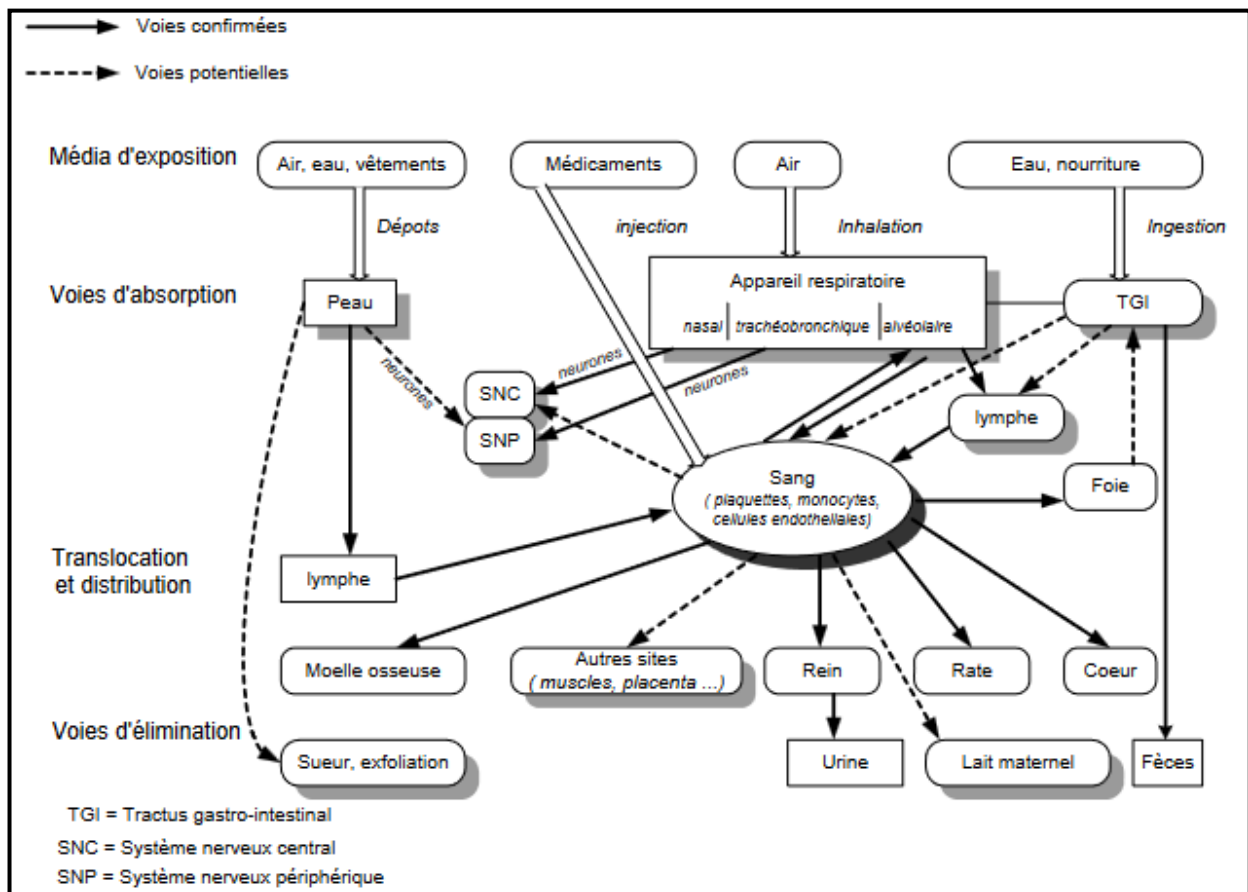


Figure 16 : Toxicocinétique des PUF après inhalation, d'après l'Institut de Recherche en Santé et Sécurité du Travail – 2010 (56).

A. Effets sur la santé respiratoire

Le tableau 10 rassemble des études expérimentales *in vivo* ayant cherché à étudier l'impact sanitaire des PUF atmosphériques sur le système respiratoire. Ces dernières suggèrent que les PUF ont la capacité d'induire une réponse oxydante et inflammatoire du tractus respiratoire, qui est plus intense que celle observée avec des particules de diamètre plus important (71,72). Cette dernière est variable en fonction de la durée et de la dose d'exposition aux PUF, mais aussi de l'âge et de l'espèce utilisée. Néanmoins, que l'exposition soit aigue ou sub-chronique, la réponse oxydante semble être caractérisée par une production accrue d'ERO couplée à une génération de dommages oxydatifs, à l'origine d'un stress oxydant pulmonaire tandis que la réponse inflammatoire semble, quant à elle, être caractérisée par un recrutement de cellules immunitaires (*e.g.*, macrophages, neutrophiles, lymphocytes) et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (*e.g.*, IL-1 β , IL-4, IL-6, TNF- α) (73–79). Des paramètres liés à la coagulation (*e.g.*, facteur tissulaire, PAI-1) et à la vasoconstriction (*e.g.*, récepteurs A et B de l'endothéline, endothéline-1) semblent également altérés (74,78).

Par ailleurs, des études expérimentales *in vivo* ont également démontré la capacité des PUF à potentialiser la réponse allergique, notamment chez les individus asthmatiques. Ainsi, plusieurs études ayant employé des souris sensibilisées à l'ovalbumine ont démontré une augmentation significative de l'immunoglobuline E (IgE) associée au recrutement de cellules éosinophiles, caractéristiques de l'inflammation à composante allergique (80,81), à la suite d'une exposition sub-chronique aux PUF.

Des observations similaires ont également été réalisées chez l'Homme dans des études épidémiologiques cherchant à évaluer l'impact sanitaire à court terme d'une exposition aux PUF au niveau pulmonaire (tableau 11). Une augmentation significative des marqueurs de stress oxydant et d'inflammation a ainsi pu être constatée dans le condensat d'air exhalé des individus exposés aux PUF, confortant les résultats des études expérimentales (82–84). Une augmentation de la fraction exhalée du monoxyde d'azote, reflet de l'existence d'une inflammation bronchique éosinophile, a également pu être observée, confortant le potentiel allergisant des PUF, comme ont pu le suggérer plusieurs des études *in vivo* citées précédemment (85–87). De plus, une diminution de la fonction ventilatoire a pu être constatée entre le début et la fin de l'exposition aux PUF (88). En outre, des études ont démontré que l'exposition à court terme à des PUF était responsable d'une augmentation du nombre d'hospitalisations et de la mortalité, toutes causes respiratoires confondues (89,90). Il est à noter qu'aucune publication examinant la relation entre l'exposition à long terme à des PUF et la santé respiratoire n'a été établie à ce jour.

Tableau 10 : Résumé des études in vivo citées analysant les effets des PUF sur la santé respiratoire

CONDITIONS D'EXPOSITION		MODELE	EFFETS SANITAIRES OBSERVES	REFERENCE
AIGUE	Nanoparticules de carbone suie 2,5 mg/kg tous les 2 jours pendant 6 jours Instillations intratrachéales	Souris Balb/c	<ul style="list-style-type: none"> • Altérations histologiques : collapsus alvéolaire, hyperémie, infiltrations de cellules inflammatoires. • Inflammation : recrutement macrophagique, ↑ TNF-α <ul style="list-style-type: none"> • Stress oxydant : ↑ production ERO 	(73)
	Nanoparticules de carbone 24h (172 µg/m ³) Corps-entier	Rats spontanément hypertendus	<ul style="list-style-type: none"> • Inflammation : neutrophilie, ↑ IL-6 <ul style="list-style-type: none"> • Stress oxydant : ↑ HO-1 • Vasoconstriction : ↑ endothéline-1, récepteurs A et B de l'endothéline <ul style="list-style-type: none"> • Coagulation : Facteur tissulaire, PAI-1 	(74)
	PUF (< 100 nm, 526 µg/m ³ , 24h), 24h avant la sensibilisation à l'ovalbumine	Souris Balb/c sensibilisées à l'ovalbumine	<ul style="list-style-type: none"> • Recrutement de cellules immunitaires <ul style="list-style-type: none"> • ↑ IL-4, IL-5, IL-13 • ↑ Production de mucus • Inflammation péribronchique et périvasculaire (NFκB) <ul style="list-style-type: none"> • Hyperréactivité des voies respiratoires • Stress oxydant (8-IsoP) 	(76,77)
	Nanoparticules de carbone 20 ou 50 µg quotidienne pendant 1 à 7 jours Instillations intratrachéales	Souris JF1/Msf	<ul style="list-style-type: none"> • Recrutement de cellules macrophages et lymphocytes <ul style="list-style-type: none"> • ↑ IL-1β, IL-4, CCL22, FVII, vWF 	(78)
SUB- CHRONIQUE	PUF issues de la combustion incomplète du 1-3-butadiène, 5 mg/m ³ , 4h/j pendant 21 j, Corps entier	Souris Balb/c	<ul style="list-style-type: none"> • Recrutement de neutrophiles <ul style="list-style-type: none"> • ↑ IL-1β • Induction de gènes du stress oxydant • Persistance jusqu'à 10 j après la dernière exposition 	(75)
	PUF ambiantes 2 semaines, 10 µg tous les 2 jours, Instillations intratrachéales	Souris C57BL/6	<ul style="list-style-type: none"> • ↑ Recrutement lymphocytes T auxiliaires • ↓ Lymphocytes T régulateurs et TGF-β • ↑ Protéines totales pulmonaires 	(79)
	PUF (< 150nm) issues du trafic routier, 4h/jour, 5j/semaine pendant 2 semaines, Corps entier	Souris Balb/c sensibilisées à l'ovalbumine	<ul style="list-style-type: none"> • Recrutement d'éosinophiles <ul style="list-style-type: none"> • ↑ IgE, IgG1, IL-5 	(80)
	4h/jour, 5j/semaine pendant 26 jours à des PUF (< 180nm) Corps entier	Souris Balb/c sensibilisées à l'ovalbumine	<ul style="list-style-type: none"> • ↑ IgE, IgG1, IL-5, IL-13, Il-17a • Recrutement d'éosinophiles et neutrophiles 	(81)

Tableau 11 : Résumé des études épidémiologiques citées analysant les effets des PUF sur la santé respiratoire

CONDITIONS D'EXPOSITION		EFFETS SANITAIRES OBSERVES	REFERENCE
COURT TERME	PUF issues du trafic routier	<ul style="list-style-type: none"> ↑ Marqueurs de l'inflammation et du stress oxydant dans le condensat d'air exhalé 	(82)
	Nanoparticules de carbone 4 µg/m ³ ; 6,1+/- 0.4 × 10 ⁵ PUF/cm ³ pendant 2 h. Exposition contrôlée randomisée en double aveugle de personnes asthmatiques allergiques	<ul style="list-style-type: none"> Pas d'effet significatif sur la réponse inflammatoire induite par l'allergène mais ↑ du nombre total de cellules dans les LBA, d'éosinophiles et monocytes, ↑ production ERO 	(83)
	PUF issues du trafic routier Patients BPCO	<ul style="list-style-type: none"> ↑ Marqueurs de l'inflammation et du stress oxydant dans le condensat d'air exhalé 	(84)
	PUF de suie 11,54 µg/m ³ pendant 2h Exposition contrôlée	<ul style="list-style-type: none"> ↑ Fraction exhalée du monoxyde d'azote 	(85)
	PUF ambiantes	<ul style="list-style-type: none"> ↑ Fraction exhalée du monoxyde d'azote 	(86)
	PUF ambiantes Etude quasi-expérimentale	<ul style="list-style-type: none"> ↑ Fraction exhalée du monoxyde d'azote <ul style="list-style-type: none"> Inflammation systémique 	(87)
	PUF issues du trafic routier Etude semi-expérimentale	<ul style="list-style-type: none"> ↓ Fonction ventilatoire 	(88)
	PUF ambiantes Méta-analyse de séries temporelles	<ul style="list-style-type: none"> ↑ Nombre d'hospitalisations pour causes respiratoires 	(89)
	PUF ambiantes	<ul style="list-style-type: none"> ↑ Mortalité toutes causes respiratoires 	(90)

B. Effets sur la santé cardiovasculaire

Le tableau 12 rassemble des études expérimentales *in vivo* ayant cherché à étudier l'impact sanitaire des PUF atmosphériques sur le système cardiovasculaire. De la même manière que ce qui avait pu être observé au niveau pulmonaire, il semblerait que les PUF aient la capacité d'induire une réponse oxydante et inflammatoire cardiaque (74,91,92). Que l'exposition soit aiguë ou sub-chronique, la réponse oxydante semble être caractérisée par une production accrue d'ERO couplée à une génération de dommages oxydatifs, à l'origine d'un stress oxydant pulmonaire. L'accumulation des lipides oxydés dans les vaisseaux sanguins alimentant le cœur induit la formation de plaques d'athérome à leur surface, pouvant potentiellement engendrer de graves complications de type infarctus du myocarde (93,94). En parallèle, une sécrétion accrue de marqueurs de la coagulation (*e.g.*, fibrinogène, inhibiteur de l'activateur du plasminogène 1 : PAI-1, Facteur de Von Willebrand : vWF) et de la vasoconstriction (*e.g.*, endothélines 1 et 2) accentue cet effet thrombogène (74,95–97). En conséquence, une altération du rythme cardiaque et de la pression artérielle est fréquemment observée (96–98). À cela s'ajoute une réponse inflammatoire caractérisée par un recrutement de cellules granulocytaires, la sécrétion de protéines de l'inflammation (*e.g.* Protéine C-réactive : CRP, haptoglobine), une diminution des capacités anti-inflammatoires et l'activation de la cascade du complément (74,91,92).

Des observations similaires ont également été réalisées chez l'Homme dans des études épidémiologiques cherchant à évaluer l'impact sanitaire à court ou long terme d'une exposition aux PUF au niveau cardiovasculaire (tableau 13). Une augmentation significative des marqueurs pro-inflammatoires (*e.g.*, TNF- α , TNF-RII, IL-1 β , IL-6, IL-8, CRP, sélectine-P, Vascular cell adhesion protein 1 : VCAM-1) et anti-inflammatoires (*e.g.*, IL-10) a ainsi pu être constatée au niveau systémique, confortant les résultats des études expérimentales (99–104). Par ailleurs, un épaississement de l'intima-média carotidienne, marqueur d'athérosclérose et de risque cardiovasculaire, a pu être constaté à la suite d'une exposition à long terme aux PUF (105). En parallèle, une élévation significative des marqueurs de la coagulation (*e.g.*, fibrinogène, PAI-1, vWF) et de la vasoconstriction (*e.g.*, endothéline-1) est constatée (99,100,102,106). De la même manière que ce qui avait pu être observé *in vivo*, une altération de la pression artérielle, du rythme cardiaque et la fonction vasculaire, couplée à une rigidité artérielle accrue est observée, potentielles conséquences des effets décrits précédemment (85,99,107–109). En outre, il a été démontré que l'exposition aux PUF, même à court terme, était responsable d'une augmentation du nombre d'hospitalisations pour causes cardiovasculaires (110).

Tableau 12.: Résumé des études in vivo citées analysant les effets des PUF sur la santé cardiovasculaire

CONDITIONS D'EXPOSITION		MODELE	EFFETS SANITAIRES OBSERVES	REFERENCE
UNIQUE	PUF ambiantes 100 µg/200 µL HBSS Aspiration oropharyngée	Rats Sprague-Dawley	<ul style="list-style-type: none"> Expansion des lésions d'ischémie/reperfusion par ↑ de l'ouverture du pore de perméabilité mitochondriale et induction de la mort cellulaire 	(111)
	Nanoparticules de carbone 24h (172 µg/m ³) Corps entier	Rats spontanément hypertendus	<ul style="list-style-type: none"> ↑ Pression artérielle ↑ rythme cardiaque ↑ Marqueurs de la coagulation et vasoconstriction : endothéline-1, PAI-1, récepteurs à l'endothéline Inflammation systémique : ↑ CRP, haptoglobine et fibrinogène sérique <ul style="list-style-type: none"> Stress oxydant : HO-1 	(74)
AIGUE	PUF issues du trafic routier 300-350 µg/m ³ pendant 45h Corps entier	Souris C57BL/6J	<ul style="list-style-type: none"> Stress oxydant : ↑ 8-OhdG, Gp91^{phox} Inflammation : ↑ granulocytes, Ly-6G, C5, C5a, CD88 <ul style="list-style-type: none"> Marqueurs précoces d'AVC 	(91)
	PUF issues du trafic routier 1-3x10 ⁵ /cm ³ pendant 6h	Rats spontanément hypertendus	<ul style="list-style-type: none"> Vasoconstriction : ↑ endothéline-2 <ul style="list-style-type: none"> ↑ Pression artérielle ↓ rythme cardiaque 	(96,97)
	Nanoparticules de carbone 180 µg/m ³ pendant 24h Corps entier	Rats WKY	<ul style="list-style-type: none"> ↑ rythme cardiaque 	(98)
	Nanoparticules de carbone 440 µg/m ³ pendant 24h Corps entier	Souris C57BL/6J	<ul style="list-style-type: none"> Effets thrombogènes dans la microcirculation coronaire associés à une ↑ du fibrinogène 	(112)
	PUF ambiantes 5x10 ⁵ µg/m ³ , 5h/j, 3j/semaine pendant 5 semaines	Souris ApoE -/-	<ul style="list-style-type: none"> 25 % de lésions d'athérosclérose supplémentaires et 55 % plus larges ↓ des capacités anti-inflammatoires de l'HDL <ul style="list-style-type: none"> Stress oxydant systémique 	(92)
SUB-CHRONIQUE	PUF ambiantes 58 µg/m ³ , 5h/j, 4j/semaine pendant 8 semaines	Souris ApoE -/-	<ul style="list-style-type: none"> Formation plaques d'athérome avec accumulation de lipides oxydés <ul style="list-style-type: none"> Atteintes du rythme cardiaque 	(93)
	PUF ambiantes, 360 µg/m ³ , 5h/j, 3j/semaine pendant 10 semaines	Souris LDLR-/-	<ul style="list-style-type: none"> Formation plaques d'athérome avec accumulation de lipides oxydés 	(94)

Tableau 13 : Résumé des études épidémiologiques citées analysant les effets des PUF sur la santé cardiovasculaire

CONDITIONS D'EXPOSITION		EFFETS SANITAIRES OBSERVES	REFERENCE
COURT TERME	PUF de suie 11,54 µg/m ³ pendant 2h Exposition contrôlée	<ul style="list-style-type: none"> Altérations de la pression artérielle 	(85)
	PUF urbaines	<ul style="list-style-type: none"> Altérations de la pression artérielle Altérations de la fonction vasculaire <ul style="list-style-type: none"> Coagulation Inflammation systémique 	(99)
	PUF urbaines	<ul style="list-style-type: none"> Coagulation : ↑ Fibrinogène Inflammation systémique : ↑ TNF-α, IL-6, IL-8 	(100)
	PUF issues du trafic routier, d'une gare, d'une zone rurale et d'une zone urbaine	<ul style="list-style-type: none"> Inflammation systémique : recrutements de leucocytes 	(101)
	PUF issues de la fumée de bois	<ul style="list-style-type: none"> Inflammation systémique Coagulation : ↑ Fibrinogène, ↓ activité de la myéloperoxydase 	(102)
	PUF urbaines	<ul style="list-style-type: none"> Inflammation : ↑ CRP, sélectine-P, VCAM-1, IL-1β, IL-10 Coagulation : ↑ Fibrinogène, PAI-1, vWF Vasoconstriction : ↑ Endothéline-1 	(106)
	PUF urbaines	<ul style="list-style-type: none"> Altérations de la pression artérielle 	(107)
	PUF urbaines	<ul style="list-style-type: none"> Altérations du rythme cardiaque 	(108)
	PUF urbaines	<ul style="list-style-type: none"> ↑ Hospitalisations de causes cardiovasculaires 	(110)
LONG TERME	PUF urbaines 28 jours	<ul style="list-style-type: none"> Inflammation systémique Méthylation de l'ADN 	(103)
	PUF	<ul style="list-style-type: none"> Inflammation systémique : ↑ IL-6, CRP, TNF-RII 	(104)
	PUF urbaines Etude de cohorte	<ul style="list-style-type: none"> Marqueur d'athérosclérose : ↑ épaisseur de l'intima-média carotidienne 	(105)
	PUF ambiantes	<ul style="list-style-type: none"> Rigidité artérielle 	(109)

C. Effets sur la santé neurologique

Le tableau 14 rassemble des études expérimentales *in vivo* ayant cherché à étudier l'impact sanitaire des PUF atmosphériques sur le cerveau. Comme précédemment, il semblerait qu'une exposition sub-chronique ou chronique aux PUF ait la capacité d'induire une réponse oxydante et inflammatoire au niveau cérébral. Cette neuro-inflammation semble être caractérisée par la sécrétion de cytokines (*e.g.*, IL-1 β , TNF- α) et l'activation des facteurs de transcription NF κ B et AP-1, dépendante de la voie de signalisation impliquant la kinase JNK (113–116). La composition riche en métaux de transition des PUF (*e.g.*, Fe, Cu, Cr, Co) serait responsable de cette réponse inflammatoire (117). En effet, une fois arrivés dans les neurones et la microglie, ces métaux peuvent subir des réactions de Fenton conduisant à la formation d'ERO. Les signaux envoyés par les neurones lésés conduisent ensuite à l'activation gliale dont le but est de rétablir la survie et la réparation neuronale (64). Cet environnement pro-inflammatoire intense, aggravé par le recrutement de cellules immunitaires périphériques, est susceptible d'initier et exacerber une neuro-dégénération, impliquée dans la progression de nombreuses maladies neurodégénératives telles que les maladies de Parkinson ou d'Alzheimer (57). Un nombre conséquent d'études cherchant à évaluer l'impact d'une exposition pré-natale aux PUF a montré des effets similaires sur la descendance (116,118,119). Dans ces dernières, des changements morphologiques et notamment une altération de la taille des différentes structures cérébrales (*e.g.*, corps calleux, hippocampe, ventricules cérébraux) a pu être observée. Par ailleurs, Allen et ses collaborateurs (2013, 2014 et 2017) ont démontré l'existence de troubles cognitifs et comportementaux à la suite de ces expositions particulières (116,120–122).

Bien que les études épidémiologiques cherchant à évaluer l'impact spécifique des PUF sur le système neurologique soient à l'heure actuelle beaucoup plus parcellaires, des observations similaires à celles effectuées *in vivo* ont pu être constatées (tableau 15). Certaines d'entre elles ont ainsi pu démontrer qu'une exposition à long terme aux PUF étaient susceptible d'induire le développement de tumeurs cérébrales malignes (123,124). Une autre étude a, quant à elle, démontré que les PUF induisait une hyperphosphorylation des protéines tau, α -synucléine et TDP-53, impliquée dans le développement et l'exacerbation des pathologies neurodégénératives d'Alzheimer, de Parkinson et de la Sclérose latérale amyotrophique (117). Enfin, des études réalisées chez des enfants exposés aux PUF urbaines issues du trafic routier ont suggéré leur capacité à induire des troubles de la mémoire et de l'attention sur le long terme (125,126).

Tableau 14 : Résumé des études in vivo citées analysant les effets des PUF sur la santé neurologique

CONDITIONS D'EXPOSITION		MODELE	EFFETS SANITAIRES OBSERVES	REFERENCE
SUB- CHRONIQUE	PUF issues du trafic routier, 113 µg/m ³ 4h/j, 5j/semaines, pendant 2 semaines, Corps entier	Souris Balb/c sensibilisées à l'ovalbumine	<ul style="list-style-type: none"> Réponse inflammatoire et immunitaire : ↑ IL-1α, TNF-α, Activation du facteur de transcription NFκB 	(113)
	PUF issues du trafic routier, 282,5 µg/m ³ 5h/j, 3j/semaine, pendant 5 semaines, Corps entier	Souris C57BL/6J ApoE -/-	<ul style="list-style-type: none"> Réponse inflammatoire et immunitaire : ↑ IL-1α, TNF-α, Activation des facteurs de transcription NFκB et AP-1 	(114)
	PUF issues du trafic routier 5h/j, 3j/semaine, pendant 5 semaines, Corps entier	Souris C57BL/6J ApoE -/-	<ul style="list-style-type: none"> Réponse inflammatoire et immunitaire : ↑ dose-dépendante de la translocation nucléaire des facteurs de transcription NFκB et AP-1 ; Activation de JNK <ul style="list-style-type: none"> Activation gliale : ↑ GFAP 	(115)
	PUF ambiantes, 96 µg/m ³ 4h/j, 4j/semaine, pendant de 4-7 j à 10-13 j post-accouchement (=équivalent du 3 ^{ème} trimestre de grossesse chez l'Homme), Corps entier	Souris C57BL/6J	<p>Chez la descendance mâle > femelle :</p> <ul style="list-style-type: none"> Inflammation Activation gliale et astrocytaire ↓ Taille corps calleux, Hypomyélinisation, développement aberrant de la substance blanche, ventriculomégalie <ul style="list-style-type: none"> ↑ Glutamate Troubles cognitifs et comportementaux 	(116)
	PUF ambiantes, 92,69 µg/m ³ 6h/j pendant les jours de gestation 0,5 à 16,5, Corps entier	Souris B6C3F1	<p>Chez la descendance :</p> <ul style="list-style-type: none"> Ventriculomégalie, ↑ Taille du corps calleux, ↓ taille de l'hippocampe, Hypermyélinisation, ↓ nombre de cellules de la microglie <ul style="list-style-type: none"> Activation gliale 	(118)
	Nanoparticules de carbone (Printex 90) 2,9 ; 15 ; 73 µg/mL Instillation intranasale aux jours de gestation 5 et 9	Souris ICR	<p>Chez la descendance mâle > femelle :</p> <ul style="list-style-type: none"> Activation gliale : ↑ GFAP dans cortex cérébral ↑ Aquaporine-4 dans le parenchyme cérébral Angiogenèse, migration/prolifération cellulaire, chimiotactisme, production de facteurs de croissance 	(119)
	Nanoparticules de carbone (Printex 90) 95 µg/kg Instillation intranasale aux jours de gestation 5 et 9	Souris ICR	<p>Chez la descendance :</p> <ul style="list-style-type: none"> Stress oxydant 	(127)

Tableau 15 : Résumé des études épidémiologiques citées analysant les effets des PUF sur la santé neurologique

CONDITIONS D'EXPOSITION		EFFETS SANITAIRES OBSERVES	REFERENCE
LONG TERME	PUF ambiantes Autopsies de personnes décédées subitement	<ul style="list-style-type: none"> • Hyperphosphorylation des protéines tau, α-synucléine, TDP-53 dans le tronc cérébral <ul style="list-style-type: none"> • Lésions de la substance noire <ul style="list-style-type: none"> • Production d'ERO • Altération de la signalisation cellulaire 	(117)
	PUF issues du trafic aérien 6700 PUF/cm ³	<ul style="list-style-type: none"> • ↑ Tumeurs malignes cérébrales 	(123)
	PUF ambiantes	<ul style="list-style-type: none"> • ↑ Tumeurs malignes cérébrales 	(124)
	PUF ambiantes, à proximité du trafic routier → Enfants	<ul style="list-style-type: none"> • ↓ Développement de la mémoire de travail et de l'attention • Persistance de ces effets sur une période de 3 ans et demi 	(125,126)

D. Autres effets sur la santé

Bien que les études actuelles aient essentiellement porté sur leurs trois organes cibles majeures que sont les poumons, le cœur et le cerveau, il semblerait que les PUF soient capables d'avoir un impact délétère sur d'autres structures de l'organisme.

Des études épidémiologiques ont ainsi démontré que les PUF pouvaient avoir un impact sanitaire sur la santé périnatale. En effet, une étude américaine cas-cohorte a démontré que l'exposition aux PUF issues du trafic routier pendant la grossesse constituait un facteur de risque de faible poids à la naissance (128). Ceci a également été constaté dans une autre étude, dans laquelle un impact des PUF sur la survenue de naissances prématurées, de pré-éclampsie et de diabète gestationnel a aussi été observé (129). L'apparition de ces effets néfastes s'expliqueraient par la translocation placentaire des PUF, ainsi que par leur capacité à induire un stress oxydant et une inflammation placentaires (130).

Par ailleurs, les PUF sont capables d'impacter la santé métabolique. En effet, il semblerait qu'elles soient capables d'altérer le métabolisme des bactéries intestinales et moduler certaines voies métaboliques impliquées dans la biosynthèse des acides aminés et le métabolisme du glucose *in vivo*, constituant un facteur de risque de développer certaines maladies telles que le diabète ou l'obésité (131). Une étude épidémiologique a également démontré qu'une exposition à ces dernières induisait un risque accru de survenue d'hypertension artérielle et de diabète (132). Par ailleurs, chez les sujets diabétiques, l'exposition aux PUF affecterait la tolérance au glucose et la fonction cardiaque (133–135).

De nombreuses études expérimentales ont montré que les PM étaient mutagènes et tumorigènes et que ce potentiel toxique était taille dépendant (136,137). En effet, plus la taille des PM est faible, plus ce potentiel est important. Cette propriété toxique favorise l'apparition de cancer. Il a ainsi été démontré que l'exposition aux PUF constituait un facteur de risque de survenue de cancer de la prostate (138). Elles seraient également impliquées dans la progression tumorale pulmonaire. En effet, une étude a suggéré qu'elles induisaient une reprogrammation du métabolisme macrophagique, favorisant l'immunosuppression (139). Une autre a, quant à elle, démontré qu'elles favorisaient l'apparition de métastases cellulaires par le biais de l'adhésion des cellules cancéreuses médiée par HMGB1 (140). Les PUF seraient par ailleurs susceptibles d'induire des altérations érythrocytaires incluant notamment des changements morphologiques tels que l'apparition d'érythrocytes en forme de faucille ou de larme (141).

Bien que les résultats de ces études aient suggéré un impact sanitaire multi-organe des PUF, il est encore difficile d'établir un lien formel entre la survenue de ces événements et une exposition à ces dernières, du fait des contraintes de mesure individuel auxquels se heurtent les études épidémiologiques actuelles. En effet, la prise en compte des parts relatives des atmosphères intérieures et extérieures, la variabilité interindividuelle ainsi que l'état général de l'individu (*e.g.*, âge, pathologies sous-jacentes) associés à la complexité physico-chimique et la grande variabilité temporelle des émissions de PUF empêchent d'établir une estimation précise de l'exposition de la population sur le long terme, à l'échelon individuel. Par ailleurs, une grande partie des études cherchant à évaluer l'impact sanitaire de la pollution particulaire s'intéresse aux PM_{2,5}, ne permettant pas d'évaluer avec précision la contribution spécifique des PUF. Afin de combler ces lacunes et de mieux appréhender les bases cellulaires et moléculaires des mécanismes physiopathologiques sous-jacents impliqués dans les effets délétères des PUF, des approches globales et systématiques utilisant des modèles *in vitro* et *in vivo* s'avèrent donc nécessaires.

IV. Mécanismes de toxicité des particules ultrafines

1. Stress oxydant

A. Généralités

L'oxygène est un élément indispensable à la production d'énergie (adénosine triphosphate, ATP) de nombreux organismes vivants. Ce processus, nommé phosphorylation oxydative, se fait par l'intermédiaire de chaînes de transport d'électrons dans la membrane interne mitochondriale et génère des espèces réactives de l'oxygène (ERO) indispensables au métabolisme physiologique en intervenant dans la défense anti-infectieuse, les voies de signalisation intra-cellulaires ou la division cellulaire (142,143). Ces ERO sont des molécules instables et réactives possédant un électron libre (*e.g.*, O_2^\bullet , RO_2^\bullet , $^\bullet OH$), pouvant intervenir sur différents composants cellulaires et induire d'importantes modifications fonctionnelles généralement définitives, à l'origine de dommages biologiques irréversibles. Au niveau des phospholipides membranaires, elles peuvent être impliquées dans des phénomènes de peroxydation lipidique, à l'origine d'une perturbation de l'intégrité membranaire et d'une altération fonctionnelle des récepteurs de cette dernière, pouvant conduire à la mort cellulaire. Ce processus génère de nombreux produits d'oxydation pouvant être dosés dans les fluides biologiques, tels que le 8-isoprastane (8-IsoP), le 4-Hydroxynonanal (4-HNE), et le malondialdéhyde (MDA). Les ERO peuvent également agir au niveau des acides aminés constitutifs des protéines, induisant une altération fonctionnelle de ces dernières et parfois une détérioration de l'activité des enzymes (144). Il est ainsi possible qu'un récepteur ne soit plus reconnu par son ligand naturel. Les acides nucléiques constituent également une cible préférentielle des ERO et notamment du radical hydroxyle qui est formé lors de l'oxydation des métaux de transition par le peroxyde d'hydrogène en suivant la réaction de Fenton. En effet, leur oxydation conduit à une altération des gènes par cassures et/ou mutations et à la génération d'adduits mutagènes et cancérogènes. À titre d'exemple, l'oxydation de la guanosine induit la formation de la 8-hydroxy-2'-déoxyguanosine (8-OHdG) ou de la 8-hydroxyguanosine (8-OHG) (143). Afin de maintenir un état d'homéostasie redox et éviter l'apparition de ces lésions oxydatives, la cellule contrôle la concentration en ERO à l'aide, notamment, de systèmes de défenses antioxydantes de nature enzymatique tels que les enzymes de détoxification (*e.g.*, Hème Oxygénase 1 (HO-1), NAD(P)H Quinone Déshydrogénase 1 (NQO1), Superoxyde Dismutase (SOD), Glutathion peroxydase (GPX), Glutathion réductase (GR), Catalase (CAT)) étant sous la dépendance de la voie de signalisation du Nuclear factor erythroid-2-related factor 2 (NRF2), ou de nature non enzymatique tels que le glutathion réduit (GSH), les flavonoïdes ou les vitamines A, C et E (145–147) (figure 17).

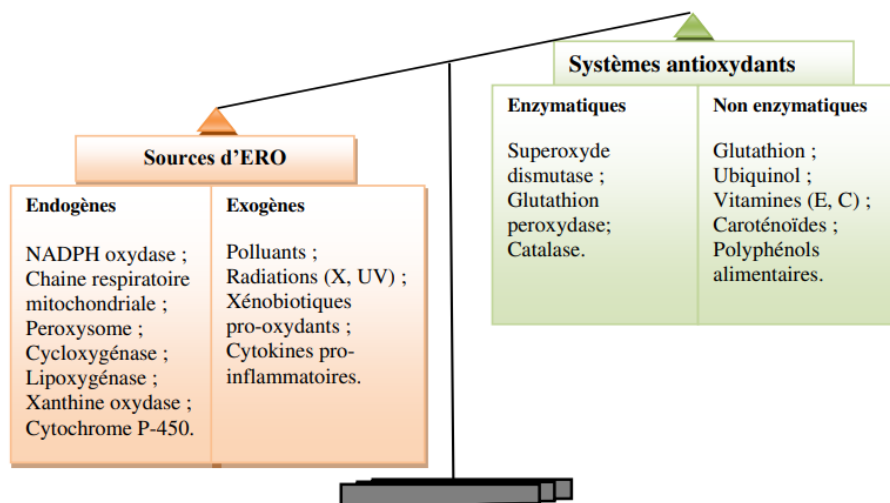


Figure 17 : Déséquilibre de la balance pro-oxydants et antioxydants, d'après Sabiha - 2013 (147).

Lorsque les ERO sont générées en excès et que l'oxydation des molécules antioxydantes les rend inefficaces pour faire face aux dommages générés, cet état d'homéostasie cellulaire se rompt, provoquant alors des conditions de stress oxydant. Une fois instauré, ce dernier active diverses voies de signalisation dont celle du facteur de transcription NRF2. Ce facteur de transcription, ubiquitaire au niveau pulmonaire et principalement exprimé par les cellules épithéliales et les macrophages alvéolaires, est capable d'activer la séquence régulatrice ARE située dans la région promotrice de gènes antioxydants et anti-inflammatoires (148,149). Il s'agit d'une protéine codée par le gène NFE2L2 qui, en l'absence d'oxydants, est séquestrée dans le cytoplasme, fixée au cytosquelette par la Kelch-like ECH-associated protein 1 (KEAP1) et dégradée par le protéasome (figure 20) (145). *A contrario*, en présence d'oxydants, NRF2 est dissociée de son inhibiteur endogène KEAP1, lui permettant de transloquer au niveau nucléaire afin de former un hétérodimère avec des petites protéines telles que Maf, Jun, Fos ou l'Activating Transcription Factor (ATF), ce qui lui permet d'interagir avec l'ARE pour induire l'expression de gènes codant pour des enzymes de détoxification qui ont une activité antioxydante, détoxifiante et cytoprotectrice (150,151).

Outre ces défenses enzymatiques, des moyens de défenses de nature non enzymatique existent parmi lesquels le glutathion. Il s'agit d'une molécule antioxydante retrouvée majoritairement sous forme réduite GSH et synthétisée dans les hépatocytes par l'addition séquentielle de cystéine au glutamate suivie de l'ajout d'une glycine sous l'action de 2 enzymes : la glutamate cystéine ligase et la GSH synthétase. Des réactions de réduction et de conjugaison peuvent se produire au niveau du groupement thiol (-SH) nucléophile de la cystéine, permettant l'élimination des peroxydes et de nombreux xénobiotiques électrophiles (152). Dans le poumon, le GSH est indispensable à la protection de l'épithélium aérien face aux ERO et aux molécules inflammatoires. Il est, de plus, impliqué dans d'autres fonctions telles que : la régulation du cycle cellulaire, l'apoptose et la transcription de gènes. La présence de glutathion oxydé GSSG, dont le taux physiologique n'excède pas 1 % du glutathion total présent dans l'organisme, constitue un bon indicateur du stress oxydant. Ainsi, des modifications du ratio glutathion oxydé / glutathion réduit (GSSG/GSH) peuvent être à l'origine de modifications de nombreuses voies de signalisation impliquées dans la prolifération cellulaire, l'autophagie et l'apoptose (153). Une diminution du taux de GSH est d'ailleurs observée dans de nombreuses pathologies respiratoires telles que la fibrose pulmonaire idiopathique, l'asthme, le syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA) ou la BPCO (154). Le rapport GSSG/GSH constitue donc un indicateur approprié du degré de stress oxydant cellulaire. C'est pourquoi, ce ratio est actuellement utilisé afin de hiérarchiser les phénomènes biologiques (155,156) (figure 18).

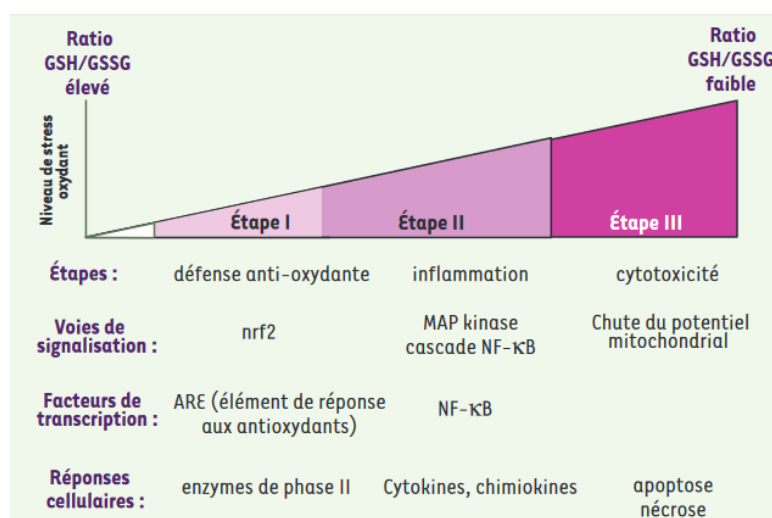


Figure 18 : Hiérarchisation des processus biologiques en fonction du rapport GSH/GSSG, d'après Baeza - 2007 (155).

Ainsi, lors d'un faible niveau de stress oxydant, l'activité antioxydante est induite, principalement via la voie de signalisation NRF2-ARE, restaurant l'homéostasie rédox de la cellule par l'intermédiaire de l'expression des enzymes de détoxification. Lorsque le déséquilibre est plus important, les voies de signalisation du nuclear factor-kappa B (NFκB) et des Mitogen-activated protein kinases (MAPK) sont activées, initiant la transcription de gènes pro-inflammatoires (*e.g.*, Tumor Necrosis Factor (TNFα), Interleukine-1β (IL-1β)) participant à l'initiation de la réponse pro-inflammatoire par l'intermédiaire de l'expression des cytokines et molécules d'adhésion. Enfin, si le stress oxydant est trop élevé, un déséquilibre dans l'expression des gènes antioxydants d'une part, et pro-inflammatoires d'autre part, peut se produire, conduisant au développement d'un environnement inflammatoire chronique. Dans ce contexte, la perméabilité mitochondriale est perturbée, menant à une désorganisation de la chaîne de transport des électrons, ayant pour conséquence l'apoptose ou la nécrose de la cellule par relargage de facteurs pro-apoptotiques par les mitochondries et le développement ou l'exacerbation de diverses pathologies notamment respiratoires (153,155,156) (figure 19).

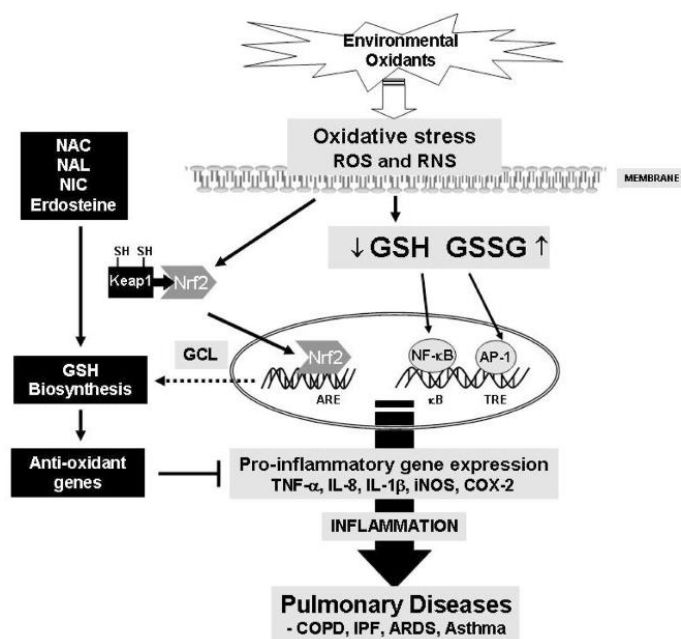


Figure 19 : Altération intracellulaire du rapport GSH/GSSG et régulation redox des maladies pro-inflammatoires et anti-inflammatoires, d'après Biswas -2009 (149).

B. Induction d'un stress oxydant par les PM

Les PM participent activement à l'oxydation de ces molécules antioxydantes, mais aussi à la production excessive d'ERO, qui peuvent être générées directement à partir de molécules adsorbées par les PM ou constitutrices de leur « cœur » (*e.g.*, métaux de transition, HAP) ou être produites dans l'organisme par l'intermédiaire de diverses réactions cellulaires catalysées par les constituants inorganiques et organiques des PM (157–159). Cette capacité des PM à générer des ERO et/ou à oxyder les molécules antioxydantes est définie comme leur « potentiel oxydant ». La mesure de ce paramètre pourrait constituer une nouvelle métrique à intégrer dans la réglementation actuellement en vigueur, car en plus de la masse et surtout du nombre ou de la réactivité de surface des PUF, elle permettrait de mieux apprécier leurs caractéristiques physico-chimiques complexes et leur réactivité biologique intrinsèque dans le cadre de la démarche d'évaluation et de gestion des risques sanitaires des PUF. Ce paramètre est mesuré par l'intermédiaire de tests acellulaires utilisant des méthodes chimiques dont le principe peut varier. Il est ainsi possible de distinguer les approches directes quantifiant les ERO présents au sein des particules (*e.g.*, CM-H₂DCFDA), des approches indirectes qui suivent

et quantifient la consommation d'une espèce antioxydante (*e.g.*, acide ascorbique ou glutathion réduit) ou d'un réducteur (*e.g.*, dithiothréitol) en présence de PM. L'utilisation de ces techniques est intéressante afin d'étudier la réactivité des particules et de prédire le stress oxydant. Des études expérimentales et épidémiologiques ont démontré l'induction de ce processus à la suite d'une exposition aux PUF (tableau 16). En effet, des études *in vitro* réalisées sur des cellules épithéliales pulmonaires humaines, ont montré qu'une exposition aiguë aux PUF induisait une production accrue d'ERO qui est nettement diminuée en cas d'ajout d'antioxydants (160,161). Cette production a également été démontré chez des cellules neuronales exposées de manière aiguë (162). Ces résultats sont confortés par des études *in vivo* réalisées sur des souris C57BL/6 dans lesquelles ces observations étaient couplées à une augmentation de l'activité des enzymes antioxydantes SOD et CAT à la suite d'une exposition unique, à laquelle s'ajoute l'activité des enzymes GSH-Px, HO-1, NQO1, Glutamate-Cysteine Ligase Catalytic subunit (GCLC) et Glutamate-Cysteine Ligase Modifier subunit (GCLM) lors d'une exposition sub-chronique (161,163). Des études épidémiologiques ont par ailleurs montré la présence de marqueurs du stress oxydant dans le condensat d'air exhalé (82,84). De plus, les résultats de nombreuses études expérimentales ont démontré que les particules atmosphériques et plus particulièrement les PM_{2,5} étaient également capables d'activer la voie de signalisation NRF2, lui permettant de réguler le stress oxydant et l'inflammation induits par ces dernières (160–164). Ceci a également pu être constaté avec les PUF, bien que le nombre d'études soit, à ce jour, plus parcellaire (159,165–167). Une étude, réalisée *in vitro*, a ainsi montré que l'exposition aiguë de cellules épithéliales et macrophagiques alvéolaires de rat à des PUF induisait une augmentation significative de la translocation nucléaire du facteur de transcription Nrf2 (159). Une autre étude réalisée cette fois-ci sur des cellules épithéliales bronchiques humaines a montré que cette exposition induisait, en aval, une augmentation de l'expression génique de *NRF2* mais également de ses gènes cibles *HO-1* et *NQO1* (166). Ces observations ont pu être confortées dans des études *in vivo* dans lesquels une activité accrue des enzymes antioxydantes a aussi pu être constatée (165,167). En parallèle, les composants organiques des PUF et notamment les HAP, traversent la membrane cellulaire en raison de leur lipophilie, leur permettant de se fixer au récepteur à l'Aryl Hydrocarbène, AhR (figure 20). Cette fixation entraîne la translocation de ce dernier vers le noyau, où il se lie à l'XRE, induisant l'activation des gènes des enzymes de phase I/II (*i.e.*, *Sod*, *Cat*, *Gpx*, *Hmox-1*, *Nqo1*) et des cytochromes, contribuant au stress oxydant ambiant (168). En effet, une exposition prolongée ou répétée aux HAP est susceptible de booster la réponse oxydante, conduisant à l'inactivation de la voie de signalisation NRF2 et à l'altération de l'homéostasie redox mitochondriale (168,169).

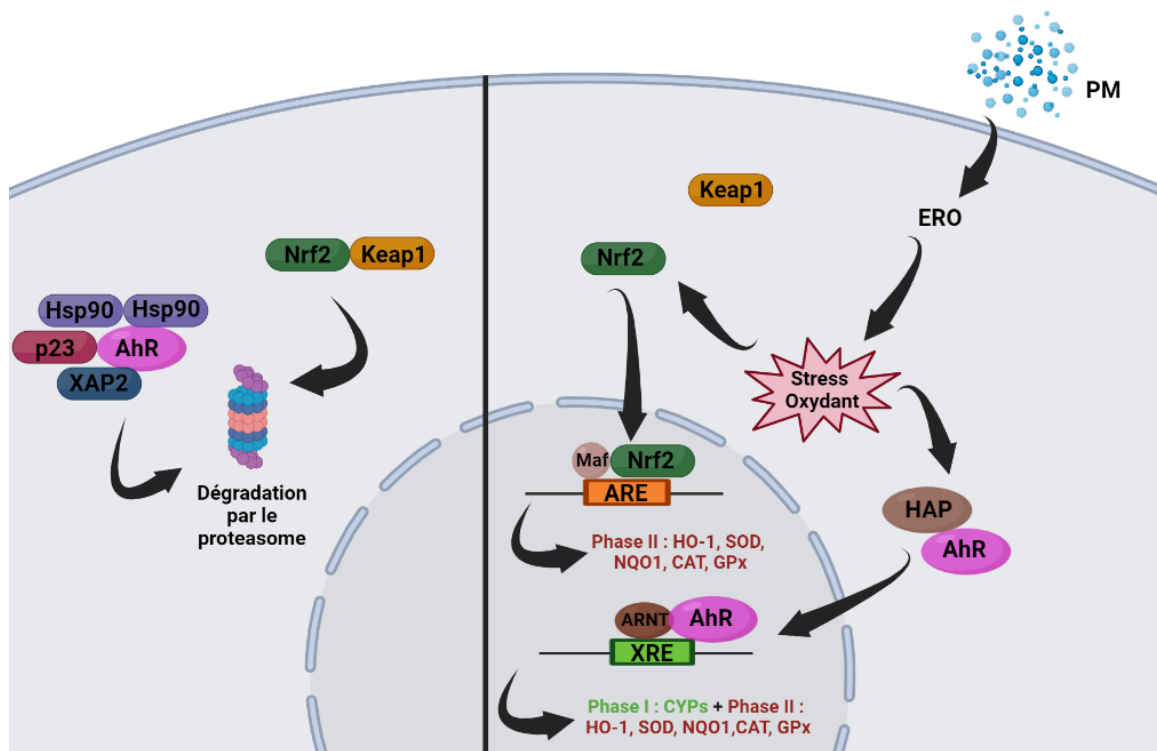


Figure 20 : Voies de signalisation NRF2 et AhR, à l'état basal (à gauche) et en présence de PM (à droite). Cette figure a été créée à l'aide de Biorender.com

Tableau 16 : Résumé des études citées analysant l'induction d'un stress oxydant par les PUF

CONDITIONS D'EXPOSITION		MODELE	EFFETS OBSERVES	REFERENCE
<i>In vitro</i>	Nanoparticules de carbone 5 ou 40 µg/cm ³ pendant 48h	Cellules épithéliales alvéolaires de rats RLE-6TN et macrophages alvéolaires de rat NR8383	<ul style="list-style-type: none"> • ↑ Translocation nucléaire du facteur de transcription NRF2 • Dommages à l'ADN 	(159)
	PUF issues du trafic routier 0-300 µg/mL pendant 24h	Cellules épithéliales pulmonaires humaines Calu-3	<ul style="list-style-type: none"> • ↑ Production d'ERO 	(170)
	Nanoparticules de carbone 50, 100, 200 µg/mL pendant 48h	Cellules épithéliales bronchiques humaines 16HBE	<ul style="list-style-type: none"> • ↑ Activité enzymatique de SOD et CAT • ↓ ERO en présence d'antioxydants 	(171)
	Nanoparticules de carbone 0, 5, 10, 20 et 40 µg/mL pendant 1, 4, 6 ou 24h	Cellules neuronales SH-SY5Y	<ul style="list-style-type: none"> • ↑ Production d'ERO 	(172)
	PUF riches en composés organiques 1,8 µg/cm ³ pendant 24h	Cellules épithéliales bronchiques humaines (BEAS-2B)	<ul style="list-style-type: none"> • ↑ Expression génique <i>Nrf2</i>, <i>NQO1</i>, <i>HO-1</i>, <i>CuZnSOD</i>, <i>MnSOD</i>, <i>CAT</i>, <i>CYP1A1</i> et <i>CYP1B1</i> 	(166)
<i>In vivo</i>	Administration unique de DEP 100 µg/50 µL par instillation intratrachéale	Souris C57BL/6	<ul style="list-style-type: none"> • ↑ Production d'ERO • ↑ Activité enzymatique de SOD, CAT, GSH-Px, HO-1, NQO1, GCLC, GCLM • Altérations histologiques pulmonaires 	(165)
	Aérosols de PUF de flamme pré-mélangées 22.4 ± 5.6 µg/m ³ Corps entier	Rats Sprague Dawley	<ul style="list-style-type: none"> • ↑ Production d'ERO • ↑ Activité enzymatique de HO-1 et SOD1 	(167)
	Nanoparticules de carbone 15 ou 30 µg/m ³ , 6h/j pendant 28 j par instillation intranasale	Souris C57BL/6	<ul style="list-style-type: none"> • ↑ Activité enzymatique de SOD et CAT • ↓ ERO en présence d'antioxydants 	(171)
Epidémiologie	PUF issues du trafic routier	Jeunes adultes sains	<ul style="list-style-type: none"> • ↑ Marqueurs du stress oxydant dans le condensat d'air exhalé 	(82)
	PUF issues du trafic routier	Patients BPCO	<ul style="list-style-type: none"> • ↑ Marqueurs du stress oxydant dans le condensat d'air exhalé 	(84)

2. Inflammation

L'accumulation des ERO, qu'elles soient d'origine exogène dans le cas où il s'agit des molécules adsorbées par les PM et/ou constitutrices de leur « cœur » (*e.g.*, métaux, HAP...), ou d'origine endogène si générées dans l'organisme par l'intermédiaire de diverses réactions cellulaires catalysées par les PM, peut donner lieu à une réponse inflammatoire locale au niveau des voies respiratoires, voire systémique.

A. Généralités

La réaction inflammatoire est une réponse immunitaire innée, non-spécifique, immédiate et temporaire de l'organisme à toute agression altérant l'intégrité de l'organisme et dont l'objectif est la reconnaissance et l'élimination de tout élément pouvant déséquilibrer l'homéostasie tissulaire ainsi que le déclenchement des processus de réparation et restauration tissulaires. Il s'agit donc d'un mécanisme de défense et de protection vis-à-vis des perturbations d'origine physique, microbienne, traumatique, environnementale ou chimique. Ce signal de danger est détecté par les cellules sentinelles résidentes (*i.e.*, macrophages, mastocytes, cellules dendritiques) par l'intermédiaire de récepteurs membranaires, induisant la sécrétion de médiateurs chimiques (*i.e.*, histamine, prostaglandines, cytokines) qui facilitent la migration des cellules immunitaires (*i.e.*, granulocytes et monocytes) de la circulation sanguine vers le tissu lésé et l'élimination du corps étranger par phagocytose (173) (figure 21).

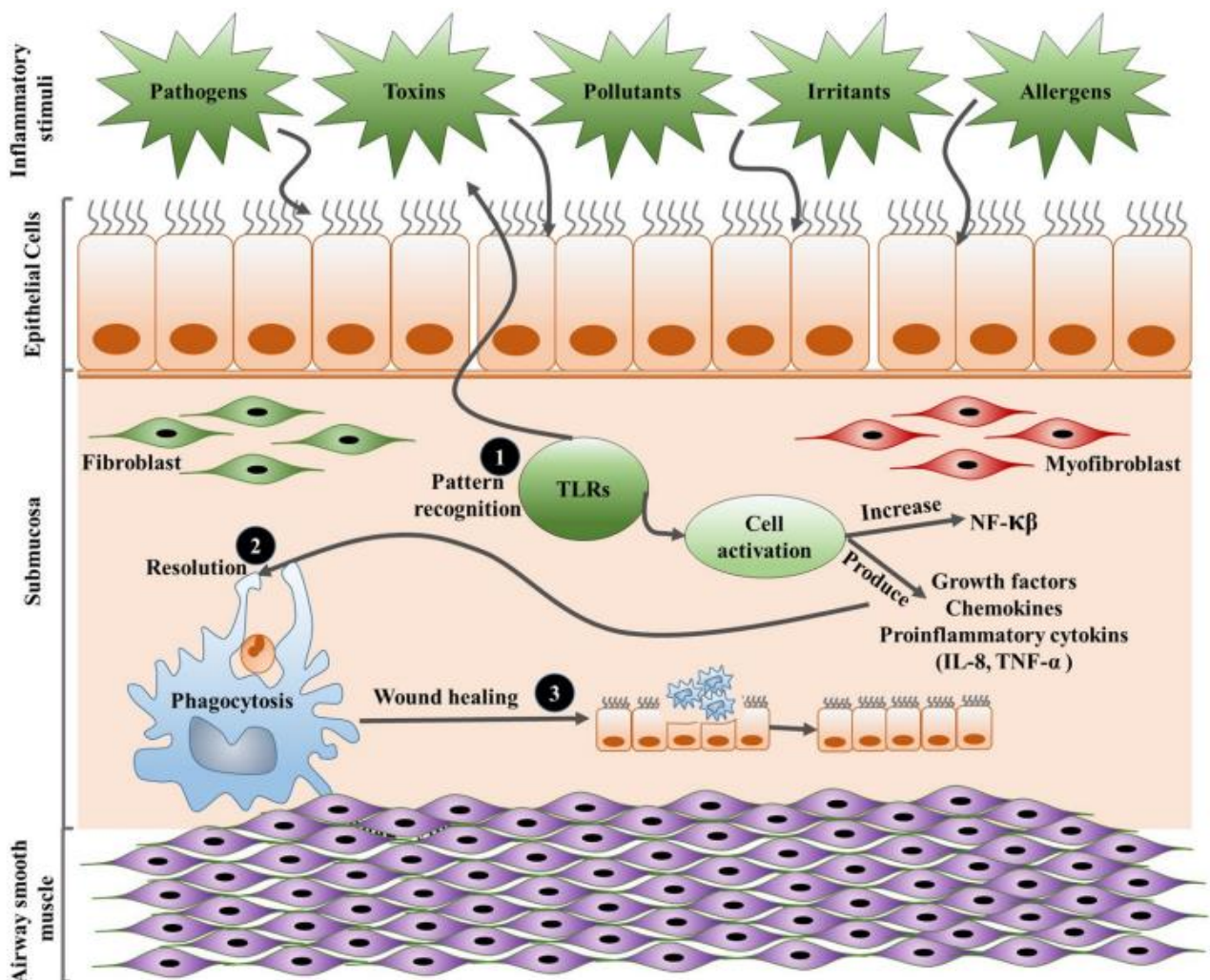


Figure 21 : Réponse inflammatoire au sein des voies respiratoires, d'après Aghasafari - 2019 (173).

Parmi ces cellules sentinelles résidentes sont retrouvés les macrophages qui constituent la première ligne de défense face aux xénobiotiques. De par la présence de nombreux récepteurs à leur surface, tel que le récepteur CR3, les macrophages sont capables de reconnaître et d'éliminer les corps étrangers par phagocytose. À cela s'ajoute leur capacité à présenter les antigènes issus de la dégradation de ces corps étrangers aux lymphocytes T, supports de l'immunité adaptative. Les macrophages jouent donc un rôle essentiel dans la coordination entre l'immunité innée et l'immunité adaptative. Ces derniers nécessitent néanmoins d'être activés par contact avec différents signaux qui orienteront leur polarisation. Ainsi, leur contact avec deux signaux successifs de type cytokine de type 1 et produits microbiens induira une polarisation macrophagique de type 1 inflammatoire et microbicide, leur permettant de produire des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6, l'IL-12 et le TNF- α (174). À l'inverse, les voies alternatives telles que celle de l'IL-4 les orienteront vers une polarisation macrophagique de type 2 cicatrisante et atténuant l'inflammation (175). Cet état de polarisation n'est cependant pas figé dans le temps mais bien variable en fonction de l'environnement proche des macrophages, leur conférant la capacité d'effectuer un switch phénotypique. Typiquement, en cas d'infection, les macrophages sont d'abord polarisés vers le phénotype M1 pro-inflammatoire pour aider l'hôte à lutter contre les pathogènes, avant d'évoluer vers un phénotype M2 afin d'induire une réponse anti-inflammatoire et réparer les tissus endommagés. Durant cette polarisation, les macrophages vont exprimer des marqueurs spécifiques à leur surface dont le CD80, CD86 ou iNOS pour les macrophages M1 et CD163, le CD206 et Arginase-1 pour les macrophages M2 (176).

En parallèle, les cellules épithéliales constitutives du tissu pulmonaire interviennent aussi dans l'immunité innée. Cela se fait par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques « Pattern Recognition Receptor » (PRRs) qui permettent la lutte contre les agents extérieurs. Ces récepteurs, dont la famille la plus connue est celle des « Toll-Like Receptors » (TLRs), sont capables de reconnaître des motifs associés aux micro-organismes, « Pathogen Associated Molecular Patterns » (PAMPs), ainsi que des signaux endogènes dérivés de cellules endommagées, les « Damage Associated Molecular Patterns » (DAMPs) (177). La fraction biologique des particules (*i.e.*, bactéries, champignons, allergènes) joue donc un rôle non négligeable dans le déclenchement et l'entretien de cette réaction inflammatoire. En effet, lorsque les PRRs des cellules épithéliales pulmonaires reconnaissent des PAMPs ou DAMPs, cela induit la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (*e.g.*, TNF α , IL-1 β , IL-6), chemokines (*e.g.*, Monocyte Chemoattractant Protein 1 : MCP-1, IL-8, Regulated on Activation, Normal T cell Expressed and Secreted : RANTES) et de molécules aux propriétés anti-microbiennes telles que la lysozyme qui est capable d'attaquer le peptidoglycane des bactéries à Gram négatif, la lactoferrine qui peut chélater le fer indispensable à la multiplication des bactéries et les défensines α et β qui perméabilisent les membranes des agents infectieux (figure 22) (178–182). Ces cytokines induisent le recrutement, la prolifération et l'activation de cellules immunitaires qui vont-elles-mêmes sécréter des protéases responsables de la destruction de l'agent pathogène mais également d'effets délétères au niveau tissulaire. C'est pourquoi les cellules épithéliales et environnantes sécrètent également des cytokines anti-inflammatoires (*e.g.*, IL-10, Transforming Growth Factor : TGF- β) et des médiateurs prorésolutifs tels que les lipoxines, résolvines, protectines et marésines (182). Ces molécules induisent ainsi la phagocytose, la diminution du recrutement des cellules immunitaires et la régénération tissulaire. La réponse inflammatoire aiguë a une durée approximative de 48 heures. Cependant, en cas de dysfonctionnement de cette dernière et/ou de concentration en agents pathogènes trop importante, cela peut entraîner une inflammation chronique locale, pouvant potentiellement s'étendre au niveau systémique et entraîner le développement ou l'exacerbation de pathologies à composante inflammatoire.

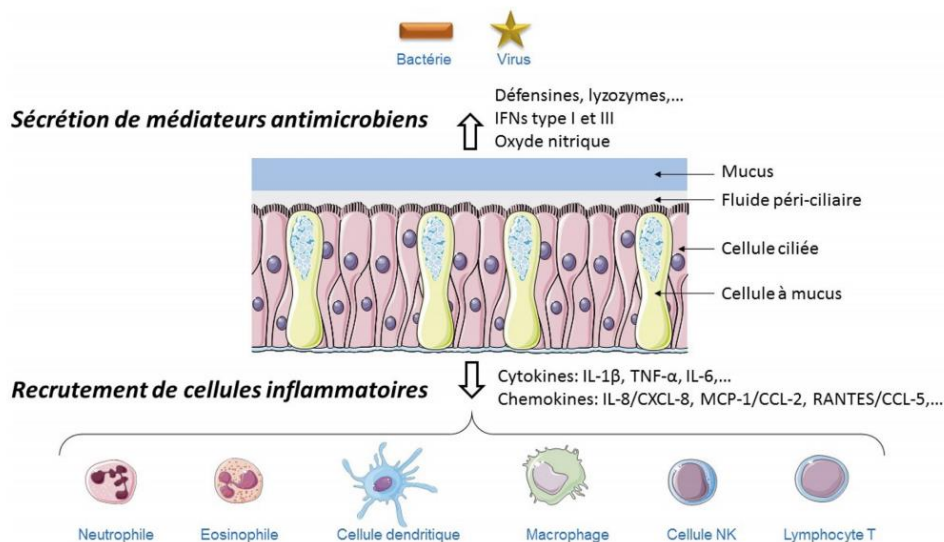


Figure 22 : Mécanismes de défense de l'épithélium respiratoire, d'après Jouan – 2016 (182).

La voie de signalisation NFκB joue un rôle prépondérant dans l'initiation et le maintien de ces réponses inflammatoire et immunitaire. Comme mentionné dans la partie IV.1.A, l'état d'oxydoréduction cellulaire conditionne son activation, notamment dans les cellules épithéliales et immunitaires. En l'absence de signaux spécifiques (*e.g.*, stress oxydant, protéines fongiques, bactériennes ou virales), le facteur de transcription NFκB est séquestré dans le cytoplasme sous forme inactive, par contact avec des membres de la famille IκB (*i.e.*, IκBα, IκBβ, IκBε et les précurseurs p105 et p100). À *contrario*, en cas de stress oxydant, ce dernier est activé, induisant une surexpression de gènes pro-inflammatoires. Cette activation fait suite à la phosphorylation des molécules inactivatrices par un complexe protéique composé de trois sous-unités IKKα, IKKβ et NEMO/IKKγ, qui induit la destruction de ces inactivateurs et à la libération du facteur de transcription NFκB qui pourra alors transloquer dans le noyau pour se fixer sur les séquences promotrices de ses gènes cibles (183,184). L'existence d'un cross-talk entre cette voie de signalisation et celle du facteur de transcription Nrf2 est aujourd'hui avérée (185,186) (figure 23). Cette interconnexion est au cœur de la régulation de l'homéostasie redox en réponse au stress et à l'inflammation. En effet, en présence de cytokines et d'oxydants environnementaux tels que les PUF, les inactivateurs du facteur de transcription NFκB sont phosphorylés et dégradés, permettant à ce dernier de se fixer à sa séquence consensus de l'ADN via sa sous-unité p65 et d'induire l'expression de gènes pro-inflammatoires aggravant le stress oxydant ambiant. Cette sous-unité p65 possède une propriété inhibitrice vis-à-vis de la protéine Keap1, permettant ainsi au facteur de transcription Nrf2 d'être libéré de son répresseur et de transloquer dans le noyau pour se fixer à sa séquence consensus de l'ADN, l'ARE. Cette fixation induit la transcription de gènes codant pour des enzymes antioxydantes, détoxifiantes et cytoprotectrices, réduisant le stress oxydant environnant. En parallèle, Keap1 qui est libéré dans le cytoplasme empêche la dégradation des molécules inactivatrices d'NFκB, ce qui conduit à une inhibition de sa voie de signalisation et à une diminution de l'inflammation (185).

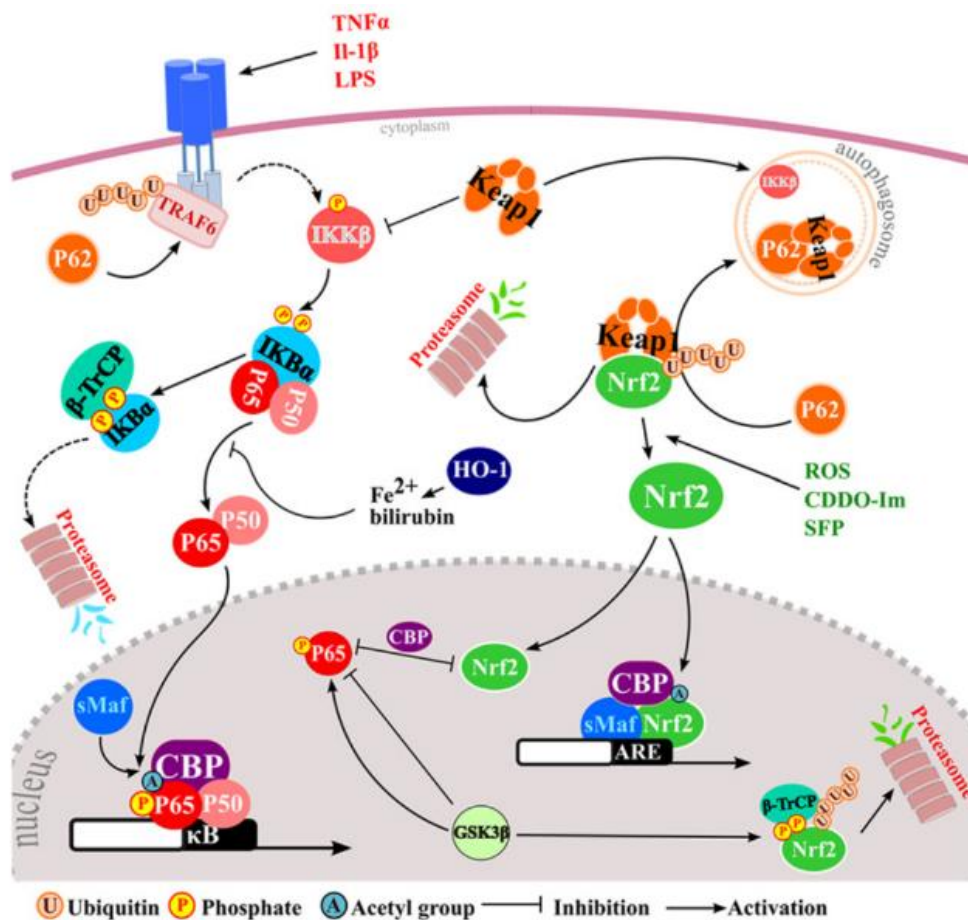


Figure 23 : Interconnexion des voies de signalisation NFκB et NRF2, d'après Wardyn - 2015 (185).

B. Induction de l'inflammation par les PM

De nombreuses études ont démontré la capacité des PM à induire une réponse inflammatoire indépendamment de leur Dae bien que la sévérité de celle-ci soit influencée par ce dernier. En effet, des études *in vitro* ont démontré que les PUF provoquaient une réponse inflammatoire plus importante que les PM ayant un diamètre plus important (101,187). À la suite d'une inhalation de PUF, une réaction inflammatoire pulmonaire locale, aiguë ou chronique, pouvait se produire. En effet, une exposition à court terme, même à de faibles doses de PUF, est capable d'induire le développement d'une inflammation aiguë caractérisée par un influx rapide de PNN, une augmentation de la sécrétion en cytokines pro-inflammatoires et l'activation de la voie de signalisation NFκB.

Une étude *in vitro*, réalisée sur des cellules épithéliales et macrophagiques alvéolaires de rat a, en effet, montré qu'une exposition de 48h à des nanoparticules de carbone induisait une importante sécrétion de TNF-α, MCP-1 et CXCL2 (159) (tableau 17). Une autre a, quant à elle, montré qu'une exposition à des PUF issues du trafic routier induisait une sécrétion accrue d'IL-6 et d'IL-8 chez des cellules épithéliales pulmonaires humaines (170). Bhargava et son équipe ont également montré qu'une exposition aiguë à des PUF induisait une augmentation de l'expression des sous-unités p65 et p105 et des cytokines IL-6 et TNF-α chez des lymphocytes humains (188). Des observations similaires ont été réalisées *in vivo* dans des études dans lesquelles des souris ont été exposé à des nanoparticules de carbone. En effet, des souris exposées à ces dernières pendant 6 à 7 jours ont montré un infiltrat de cellules inflammatoires (*i.e.*, macrophages, lymphocytes) associé à une sécrétion de TNF-α, d'IL-1β, d'IL-4 et de CCL2 (73,78). Une exposition corps entier réalisée pendant 24h chez des rats spontanément hypertendus a quant à elle montré le recrutement de

polynucléaires neutrophiles (PNN) couplé à une sécrétion d'IL-6 (74). Par ailleurs, une étude a montré qu'à la suite d'une exposition unique à des PUF spécifiques (DEP) combinées à un acarien, les souris présentaient une concentration accrue en IL-33, signal d'alarme des cellules épithéliales et endothéliales, au sein des tissus pulmonaires (189). Une autre étude dans laquelle des souris ont été exposées au même type de PUF pendant 7 jours a quant à elle montré le recrutement et l'accumulation de cellules immunitaires de type lymphocytes CD45+ et de macrophages CD68+ dans l'artère pulmonaire, associé à la sécrétion de TNF- α , d'IL-6 et d'IL-13 au sein des tissus pulmonaires (190). Par ailleurs, des études réalisées sur des souris sensibilisées à l'ovalbumine ont également montré le développement d'une inflammation péribronchique et périvasculaire médiée par la voie de signalisation NF κ B et caractérisée par une sécrétion accrue d'IL-4, d'IL-5 et d'IL-13 et de mucus (76,77).

Une exposition prolongée aux PUF peut, quant à elle, aboutir à une inflammation chronique susceptible d'induire le développement ou l'exacerbation de pathologies inflammatoires chroniques (*e.g.*, asthme, BPCO) ou du cancer. En effet, Chang et son équipe (2022) ont démontré que l'exposition chronique d'un modèle murin à des nanoparticules de carbone induisait un changement métabolique des macrophages impliquant l'axe HIF α qui favorise l'immunosuppression et, par conséquent, le développement du cancer du poumon (139). Une autre étude a démontré que l'exposition chronique de rats à des PUF manufacturées TiO₂ induisait une inflammation chronique persistante après l'arrêt des expositions (191). Par ailleurs, une étude réalisée sur des souris Balb/c au sein de notre laboratoire a démontré que l'exposition chronique à des PUF atmosphériques prélevées à Dunkerque induisait une réponse inflammatoire sévère caractérisée par un épaississement de la paroi alvéolaire, des infiltrations de macrophages et des lésions kystiques (192). Outre leur capacité à déclencher cette inflammation, les PUF peuvent altérer significativement des cellules inflammatoires et résidentes. À titre d'exemple, Lundbord et ses collaborateurs (2006) ont démontré que l'exposition de macrophages alvéolaires humains aux PUF altère leur capacité phagocytaire, pouvant accroître la sensibilité aux infections chez les personnes souffrant d'une maladie sous-jacente (193).

Malgré l'existence de ces moyens de lutte contre les xénobiotiques et notamment contre les PM, il arrive que des particules non phagocytées, notamment des PUF, ou certains de leurs composants persistent, se dissolvent dans le surfactant et transloquent dans la circulation systémique par passage à travers la barrière alvéolo-capillaire via des phénomènes de transcytose ou d'internalisation, les rendant susceptibles d'agir sur d'autres organes (194,195). De la même façon, les macrophages ayant phagocyté les PM ainsi que les médiateurs chimiques inflammatoires sécrétés au niveau alvéolaire, peuvent avoir des conséquences au niveau périphérique. À cela s'ajoute la capacité propre à chaque organe à sécréter ses propres médiateurs inflammatoires. Il a ainsi été démontré que les PUF pouvaient agir au niveau du système cardiovasculaire, du foie, des reins ou encore du cerveau. À titre d'exemple, plusieurs études épidémiologiques suggèrent une corrélation positive entre l'exposition à long terme aux PUF et une élévation de la concentration sanguine en CRP et IL-6, constituant un facteur de risque de maladies cardiovasculaires (103,104).

Tableau 17 : Résumé des études citées analysant l'induction d'une inflammation par les PUF

CONDITIONS D'EXPOSITION		MODELE	EFFETS OBSERVES	REFERENCE
<i>In vitro</i>	Nanoparticules de Carbone suie 2,5 mg/kg tous les 2 jours pendant 6 jours Instillations intratrachéales	Souris Balb/c	<ul style="list-style-type: none"> Infiltrations de cellules inflammatoires (macrophages) <ul style="list-style-type: none"> ↑ TNF-α 	(73)
	Nanoparticules de carbone 24h (172 $\mu\text{g}/\text{m}^3$) Corps-entier	Rats spontanément hypertendus	<ul style="list-style-type: none"> Neutrophilie <ul style="list-style-type: none"> ↑ IL-6 	(74)
	Nanoparticules de carbone 20 ou 50 μg quotidienne pendant 1 à 7 jours Instillations intratrachéales	Souris JF1/Msf	<ul style="list-style-type: none"> Recrutement de cellules inflammatoires (macrophages et lymphocytes) <ul style="list-style-type: none"> ↑ IL-1β, IL-4, CCL22, FVII, vWF 	(78)
	Nanoparticules de carbone 5 ou 40 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ pendant 48h	Cellules épithéliales alvéolaires de rats RLE-6TN et macrophages alvéolaires de rat NR8383	<ul style="list-style-type: none"> Sécrétion de cytokines pro-inflammatoires : ↑ TNF-α, MCP-1, CXCL2 	(159)
	PUF issues du trafic routier 0-300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pendant 24h	Cellules épithéliales pulmonaires humaines Calu-3	<ul style="list-style-type: none"> Sécrétion de cytokines pro-inflammatoires : ↑ IL-6, IL-8 	(170)
	PUF ambiantes 20 μg pendant 0 à 96h	Lymphocytes humains isolés de volontaires sains	<ul style="list-style-type: none"> ↑ NF-kB (p65) et (p105) <ul style="list-style-type: none"> ↑ IL-6 et TNF-α 	(188)

	Nanoparticules de carbone ou DEP pendant 20h	Macrophages alvéolaires humains de sujets jeunes, non-fumeurs	<ul style="list-style-type: none"> • Effet inhibiteur sur la phagocytose macrophagique : ↓ 30 % de l'attachement et ↓ 10 % de l'ingestion 	(193)
<i>In vivo</i>	PUF (< 100 nm, 526 µg/m ³ , 24 h) 24h avant la sensibilisation à l'ovalbumine	Souris Balb/c sensibilisées à l'ovalbumine	<ul style="list-style-type: none"> • Recrutement de cellules immunitaires <ul style="list-style-type: none"> • ↑ IL-4, IL-5, IL-13 • ↑ Production de mucus • Inflammation pérbronchique et périvasculaire (NFκB) <ul style="list-style-type: none"> • Hyperréactivité des voies respiratoires 	(76,77)
	Nanoparticules de carbone 20 mg/mL à 12 reprises pendant 1 mois par instillation intranasale	Souris Pts4 ^{d/d}	<ul style="list-style-type: none"> • Changement métabolique des macrophages via l'axe HIFα <ul style="list-style-type: none"> • Immunosuppression 	(139)
	Exposition unique de DEP combinées à un acarien par instillation intranasal	Souris C57BL/6	<ul style="list-style-type: none"> • ↑ IL-33 et ST2 • Hyperréactivité bronchique 	(189)
	DEP 350 µg/m ³ 5h/j pendant 7j	Souris CD-1	<ul style="list-style-type: none"> • Recrutement et accumulation de cellules immunitaires (lymphocytes CD45+, macrophages CD68+) <ul style="list-style-type: none"> • ↑ TNF-α, IL-6, IL-13 	(190)
	PUF urbaines 10 µg, 3x/semaine pendant 1 ou 3 mois Instillation intranasale	Souris Balb/c	<ul style="list-style-type: none"> • Infiltrats inflammatoires : PNN et macrophages <ul style="list-style-type: none"> • ↑ Expression génique : IL-6, IL-10 • Epaissement de la paroi alvéolaire et lésions kystiques 	(192)
<i>Epidémiologie</i>	PUF urbaines issues du trafic routier 28 jours	Adultes sains	<ul style="list-style-type: none"> • Inflammation systémique • Méthylation de l'<i>IFN-γ</i> 	(103)
	PUF ambiantes	Adultes âgés de 40 à 91 ans, vivant à proximité de l'autoroute et de zones urbaines	<ul style="list-style-type: none"> • Inflammation systémique : ↑ IL-6, CRP, TNF-RII 	(104)

3. Altérations mitochondriales

A côté de ces deux mécanismes centraux de toxicité des PUF que sont le stress oxydant et l'inflammation, quelques travaux ont suggéré que la mitochondrie pouvait être une cible spécifique des polluants atmosphériques et être à l'origine de diverses pathologies (196,197).

A. La chaîne respiratoire mitochondriale

La mitochondrie est un organite intracellulaire des organismes eucaryotes permettant la synthèse d'énergie sous forme d'ATP par l'intermédiaire de la phosphorylation oxydative. Cette dernière se déroule dans la chaîne respiratoire de la membrane interne mitochondriale (*i.e.*, système mitochondrial OXPHOS), qui correspond à une association de 5 complexes protéiques dans lesquels se font des transferts de protons et d'électrons issus de l'oxydation du Nicotinamide Adénine Dinucléotide (NADH) et de la Flavine Adénine Dinucléotide (FADH₂) provenant des voies métaboliques cellulaires (*i.e.*, cycle de Krebs, β -oxydation, glycolyse). Les électrons vont ainsi transiter successivement au niveau des 5 complexes (figure 24) :

- Le complexe I qui comprend la **NADH coenzyme Q réductase** ayant pour substrat le NADH, H⁺.
- Le complexe II qui comprend la **Succinate coenzyme Q réductase** ayant pour substrat le FADH₂.
- Le complexe III qui comprend une **coenzyme Q cytochrome C réductase**.
- Le complexe IV qui comprend une **cytochrome C oxydase**.
- Le complexe V qui comprend une **ATP synthase**.
- L'**ubiquinone** qui permet le transport des électrons entre les complexes I ou II et le complexe III.
- Le **cytochrome C** qui permet le transport des électrons entre les complexes III et IV.

Le transfert successif de ces électrons d'un complexe à un autre génère un différentiel de potentiel de -150 à -180 mV entre la matrice mitochondriale et l'espace intermembranaire, région délimitée par les membranes externe et interne. Cette différence de potentiel, dites « force proton-motrice, $\Delta\phi_m$ », fournit l'énergie nécessaire à la synthèse d'ATP à partir d'ADP et de phosphate. En réagissant avec l'oxygène, 2% des électrons sont capables de former des anions superoxydes qui, par la réaction de Haber-Weiss, se transformeront en peroxydes d'hydrogène, faisant de la mitochondrie le principal acteur de la production d'ERO endogènes. À de fortes concentrations, ces ERO pourront induire l'induction de la cascade pro-apoptotique et le relargage du cytochrome C par diminution du $\Delta\phi_m$ et ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondriale.

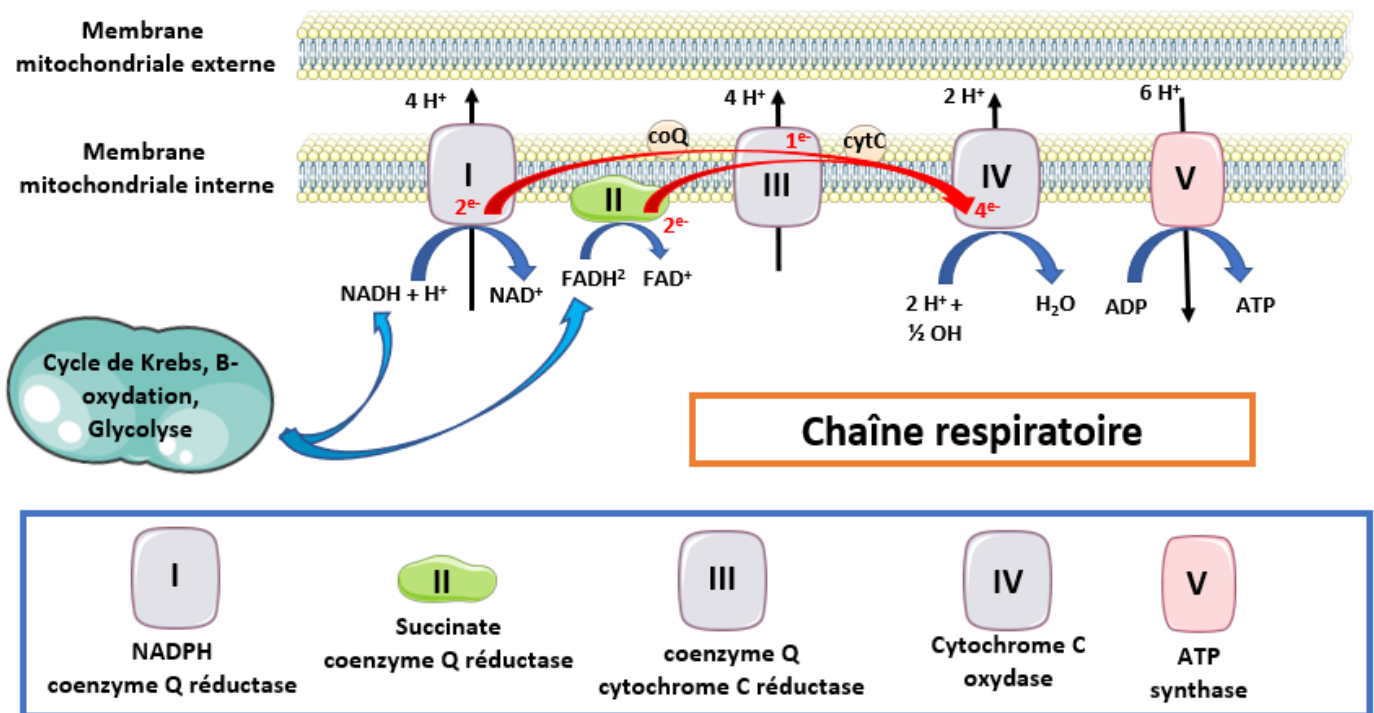


Figure 24 : La chaîne respiratoire mitochondriale.
 Cette figure a été créée à l'aide de Biorender.com

B. La dynamique mitochondriale

Organites dynamiques et mobiles, les mitochondries sont capables de se mouvoir vers les sites nécessitant spécifiquement de l'énergie. Cette capacité, appelée « **dynamique mitochondriale** », est indispensable au contrôle du métabolisme cellulaire et contribue à de nombreuses activités de la cellule telles que la mitose. Dans cette optique, les mitochondries forment un réseau en perpétuelle transformation, étroitement contrôlé et régulé par des phénomènes de **fusion** et de **fission** (198) (figure 25). La fusion est un processus par lequel deux mitochondries fusionnent pour former une seule mitochondrie plus grande. En période de déficit énergétique (*e.g.*, jeun alimentaire) ou de stress, la grande majorité des mitochondries de la cellule vont entrer en fusion pour former un réseau filamenteux et interconnecté. La formation de ce dernier permet la production d'énergie sous forme d'ATP par induction de l'activité d'OXPHOS. En outre, la fusion permet un accroissement de la masse mitochondriale et un échange de matériels entre les mitochondries saines et les mitochondries endommagées afin de compenser les lacunes fonctionnelles. Ainsi, celle-ci débute par la fusion des membranes mitochondriales externes via des GTPases, les Mitofusines 1 et 2 (*i.e.*, MFN 1 et 2), tout de suite suivie de la fusion des membranes mitochondriales internes via une autre GTPase, l'Optic Atrophy 1 (*i.e.*, OPA1) (198,199). À l'inverse, les phénomènes de fission correspondent au fractionnement d'une mitochondrie mère en deux mitochondries filles. En période de richesse énergétique (*e.g.*, apports en nutriments), les mitochondries de la cellule vont entrer en fission pour former un réseau mitochondrial fragmenté et granulaire. La fission participe activement au contrôle qualité des mitochondries en éliminant par mitophagie celles qui sont endommagées. Ainsi, au niveau des interfaces mitochondries/réticulum endoplasmique, la fission débute par le recrutement et la fixation d'une GTPase, la DRP1 (*i.e.*, Dynamin-related protein 1), sur son récepteur FIS1 (*i.e.*, Mitochondrial Fission 1 protein), conduisant à la scission en deux mitochondries distinctes. L'équilibre fission/fusion est donc crucial au maintien d'un état d'équilibre énergétique optimal.

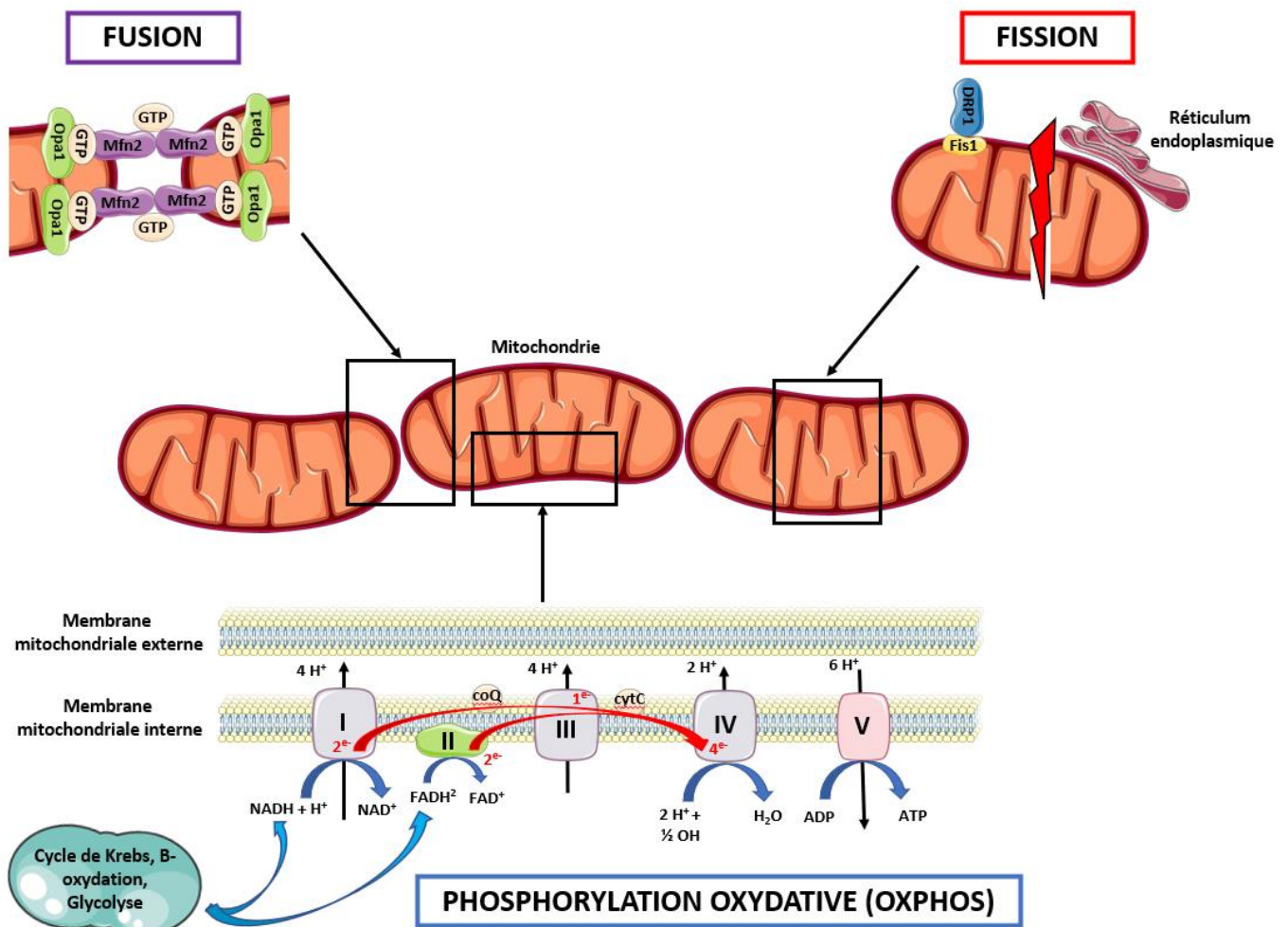


Figure 25 : La mitochondrie : Interactions, dynamique et production d'énergie.
 Cette figure a été créée à l'aide de Biorender.com

C. Induction d'altérations mitochondriales par les PM

De par son implication dans un grand nombre de processus biologiques (*e.g.*, homéostasie métabolique, stress oxydant, épigénétique), la mitochondrie constitue une cible privilégiée de certains xénobiotiques, y compris les PM (200) (figure 26). En effet, plusieurs études ont démontré que les particules les plus fines (*i.e.*, $PM_{2,5} > PM_{10}$) s'accumulent dans les mitochondries des cellules, entraînant leur altération d'un point de vue morphologique et fonctionnel (tableau 13) (74,201,201–206). Cette atteinte se caractérise par une perturbation de la phosphorylation oxydative (*i.e.*, diminution OXPHOS) induite par les composants organiques des PUF (*i.e.*, quinones, HAP) et par les modifications du nombre de copies de l'ADN mitochondrial (ADNmt), conduisant à une diminution de la production d'ATP couplée à une augmentation de la production d'ERO, initiatrice d'un stress oxydant ambiant (172,207–213).

Lorsque ce dernier devient trop important, une altération du potentiel de membrane mitochondriale associée à une ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondriale (mPTP) peut se produire, induisant la mort de la cellule par apoptose (111,172,202,207,211,211,213–215). En effet, l'ouverture de ce dernier permet le passage non sélectif de molécules de moins de 1,5 kDa à travers la membrane interne, ce qui entraîne une dépolarisation mitochondriale et le découplage de la phosphorylation oxydative. En outre, la redistribution des petits solutés à travers la membrane interne conduit à un gonflement de la mitochondrie. Ce dernier finit par induire une déformation voire une disparition des crêtes mitochondriales, associée à une

rupture de la membrane mitochondriale externe, conduisant au déversement de diverses protéines pro-apoptotiques telles que le cytochrome c, le SMAC ou l'AIF dans le cytosol, où elles activent un certain nombre de voies apoptotiques (214).

En plus de l'action directe des PUF sur le mPTP, l'ouverture et la fermeture de ce dernier peuvent également être médiées par les ERO qu'elles produisent. En effet, en induisant une élévation de la concentration en calcium intracellulaire dépassant les capacités de rétention calciques de la mitochondrie, ces derniers agissent sur la polarisation de la membrane mitochondriale, conduisant à une ouverture irréversible du mPTP (111,172,207,214). En outre, une dégradation de l'ADNmt par cassures de brin et/ou méthylation est susceptible d'être observée (168,213,216). L'ADNmt est alors libéré dans le cytosol et reconnu comme un signal endogène DAMP, à l'origine d'une réaction inflammatoire contribuant elle-aussi à la mort cellulaire. En plus d'agir sur la morphologie et la fonctionnalité des mitochondries, les PUF sont capables d'altérer la dynamique mitochondriale en modifiant l'expression des gènes impliqués dans les processus de fusion et de fission (172,210,217–219). Bien que le poumon soit la cible privilégiée des PUF, tous les organes et toutes les cellules pourvues de mitochondries peuvent ainsi être touchés.

Des études expérimentales réalisées *in vitro* ont cherché à étudier ces altérations mitochondriales induites par les PUF, notamment au niveau pulmonaire (tableau 18). En effet, une étude menée sur des cellules épithéliales bronchiques humaines BEAS-2B exposées de manière aiguë aux PUF, a montré que l'internalisation des PUF au sein des mitochondries induisait leur altération d'un point de vue morphologique, caractérisée par une perturbation de l'architecture des crêtes mitochondriales, donnant un aspect vacuolaire aux mitochondries (201). Une autre étude menée sur le même type cellulaire a montré que des particules quasi-ultrafines induisaient une augmentation de la phosphorylation oxydative couplée à une augmentation de la masse mitochondriale, ainsi qu'une altération de la dynamique mitochondriale caractérisée par une augmentation de la fission (210). Des études complémentaires réalisées sur des cellules épithéliales alvéolaires humaines A549 ont quant à elle démontré que les DEP et les nanoparticules de silice induisaient respectivement des altérations morphologiques (*i.e.*, gonflement mitochondrial, disparition des crêtes mitochondriales) et l'apoptose cellulaire via la voie mitochondriale (215,220). Par ailleurs, l'internalisation de PUF issues du trafic des métros a été démontrée au sein de cellules épithéliales bronchiques primaires issues de patients asthmatiques sévères (206). Enfin, une étude réalisée sur des fibroblastes pulmonaires isolés à partir de souris C57BL/6 a montré qu'une exposition aiguë aux nanoparticules de carbone induisait la production d'ERO, conduisant à une dépolarisation de la membrane mitochondriale et à une diminution de la production d'ATP, puis à terme, à l'apoptose cellulaire (211). Des observations similaires associées à une activité mitophagique accrue ont été faites sur des cellules neuronales SH-SY5Y ainsi que sur des macrophages murins RAW264.7 et des lymphocytes humains (172,207,208,213).

Ces effets délétères ont été confortés dans des études expérimentales menées *in vivo* (tableau 18). Une étude a ainsi démontré qu'une exposition unique à des PUF induisait une diminution de la concentration intracellulaire en calcium dans les cardiomyocytes de rats Sprague-Dawley, conduisant à la mort cellulaire (111). Des observations similaires, couplées à l'apparition d'altérations morphologiques mitochondriales ont été réalisées dans les cardiomyocytes de rats Wistar à la suite d'une exposition subaiguë à des nanoparticules de silice (202). De la même manière, des rats Fisher exposés à plus long terme à des PUF ont montré une altération de l'activité des mitochondries au sein des cellules neuronales (221). Des altérations morphologiques couplées à une augmentation de la fusion mitochondriale ont également été faites chez des chiens (219). Enfin, une étude cherchant à étudier l'impact d'une co-exposition nanoparticules de carbone/O₃ a montré qu'à la suite d'une exposition unique ou répétée, des altérations transcriptomiques de gènes impliqués

dans la chaîne respiratoire mitochondriale (212). Ces dérégulations étaient associées à une diminution de l'activité des complexes I, IV et V, conduisant à une diminution de la production d'ATP.

Bien qu'il soit plus difficile d'étudier ces altérations mitochondriales chez l'Homme, quelques études ont réussi à analyser certains de ces paramètres en réalisant des autopsies (tableau 18). Deux études ont démontré que chez des enfants et jeunes adultes, les PUF riches en fer étaient retrouvées dans les mitochondries cardiaques et cérébrales, induisant des déformations morphologiques de ces dernières (*i.e.*, rupture de membrane, crêtes mitochondriales absentes et/ou lésées) (203,205). Des observations similaires ont été faites dans les cardiomyocytes ventriculaires issus de patients sains ou en déclin cognitifs décédés de manière subite (204).

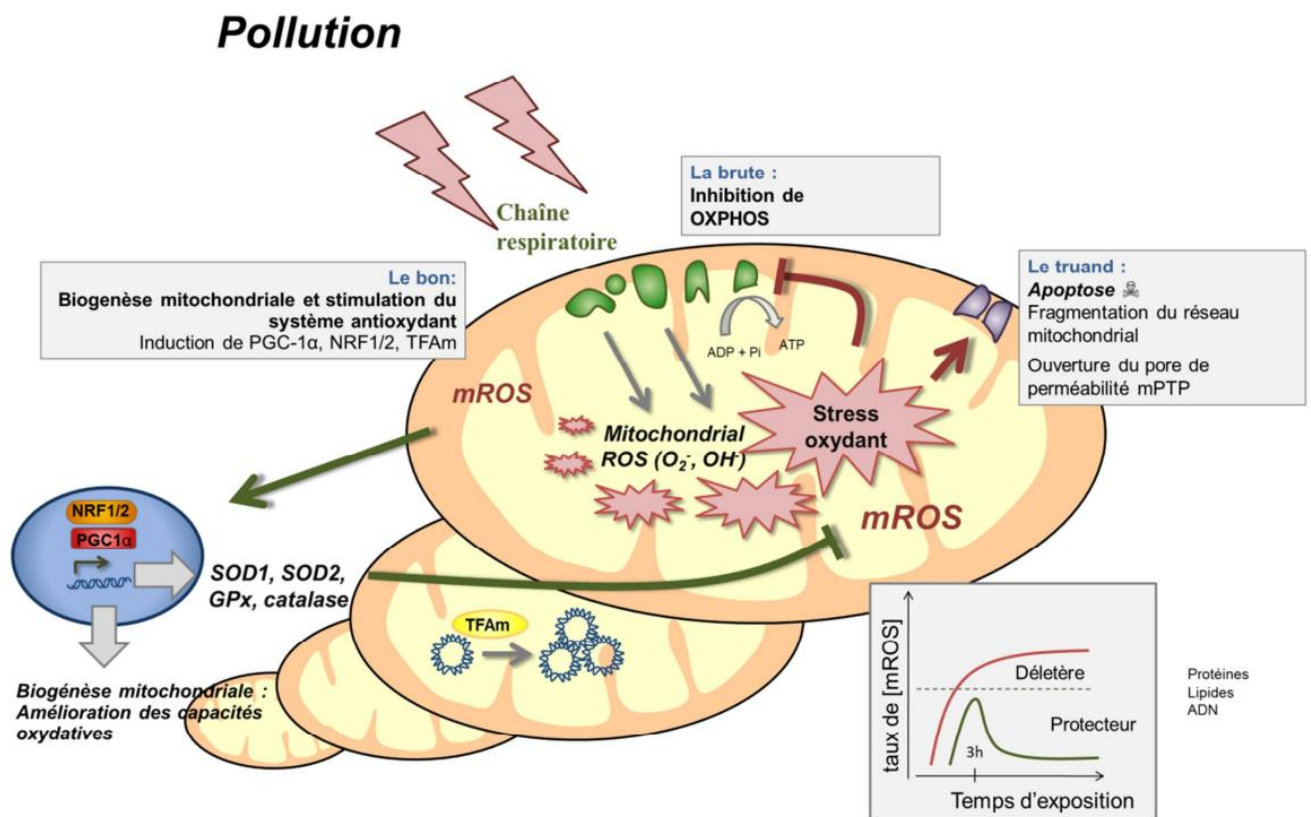


Figure 26 : Interactions entre la pollution, le stress oxydant et les mitochondries, d'après Geny - 2019 (200).

Tableau 18 : Résumé des études citées analysant l'induction d'altérations mitochondriales par les PUF

CONDITIONS D'EXPOSITION	MODELE	EFFETS OBSERVES	REFERENCE	
<i>In vitro</i>	Nanoparticules de carbone 0, 5, 10, 20 et 40 µg/mL pendant 1, 4, 6 ou 24h	Cellules neuronales SH-SY5Y	<ul style="list-style-type: none"> • ↑ Production d'ERO → ↓ Δφ_m → ↑ [Ca²⁺] et Caspase 3 → ↑ Apoptose • ↑ MFN2/DRP1 → ↓ Nombre de mitochondries → ↓ ATP → Dysfonction mitochondriale • ↑ PINK1/PARKIN → ↑ Nombre de mitolysosomes → Mitophagie 	(172)
	PUF et PM _{2,5} 8,4 µg/mL pendant 16h	Cellules épithéliales bronchiques humaines BEAS-2B et Macrophages murins RAW264.7	<ul style="list-style-type: none"> • Pénétration des PUF >>> PM_{2,5} dans mitochondries • Perturbation de l'architecture des crêtes mitochondriales → Aspect vacuolaire des cellules <ul style="list-style-type: none"> • Formation de corps myéliniques 	(201)
	Composés organiques aliphatiques, aromatiques et polaires issus de DEP, 25 µg/mL pendant 12h	Monocytes-Macrophages murins RAW264.7	<ul style="list-style-type: none"> • ↓ Δφ_m, Perte de la masse membranaire mitochondriale, Induction de l'apoptose <ul style="list-style-type: none"> • ↑ Ouverture du mPTP • ↑ Rétention calcique mitochondriale • Gonflement des mitochondries 	(207)
	Nanoparticules de silice 16,6 µg/cm ² pendant 1, 2 et 4h	Monocytes-Macrophages murins RAW264.7	<ul style="list-style-type: none"> • ↑ Production d'ERO mitochondriales 	(208)
	10 µg/mL de nanoparticules de silice associée ou non à 100 µM d'acétate de plomb pendant 24h	Cellules épithéliales alvéolaires humaines A549	<ul style="list-style-type: none"> • Nanoparticules de silice renforcent l'apoptose induite par le plomb via la voie mitochondriale 	(215)
	Nanoparticules de carbone associées ou non à du plomb 0, 5, 10, 15, 20 µg/mL pendant 24h	Fibroblastes pulmonaires issus de souris C57BL/6	<ul style="list-style-type: none"> • ↑ Production ERO → ↓ Δφ_m → ↑ Apoptose • Déséquilibre entre la synthèse et l'hydrolyse de l'ATP 	(211)
	DEP 0,1 mg/mL pendant 24, 48 ou 72h	Cellules épithéliales alvéolaires humaines A549	<ul style="list-style-type: none"> • Gonflement des mitochondries • Crêtes mitochondriales absentes 	(220)
	PM _{0,18} Exposition unique : 5 µg/cm ² Expositions répétées (x3) : 15	Cellules épithéliales bronchiques humaines (BEAS-2B)	<ul style="list-style-type: none"> • ↑ Phosphorylation oxydative <ul style="list-style-type: none"> • ↑ Masse mitochondriale • ↑ Production de l'anion superoxyde mitochondrial 	(210)

	µg/cm ² pendant 24h		<ul style="list-style-type: none"> Altérations de la dynamique mitochondriale : ↑ Fission 	
	PUF du métro 1,1-11,1 µg/cm ² pendant 24h	Cellules épithéliales bronchiques primaires issues de patients asthmatiques sévères	<ul style="list-style-type: none"> PUF internalisées dans mitochondries 	(206)
	20 µg de PUF ambiantes pendant 0, 30 min, 1h, 3h, 6h	Jeunes adultes sains → Prélèvement de lymphocytes sanguins	<ul style="list-style-type: none"> ↓ Δφ_m Altérations de la respiration mitochondriale ↓ ADNmt 	(213)
<i>In vivo</i>	Exposition unique de 100 µg de PUF ambiantes par aspiration oropharyngée	Rats Sprague-Dawley	<ul style="list-style-type: none"> Rôle du pore de transition de perméabilité mitochondriale (mPTP) dans la toxicité cardiovasculaire associée aux PUF ↓ [Ca²⁺] avant l'ouverture du mPTP et le déclenchement de la mort cellulaire 	(111)
	2, 5 et 10 mg/kg/j de nanoparticules de silice pendant 16j Instillation intratrachéale	Rats Wistar	<ul style="list-style-type: none"> PUF présentes dans cardiomyocytes Apoptose via la voie mitochondriale Altérations morphologiques mitochondriales : Membrane mitochondriale gonflée et pycnotique, Mitochondries vacuolisées, Crêtes mitochondriales absentes ou lésées 	(202)
	PM ₁₀ , PM _{2,5} et PUF 0, 100, 200, 300, 400, 500, 600 ng/ml pendant 5h, 5j/semaine pendant 1, 3, 10 mois	Rats Fisher	<ul style="list-style-type: none"> Altérations de l'activité des mitochondries, quelle que soit la taille des particules et la durée de l'exposition dans cellules neuronales 	(221)
	PUF ambiantes Exposition naturelle depuis la naissance	Chiens (Beagle)	<ul style="list-style-type: none"> Altérations morphologiques mitochondriales : Crêtes mitochondriales absentes ou déformées sur lesquelles les PUF sont fixées ↑ Fusion avec formation de mégamitochondries 	(219)
	Co-exposition : Nanoparticules de carbone + Ozone Exposition unique ou 4 expositions de 10 mg/m ³ pendant 3h en corps entier	Souris C57BL/6	<ul style="list-style-type: none"> Altérations transcriptomiques de gènes impliqués dans la chaîne mitochondriale de transport des électrons ↓ Activité des complexes I et IV, et de l'ATP synthase <ul style="list-style-type: none"> ↓ Production ATP 	(212)

<i>Epidémiologie</i>	PUF riches en Fer	Enfants et jeunes adultes	<ul style="list-style-type: none"> Présence des PUF dans les mitochondries myocardiques anormales présentant des altérations morphologiques : crêtes déformées ou absentes, membranes rompues, mitochondries déformées/lésées 	(203)
	PUF ambiantes	Patients sains ou avec déclin cognitif décédés subitement et vivant dans une grande ville polluée	<ul style="list-style-type: none"> Présence de nanoparticules dérivées de la combustion/frottements dans les cardiomyocytes ventriculaires Altérations mitochondriales : crêtes fragmentées ou absentes 	(204)
	PUF riches en Fer issues de la combustion	Enfants et Jeunes adultes citadins	<ul style="list-style-type: none"> Présence de PUF dans les mitochondries des neurones frontaux, les cellules gliales et endothéliales Altérations morphologiques mitochondriales 	(205)

4. Mort cellulaire

Quelles que soient les étapes de la vie d'un organisme, la stabilité de la balance prolifération/mort cellulaire est essentielle au maintien de l'homéostasie tissulaire afin de maintenir un nombre de cellules constant. Ces processus de survie et d'élimination cellulaire dépendent de la capacité des cellules à répondre de manière adaptée aux signaux issus du milieu environnant. Ainsi, lors des différentes phases du développement embryonnaire, les cellules et composants biologiques présents en excès sont éliminés et/ou recyclés. À titre d'exemples, la mort cellulaire intervient lors de la phase d'individualisation des doigts et de l'ablation des ébauches des gonades mâles et femelles. En parallèle, la perception de signaux de stress permet la destruction des cellules cancéreuses et/ou lésées tout au long de la vie ainsi que la défense de l'organisme en cas d'infection. Un déséquilibre entre la survie d'une part, et la mort cellulaire d'autre part, peut ainsi engendrer l'apparition de pathologies diverses dont le cancer. C'est pourquoi il est nécessaire que ces processus soient finement régulés au niveau moléculaire. Les découvertes scientifiques récentes ont permis de mettre en lumière l'existence de plusieurs mécanismes de mort cellulaire qu'il est possible de distinguer en fonction de leurs conditions de survenue et de leurs critères morphologiques et biochimiques caractéristiques (tableau 19).

A. Apoptose

Décrite pour la première fois en 1972 par Kerr et al, l'apoptose ou mort cellulaire de type 1, est le processus de mort cellulaire le plus étudié et le plus documenté à ce jour (222). Il s'agit d'un type de mort cellulaire programmée physiologique participant au développement des organismes pluricellulaires et au maintien d'un état d'homéostasie tissulaire, par élimination sélective des cellules dangereuses et/ou devenues inutiles (223). Ainsi, il a été estimé que dans le corps humain, près de dix milliards de cellules subissent ce phénomène d'apoptose chaque jour (224). Une perturbation de ce processus peut par conséquent être à l'origine de pathologies variées, par inhibition (*e.g.*, cancers, syndromes lymphoprolifératifs, infections virales) ou excès (*e.g.*, pathologies neurodégénératives, maladies auto-immunes, lésions ischémiques) (225).

Le travail mené par Horvitz et al en 1993 chez le nématode *Caenorhabditis elegans* a permis de mettre en évidence l'existence du gène pro-apoptotique *Ced-3*, présentant une grande homologie avec des protéases à cystéines indispensables à l'étape d'exécution de l'apoptose chez les mammifères, les caspases (226). D'abord sous forme de précurseurs inactifs, ou zymogènes, ces enzymes nécessitent une étape d'activation par dissociation et libération du pro-domaine à l'extrémité N-ter. Ces enzymes apoptotiques se distinguent de par leur mode d'activation et de par leur fonction, permettant de les répartir en deux classes principales :

- Les caspases **initiatrices**, représentées par les caspases -2, -8, -9 et -10, sont activées par dimérisation ou trimérisation. Ces dernières sont responsables de l'amorçage de la cascade d'activation des caspases effectrices ou exécutrices, favorisant l'amplification du signal initial pro-apoptotique.
- Les caspases **effectrices** ou **exécutrices**, représentées par les caspases -3, -6 et -7, sont activées par une protéolyse partielle effectuée par les caspases initiatrices. Une fois enclenchées, ces enzymes vont stimuler des protéines impliquées dans les processus biochimiques et morphologiques associés à l'apoptose.

Deux voies d'activation de ces caspases sont impliquées dans la phase d'exécution du signal initial pro-apoptotique : la voie **intrinsèque** faisant intervenir les mitochondries et la voie **extrinsèque** faisant intervenir des récepteurs membranaires (227) (figure 27). La première est initiée de manière autonome par les cellules à la suite d'un stress intracellulaire (*e.g.*, dommages à l'ADN, radiations ionisantes, choc thermique), d'une déplétion en facteurs de croissance et/ou d'une stimulation de la division cellulaire de manière inadaptée

par des oncogènes. En réaction à des signaux de stress cellulaire, les mitochondries vont subir une perméabilisation de leurs membranes externes, entraînant la libération de protéines pro-apoptotiques SIMP (*i.e.*, « Soluble intermembrane mitochondrial proteins ») dont le cytochrome C et la protéine Smac/DIABLO capable d'inactiver l'activité des inhibiteurs de caspases (228,229). En interagissant avec Apaf-1 (*i.e.*, Apoptotic protease activating factor), le cytochrome c induit le recrutement de la pro-caspase 9 et la formation de l'apoptosome (230). Ce dernier va activer la caspase-9 qui va elle-même activer la caspase 3, aboutissant au clivage de protéines substrats et à l'apoptose. Dans le même temps, la mitochondrie libère la protéine AIF et l'endonucléase G afin de fragmenter l'ADN nucléaire. La deuxième voie, quant à elle, fait intervenir des « récepteurs de mort » de la superfamille des Tumor Necrosis Factor Receptor (TNFR) dont TNFR1, Fas et TRAIL-R sur lesquels peuvent spécifiquement se fixer les ligands TNF- α , Fas-L/CD95-L et TRAIL. Ces interactions induisent de manière directe ou indirecte, le recrutement de la protéine cytoplasmique FADD/MORT1 qui va recruter la pro-caspase-8 et FLIP, formant le complexe DISC (*i.e.*, Death Inducing Signal Complex). La formation de ce dernier induit la conversion de la pro-caspase-8 en caspase-8 active, qui va elle-même, activer les caspases effectrices de mort cellulaire 3, 6 et 7, et cliver la protéine Bid (BH3 Interacting Domain death agonist) en tBid, la rendant active (231). Cette dernière est capable d'induire la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale en interagissant avec des membres pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 (B-cell leukemia/lymphoma 2), Bax (Bcl-2-associated X protein) et Bak (Bcl-2 Antagonist Killer). Ainsi, la protéine Bid fait le lien entre les voies pro-apoptotiques intrinsèque et extrinsèque.

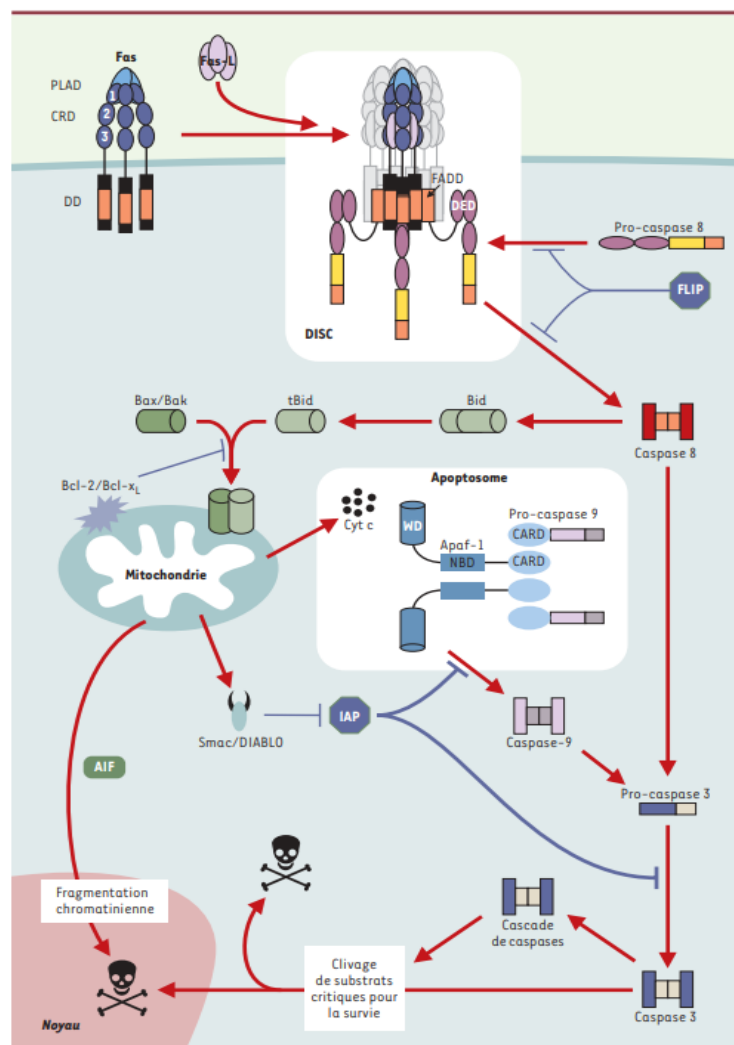


Figure 27 : Deux voies principales de déclenchement de l'apoptose, d'après Couzinet - 227 (227).

Bien que cet éventail de signaux soit varié, l'ensemble des cellules engagées dans le mécanisme apoptotique présentent des altérations morphologiques et biochimiques communes. Après s'être isolée des cellules voisines, la cellule en cours d'apoptose va voir sa chromatine se condenser, son ADN se fragmenter et son volume diminuer, aboutissant à un bourgeonnement de la membrane plasmique et à la formation de « corps apoptotiques » à partir de cette dernière. Ces vésicules, constituées des débris cellulaires, évitent le déversement du contenu cellulaire dans le milieu environnant et le déclenchement d'une réponse immunitaire. Afin que ces corps apoptotiques soient reconnus et éliminés, une extériorisation des phosphatidylsérines va se faire de la face interne vers la face externe de la membrane de ces vésicules, constituant un signal reconnu par les cellules phagocytaires environnantes (232) (figure 28).

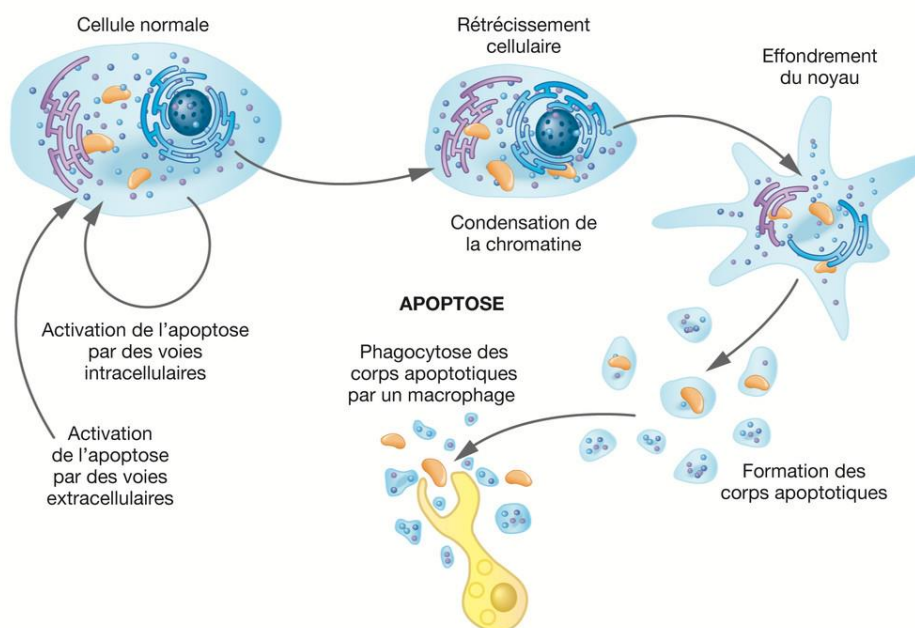


Figure 28 : Changements morphologiques lors de l'apoptose, d'après Campeau-Péloquin - 2017 (232).

B. Autophagie

L'autophagie ou mort cellulaire de type 2 est un mécanisme catabolique essentiel d'autodigestion lysosomale des composants internes de la cellule tels que des protéines ou des organites endommagés et/ou défectueux, survenant en conditions de stress (*e.g.*, privation nutritionnelle, excès d'ERO, infection, hypoxie). Les composants de la cellule recyclés de cette manière permettent ainsi la synthèse de nouvelles protéines et l'apport d'une source d'énergie nécessaire à la survie cellulaire (233). Une altération de ce processus autophagique de survie cellulaire est par ailleurs retrouvée dans de nombreuses maladies, menant à terme, à la mort de la cellule par apoptose (234).

Trois types d'autophagie sont à distinguer (figure 29) (235):

- La **macroautophagie**, le plus souvent retrouvée sous le terme d'autophagie, débute par la formation d'une double membrane isolante, le phagophore, qui va pouvoir englober une partie du cytosol et des organites, afin de former l'autophagosome. La fusion de ce dernier avec un lysosome permet la dégradation de son contenu par les enzymes lysosomales. L'ensemble de ce processus est régulé par les gènes *Atg* (*i.e.*, Autophagy Related Genes) et la protéine mTOR (*i.e.*, Mammamoa, Target of Rapamycin).

- La **microautophagie** va quant à elle cibler plus spécifiquement la dégradation d'un organe spécifique de la cellule. Ceci est particulièrement le cas de la mitochondrie qui est régulièrement sujette à des dommages et dysfonctionnement : on parle alors de mitophagie.
- L'**autophagie médiée par les protéines chaperonnes**, notamment HSPA8/HSC70 (*i.e.*, Heat Shock Protein), permet quant à elle d'adresser les protéines à dégrader directement aux lysosomes, sans intermédiaire vésiculaire.

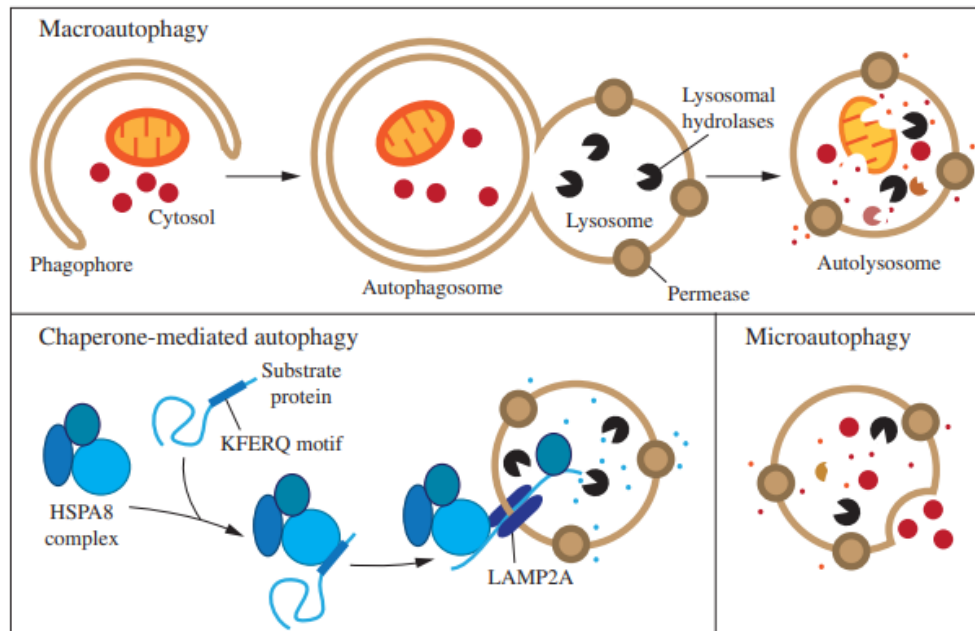
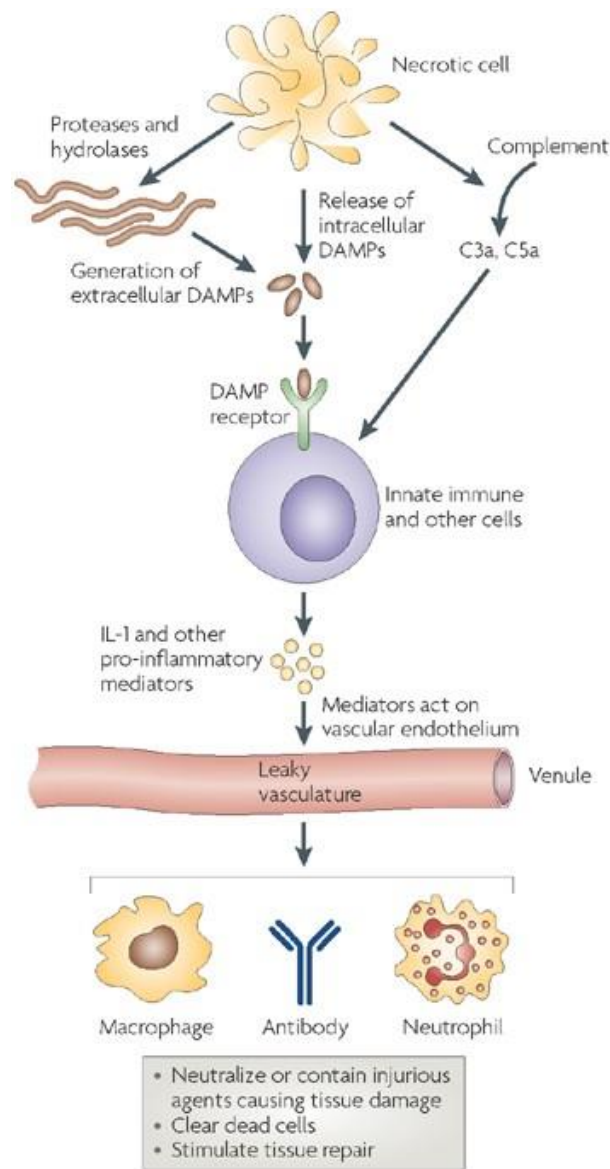


Figure 29 : Les trois profils autophagiques chez les organismes eucaryotes : macroautophagie, microautophagie et autophagie médiée par les protéines chaperonnes, d'après Parzych - 2014 (235).

C. Nécrose

La nécrose ou mort cellulaire de type 3 est souvent décrite, par opposition à l'apoptose, comme une voie de mort cellulaire non programmée survenant de manière incontrôlée, accidentelle et passive, ne nécessitant pas de signal inducteur. Cette dernière est le résultat d'un stress ou de dommages cellulaires ou tissulaires importants tels qu'un traumatisme physique (*e.g.*, brûlures, lésions traumatiques), une ischémie, une infection ou une exposition à des rayonnements ionisants (236). Contrairement à l'apoptose, la nécrose a pour caractéristiques d'induire une augmentation du volume cellulaire avec gonflement des organites et perte de l'imperméabilité de la membrane plasmique, conduisant au déversement du contenu cellulaire dans le milieu extracellulaire et à terme, au développement d'une réaction immunitaire inflammatoire. En effet, lors de ce processus, la cellule active la cascade du complément et libère des protéases, des hydrolases lysosomales et des DAMPs qui vont se fixer sur des récepteurs spécifiques situés à la surface des cellules immunitaires de l'immunité innée (*i.e.*, monocytes, macrophages, cellules dendritiques) et des cellules endothéliales, de type TLR et FMPR (*i.e.*, récepteurs des formyls peptides). La fixation de ces DAMPs à leur surface va induire leur activation et la production de cytokines pro-inflammatoires, notamment IL-1, IL-6, IL-8 et TNF- α , conduisant au développement d'une réaction inflammatoire (237) (figure 30).



Nature Reviews | Immunology

Figure 30 : Induction de la réponse inflammatoire lors de la nécrose, d'après Kono - 2008 (237).

Des études récentes ont par ailleurs démontré l'existence de voies de signalisation régulant l'initiation de processus de nécrose régulée et programmée en réponse à une large gamme de signaux (238). Parmi eux, la NETose, la parthanatose, la PANoptose, la pyroptose, la ferroptose ou encore celle qui est la plus documentée à ce jour, la nécroptose. Cette dernière a la particularité de faire intervenir les récepteurs de mort de la voie apoptotique, tout en gardant les changements morphologiques caractéristiques de la nécrose (239). La fixation de divers ligands dont TNF- α , TRAIL et FasL induit l'activation des kinases RIP1 et RIP3 (*i.e.*, Receptor Interacting Protein) et la formation du nécrosome. En interagissant avec la protéine MLKL (*i.e.*, Mixed Lineage Kinase domain-Like protein), RIP1 induit la formation de pores à la surface de la membrane plasmique et, par conséquent, à une déstabilisation de l'imperméabilité membranaire. En parallèle, RIP3 active des enzymes de la chaîne respiratoire mitochondriale, stimulant la synthèse d'ERO et la perméabilisation des membranes mitochondriales. Conjointement, l'action de ces kinases conduit à la mort de la cellule (240).

D. Ferroptose

La ferroptose est un type de mort cellulaire nécrotique fer-dépendante découverte beaucoup plus récemment puisque ce n'est qu'en 2012 que ce terme fut employé pour la première fois pour décrire la capacité de l'érastine à induire la mort chez des cellules cancéreuses porteuses de l'oncogène Ras activé (241). Cette molécule est capable d'inhiber le système Xc-, transporteur de cystéine, ce qui induit une déplétion en GSH et, par conséquent, une accumulation des radicaux libres et peroxydes lipidiques qui pourront agir sur l'intégrité membranaire par action sur les lipides membranaires. De la même manière, la ferroptose peut être induite par l'inhibition de l'enzyme GPX4 responsable de la réduction des hydroperoxydes lipidiques en présence de GSH (242) (figure 31). Le stress oxydant joue donc un rôle prépondérant dans l'initiation du processus ferroptotique. Ce dernier est étroitement lié à l'accumulation intracellulaire du fer libre puisque celui-ci permet la transformation des molécules oxydantes faiblement actives en des oxydants puissants qui pourront avoir des effets délétères sur les constituants cellulaires et notamment sur les lipides membranaires (243).

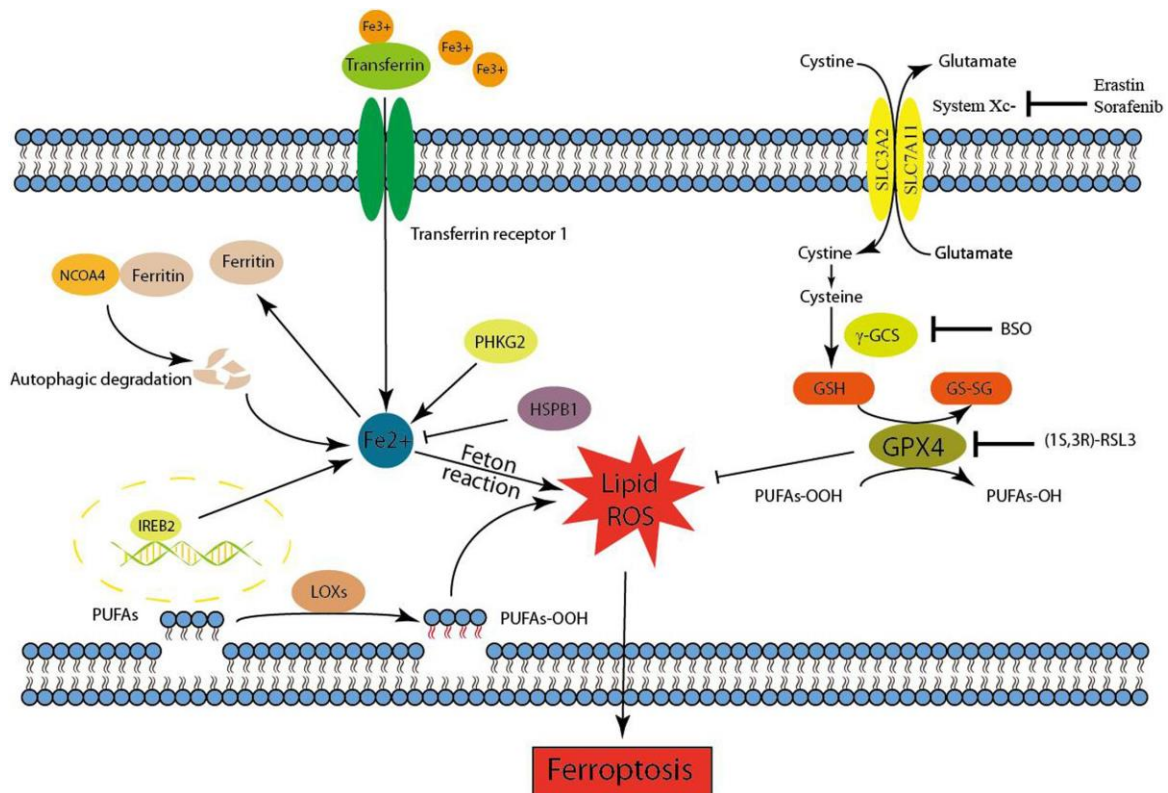


Figure 31 : Mécanisme de la mort cellulaire ferroptotique, d'après Lu - 2018 (242).

Tableau 19 : Comparaison des caractéristiques de l'apoptose, de l'autophagie, de la nécrose et de la ferroptose

	APOPTOSE	AUTOPHAGIE	NECROSE	FERROPTOSE
Réponse cellulaire	Programmée, hautement régulée	Programmée	Le plus souvent non programmée, accidentelle et incontrôlée	Programmée
Activateurs	Signaux intrinsèques (stress intracellulaire) ou extrinsèques (récepteurs de mort cellulaire)	Conditions de stress (<i>e.g.</i> , privation nutritionnelle, excès d'ERO, infection, hypoxie)	Stress cellulaire ou dommages tissulaires	Érastine, Sorafénib, Sulfasalazine, Altrétamine, Salinomycine...
Inflammation	Absente	Absente	Présente	Présente
Changements morphologiques	Diminution du volume cellulaire / Condensation de la chromatine / Fragmentation de l'ADN / Bourgeoisement de la membrane plasmique / Formation de corps apoptotiques	Formation d'un phagophore entraînant la vacuolisation du cytoplasme et des organites	Augmentation du volume cellulaire / Gonflement des organites / Augmentation de la perméabilité membranaire et altération de l'intégrité de la membrane plasmique / Déversement du contenu cellulaire dans le milieu environnant	Diminution du volume cellulaire / Mégamitochondries / Augmentation de la densité de la membrane mitochondriale externe / Accumulation de gouttelettes lipidiques
Caractéristiques biochimiques	Activation de la voie des caspases, fragmentation de l'ADN	Augmentation de l'activité lysosomale, dégradation enzymatique	Nécroptose : Formation du complexe RIP1/RIP3, activation de la protéine effectrice MLKL, formation du nécrosome	Accumulation de fer, peroxydation lipidique, inhibition du système X _c ⁻ , déplétion en GSH, inhibition de GPX4
Voies régulatrices	Caspases	Atg	Pas de régulateur spécifique pour la nécrose. Nécroptose : RIPK1, RIPK3, MLKL	Système X _c ⁻ GPX4
Rôle physiopathologique	Élimination des cellules endommagées durant le développement embryonnaire, maintien de l'homéostasie tissulaire	Recyclage de composants cellulaires endommagés, adaptation aux conditions de stress	Promotion de la réponse immunitaire inflammatoire	Réponse au stress oxydant et à la perturbation de l'homéostasie du fer

E. Induction de la mort cellulaire par les PM

À l'heure actuelle, de nombreuses études expérimentales ont démontré la capacité des particules, notamment fines, à induire une cytotoxicité, bien souvent grâce à l'utilisation de nanoparticules manufacturées (244–246). Les résultats de ces travaux tendent à affirmer que ce seraient les composés solubles hautement nocifs de ces PM et notamment les métaux, les HAP et les agents pathogènes, qui seraient responsables de cette cytotoxicité, à travers l'induction d'une réponse oxydante et inflammatoire. C'est d'ailleurs l'intensité cette dernière qui va orienter sélectivement la mort cellulaire vers un profil plutôt apoptotique, autophagique ou nécrotique (figure 32) (247,248). Ainsi, lorsque les ERO et dommages sont générés en quantité acceptable, les cellules entrent en apoptose afin de protéger les cellules avoisinantes de l'inflammation et éviter la prolifération des cellules endommagées. Cependant, lorsque ces derniers sont générés en quantité plus importante, ils vont inhiber les caspases apoptotiques pour orienter vers une mort cellulaire par autophagie en inhibant la protéine mTOR. Enfin, dans le cas d'une exposition aiguë à une concentration de PM élevée, les cytokines libérées et l'intensification du stress oxydant conduit à une quantité de dommages telle, que la dysfonction mitochondriale et l'altération des mécanismes cellulaires orientent vers une mort cellulaire par nécrose.

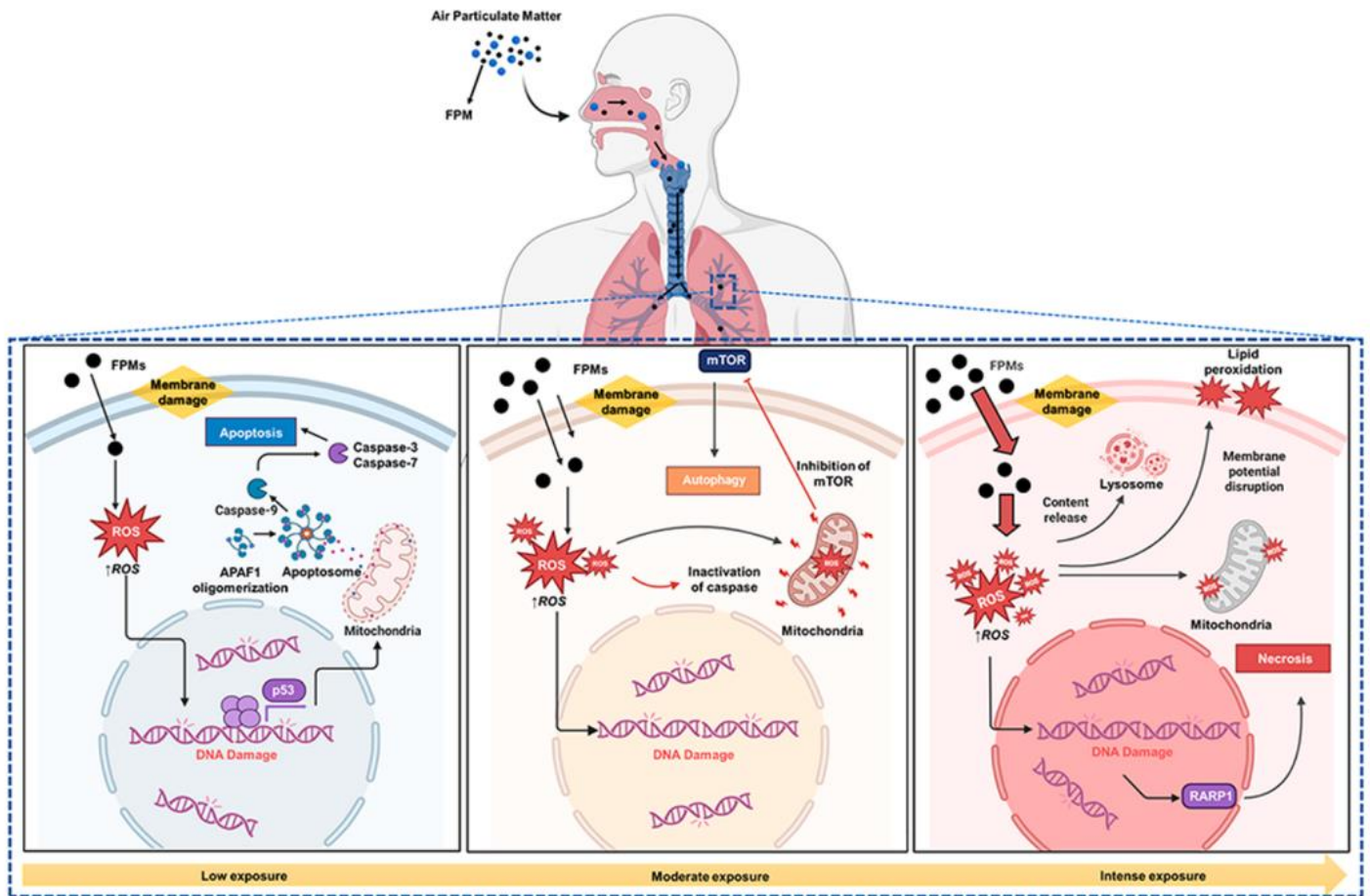


Figure 32 : Voies de mort cellulaire induites par la génération d'ERO lors d'une exposition aux PM, d'après Peixoto - 2017 (247).

Une importante diversité de voies de signalisation a pu être identifiée comme étant impliquées dans l'initiation de ces différents types de mort cellulaire induits par les PM, favorisant l'apparition et/ou l'exacerbation de pathologies notamment au niveau pulmonaire. La figure 33 et le tableau 20 résumant les voies identifiées à la suite d'une exposition aux PM_{2,5}, incluant par définition les PUF, permet de mettre en évidence le caractère ubiquitaire des mécanismes d'apoptose et d'autophagie induits par ces particules, de même que l'implication majeure des voies de signalisation liées à l'inflammation (249).

Dans un premier temps, concernant l'apoptose, une étude menée *in vitro* sur des cellules épithéliales alvéolaires humaines A549 a ainsi démontré que les PM_{2,5} pouvaient activer l'apoptose via la voie MAPK/NF-κB/STAT1 (250). Au niveau cardiaque, Yang et son équipe ont démontré que l'exposition aigue aux PM_{2,5} induisait l'apoptose dans les cardiomyocytes humains par hyperméthylation de l'ADRB2 et activation de la voie β2AR/PI3K/Akt (251) tandis que Yin et ses collaborateurs ont montré qu'elles pouvaient l'induire en activant l'axe inflammatoire COX-2/PGES/PGE2 dans des cellules endothéliales aortiques murines (251,252). Wang et son équipe ont par ailleurs découvert que l'exposition aux PM_{2,5} induisait de l'inflammation et du stress oxydant chez des rats hyperlipidémiques, induisant l'apoptose des cardiomyocytes par la voie JNK/p53 (253). Outre l'implication de ces voies inflammatoires, d'autres sont quant à elles plutôt associées au stress oxydant. En effet, au niveau pulmonaire, trois études ont démontrés que la production d'ERO par les PM_{2,5} entraînait des altérations mitochondriales, provoquant l'apoptose des cellules épithéliales pulmonaires humaines L132, 16HBE et A549 (254–256). Des observations similaires ont été faites au niveau cardiaque chez des cardiomyocytes humains et murins, de même que sur des cellules endothéliales humaines et des macrophages murins RAW264.7 (257–260). De la même manière, au niveau cérébral, les PM_{2,5} module l'expression des protéines apoptotiques Bax, Bcl2 et Caspase-3 (261). Outre ces voies, il a également été démontré, chez des cellules 16HBE, qu'une diminution de l'expression du miR-194-3p pouvait contribuer à la progression de l'apoptose en ciblant le gène DAPK1 (Death Associated Protein Kinase 1) (262).

Dans un second temps, concernant l'autophagie, il a été démontré sur des cellules épithéliales bronchiques humaines BEAS-2B que l'exposition aux PM_{2,5} pouvait induire la mort cellulaire par autophagie en activant la voie de signalisation NOS2 (263). Xu et ses collaborateurs (2016) ont constaté que celle-ci pouvait également être induite via l'axe ATR-CHEK1/CHK1 dans le même type cellulaire (264). Wang et son équipe (2015) ont par ailleurs, démontré que l'autophagie était dépendante de l'AMPK chez des cellules épithéliales alvéolaires humaines A549 (265). Deux autres études menées par Deng et ses collaborateurs (2013 et 2017) ont, quant à elles, montré que dans le même type cellulaire, l'autophagie pouvait être dépendante du stress oxydant (266,267). Cette contribution du stress oxydant dans l'initiation des processus autophagiques a également été constatée dans des cellules endothéliales humaines via l'axe AKT/mTOR (268). L'implication d'AKT a aussi été démontré chez des cellules endothéliales murines, via l'axe NFκB/p38 (269). Enfin, au niveau hépatique, l'autophagie peut être induite par la voie inflammatoire médiée MyD88 (270).

Ainsi, outre les voies médiées par le stress oxydant et les ERO, il semblerait que les voies β2AR/PI3K/Akt, caspase3/JNK/P53, COX-2/PGES/PGE2, ROS-JNK/ERK, MAPK/NF-κB/STAT1 soient celles qui sont le plus fréquemment impliquées dans le processus apoptotique tandis que les voies médiées par NOS2, AMPK et MyD88 seraient celles le plus souvent engagées dans le processus autophagique (249).

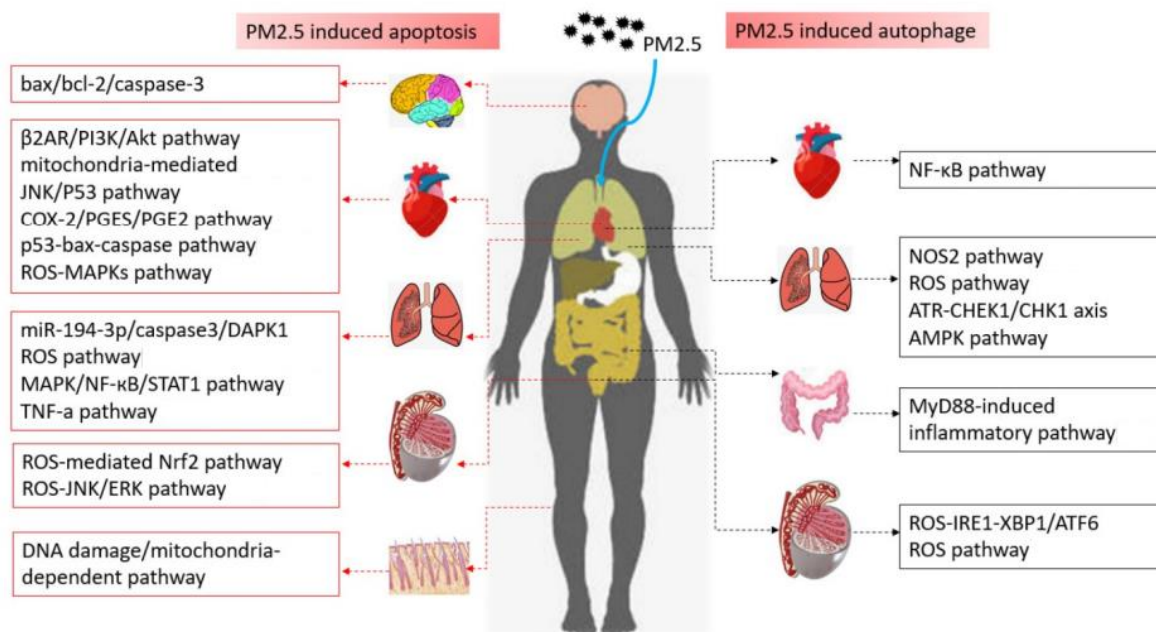


Figure 33 : Apoptose, autophagie et voies de signalisation associées, induites par les PM_{2.5} dans différents organes, d'après Wang - 2021 (249).

Le nombre d'études s'intéressant spécifiquement à la fraction ultrafine est quant à lui plus restreint (tableau 21). Quelques études expérimentales ont néanmoins été réalisées afin d'étudier l'induction des processus apoptotiques par les PUF, notamment au niveau pulmonaire, cérébral et hépatique. En effet, des études *in vitro* menée sur des fibroblastes de souris C57BL/6 ainsi que sur des cellules épithéliales bronchiques (*i.e.*, 16 HBE) et alvéolaires (*i.e.*, A549) humaines ont démontré que la production d'ERO induite par des nanoparticules de carbone ou de silice activait la voie intrinsèque de l'apoptose faisant intervenir les mitochondries (171,211,215). Des observations similaires ont été réalisées sur des hépatocytes murins chez lesquels une apoptose précoce d'environ 25 % était constatée suivant une exposition aiguë à des nanoparticules de carbone (271,272). Cette implication de la mitochondrie a également été démontré au niveau cérébral chez des cellules neuronales SH-SY5Y exposées de manière aiguë à des nanoparticules de carbone (172). Toujours au niveau cérébral, une exposition aiguë d'oligodendrocytes à des DEP induit une production plus importante d'ERO couplée à une expression accrue des protéines pro-apoptotiques p53, Bax et caspase-3 clivée (273). Les résultats de cette dernière étude ont été complétés par une analyse *in vivo*, dans laquelle l'utilisation d'un inhibiteur de NOX2, permettant la diminution de la production d'ERO, conduit à une augmentation de la survie cellulaire. L'expression de ces protéines pro-apoptotiques a également été démontré chez des souris C57BL/6 exposées de manière sub-chronique à des nanoparticules de carbone.

Un petit nombre d'études expérimentales a également cherché à étudier l'implication des PUF dans l'induction de processus autophagiques. Une étude couplant une approche *in vitro* sur des cellules 16HBE et *in vivo* sur un modèle murin a ainsi montré qu'une exposition aiguë à des PUF environnementales induisait la génération d'autophagosomes et que l'inhibition de l'autophagie avait des effets thérapeutiques bénéfiques sur l'inflammation des voies aériennes et l'hyperproduction de mucus induites par les particules (274). Cette formation d'autophagosomes a également été démontré au niveau cardiaque chez des souris ICR et chez des cellules endothéliales primaires exposées de façon aiguë à des nanoparticules de silice (275). Par ailleurs, dans ces deux études, une augmentation significative de LC3-II fut observée. Une autre étude réalisée, quant à elle, sur des cellules neuronales SH-SY5Y a montré qu'une exposition aiguë à des nanoparticules de carbone induisait l'autophagie via la voie de signalisation PI3K/Akt (276). À *contrario*, un étude réalisée sur des

cellules épithéliales bronchiques humaines BEAS-2B a montré qu'une exposition aiguë à la fraction organique extractible de PM_{0,3} induisait une diminution des protéines autophagiques Atg5 et Beclin-1, associée à une diminution du ratio LC3B-II/LC3B-I impliqué dans la formation des autophagosomes (277).

Les études concernant les processus de nécrose et de ferroptose sont quant à elles plus parcellaires (tableau 20). Au niveau pulmonaire, trois études réalisées chez des souris BEAS-2B ont démontré l'implication de la mitochondrie dans l'initiation de la nécrose à la suite d'une exposition aux PM_{2,5}. En effet, Zhou et son équipe (2017) ont démontré qu'à forte dose, les PM_{2,5} induisaient une dérégulation du processus autophagique associée à la nécrose, accentuée par une augmentation de l'expression et de la translocation mitochondriale d'HO-1 (278). Il a par ailleurs été démontré que l'inhibition de la synthèse d'ATP par les mitochondries pouvait être initiatrice de la nécrose (279). Dornhof et ses collaborateurs (2017) ont quant à eux démontré que l'internalisation cellulaire des PM_{2,5} finissait par induire un éclatement des lysosomes et un gonflement mitochondrial, à l'origine du processus nécrotique (280). L'induction de la nécrose à la suite de la rupture de la perméabilité lysosomale a également été démontré chez des cellules pulmonaires murines (281). En plus d'induire la nécrose, le déséquilibre de la balance redox est aussi susceptible d'initier des processus ferroptotiques, comme cela a pu être démontré au niveau intestinal et vasculaire (282,283). Au niveau cérébral, Xuong et son équipe (2022) ont quant à eux démontré que l'induction de la ferroptose par les PM_{2,5} était médiée par l'inhibition de la voie de signalisation ERK/CREB (284). Par ailleurs, au niveau pulmonaire, Yue et son équipe (2023) ont démontré dans des cellules BEAS-2B que le dysfonctionnement mitochondrial médié par HO-1 et la ferritinophagie médiée par NCOA4 étaient conjointement nécessaires pour la ferroptose induite par les PM_{2,5} (285). Une autre étude réalisée sur le même type cellulaire a quant à elle montré l'implication de l'axe AMPK/Beclin-1 (286). Enfin, une étude couplant l'utilisation de cellules BEAS-2B et de cellules alvéolaires primaires de souris C57BL/6J a quant à elle montré que la ferroptose était médiée par le TGF- β (287).

Tableau 20.: Résumé des études citées analysant l'induction de l'apoptose, de l'autophagie, de la nécrose et de la ferroptose par les PM_{2,5}.

Mort cellulaire	Type d'étude	Organe	Type cellulaire	Conditions d'exposition	Voie de signalisation	Référence
Apoptose	<i>In vitro</i>	Poumons	Cellules épithéliales alvéolaires humaines A549	0 ; 12,5 ; 25 ; 50 ; 100 µg PM _{2,5} /mL pendant 24h	MAPK2 / NFκB / STAT1	(250)
			Cellules pulmonaires épithéliales humaines L132	10 ou 50 % de la concentration létale des PM (LC10 ; LC50) pendant 24, 48 or 72 h d'incubation	Voies de signalisation du TNF-α et mitochondriale : ERO – p53 – Bax – Bcl2 - caspases 3 et 9	(254)
			Cellules épithéliales bronchiques humaines 16HBE	0, 10, 50 ou 100 µg PM _{2,5} /mL pendant 48h	Voie mitochondriale : ERO – Bax – Bcl2 – Caspases 3 et 9	(255)
			Cellules épithéliales alvéolaires humaines A549	50 µg PM _{2,5} /mL pendant 24h	ERO - AKT ERO - ERK1/2	(256)
			Cellules épithéliales bronchiques humaines 16HBE	500 ng PM _{2,5} /mL pendant 24h	miR-194-3p / caspase-3 / DAPK1	(262)
	<i>In vitro</i>	Cœur et système vasculaire	Cardiomyocytes humains AC16	25, 50, 100 µg PM _{2,5} /mL pendant 24h	β2AR / PI3K/ Akt	(251)
			Cellules endothéliales aortiques de souris	25, 50, 100 µg PM _{2,5} /mL pendant 12 ou 24h	COX-2 / PGES / PGE2 / inflammation	(252)
			Cardiomyocytes humains AC16	25, 50, 100 µg PM _{2,5} /mL pendant 24h	Voie de signalisation mitochondriale : ERO – Bax – Bcl2 – Caspases 3 et 9	(257)
			Cardiomyocytes de rat H9c2	0, 100, 200, 400, 800 µg PM _{2,5} /mL pendant 0, 0.25, 0.5, 1 ou 24h	ERO – ERK/Bax – MAPK/Bcl2 –caspase 3	(258)
			Cellules endothéliales de veines ombilicales humaines	0,2 ; 1 ; 5 ; 25 µg PM _{2,5} /mL pendant 48h	P53 – Bax – Caspases 3,7,9	(259)
			Macrophages RAW264.7	0 ; 12,5 ; 25 ; 50 ; 100 µg PM _{2,5} /mL pendant 4h	Voie de signalisation mitochondriale : ERO – Bax – Bcl2 – Cyt C - Caspases 3 et 9	(260)

	<i>In vivo</i>		Cardiomyocytes de rats Wistar mâles	Une instillation endotrachéale (0, 4, 40 mg/kg) tous les 2 jours, à 3 reprises consécutives	JNK / p53	(253)
	<i>In vivo</i>	Cerveau	Neurones primaires issus de cellules corticales de souris	12,5 ; 25 ; 50 ; 100 ; 100 µg PM _{2,5} /mL	Bax – Bcl2 – Caspase 3	(261)
Autophagie	<i>In vitro</i>	Poumon	Cellules épithéliales bronchiques humaines BEAS-2B	0, 50 ,100 µg PM _{2,5} /mL pendant 24h	NOS2	(263)
			Cellules épithéliales bronchiques humaines BEAS-2B	100 µg PM _{2,5} /mL pendant 24h	ATR – CHEK1 / CHK1	(264)
			Cellules épithéliales alvéolaires humaines A549	100 µg PM _{2,5} /mL pendant 24h	AMPK	(265)
			Cellules épithéliales alvéolaires humaines A549	8, 16, 32, 64 µg PM _{2,5} /cm ² pendant 48h ou 16 µg/cm ² pendant 12, 24, 48 h	Inc146880	(266)
			Cellules épithéliales alvéolaires humaines A549	25, 50, 100, 200 µg PM _{2,5} /mL pendant 4, 12, 24 ou 48h	LC3B / Atg5 / Becn1	(267)
	<i>In vitro</i>	Système vasculaire	Cellules endothéliales de veines ombilicales humaines	12,5 ; 25 ; 50 ; 100 ; 200 µg PM _{2,5} /mL pendant 12, 24 ou 36h	ERO – AKT - mTOR	(268)
			Cellules endothéliales aortiques de souris	0 ; 12,5 ; 25 ; 50 ; 100 µg PM _{2,5} /mL pendant 24h	NFκB / p38 / Akt	(269)
	<i>In vivo</i>	Foie	Cellules hépatiques de souris C57BL/6	111 µg/m ³ dans la chambre d'exposition	Myd88	(270)
	Nécrose	<i>In vitro</i>	Poumon	Cellules épithéliales bronchiques humaines BEAS-2B	0, 25, 50, 100, 200, 400 µg PM _{2,5} /mL pendant 24h	HO-1

			Cellules épithéliales bronchiques humaines BEAS-2B	100 µg PM2,5/mL pendant 5 semaines	AMPK	(280)
			Cellules épithéliales bronchiques humaines BEAS-2B	50, 100, 200, 300, 400, 500 µg PM2,5/mL pendant 24h	Synthèse d'ATP	(279)
	<i>In vivo</i>		Cellules pulmonaires de souris Balb/c	Exposition nose-only pendant 4h, 5 jours par semaine, à une concentration 7 fois supérieure à celle de l'environnement	Déséquilibre de la balance redox	(281)
Ferroptose	<i>In vitro</i>	Cerveau	Cellules neuronales Neuro-2A et SH-SY5Y	31,25 ; 62,5 ; 125 µl PM2,5/mL pendant 24h	ERK / CREB	(284)
	<i>In vitro</i>	Système vasculaire	Cellules endothéliales humaines	0 ; 8 ; 16 ; 32 ; 64 ; 128 µg PM2,5/mL pendant 12 ou 24h	Déséquilibre de la balance redox et surcharge en fer	(282)
	<i>In vitro</i>	Intestin	Cellules humaines de l'intestin grêle HuTu-80	100 µg PM2,5/mL pendant 24, 48 et 72h	Déséquilibre de la balance redox et surcharge en fer	(283)
	<i>In vitro</i>	Poumon	Cellules épithéliales bronchiques humaines BEAS-2B	0, 10, 50 µg PM2,5/mL pendant 0, 27, 48 ou 72h	TGF-β	(287)
			Cellules alvéolaires primaires de souris C57BL/6J	Instillation intratrachéale de 50 µg de PM2,5 tous les 5 jours pendant 15 ou 30 jours		
			Cellules épithéliales bronchiques humaines BEAS-2B	50, 100, 200, 400, 800 µg PM2,5/mL pendant 24h	AMPK – Beclin 1	(286)
			Cellules épithéliales bronchiques humaines BEAS-2B	25 µg PM2,5/mL pendant 48h	HO-1	(285)

Tableau 21. : Résumé des études citées analysant l'induction de l'apoptose et de l'autophagie par les PUF.

Conditions d'exposition		Modèle	Effets observés	Référence	
Apoptose	<i>In vitro</i>	0, 5, 10, 15, 20 µg PUF/mL pendant 24h	Fibroblastes de souris mâles C57BL/6	Voie mitochondriale via les ERO	(211)
		Nanoparticules de carbone 50, 100, 200 µg/mL pendant 48h	Cellules épithéliales bronchiques humaines 16HBE	Apoptose induite via la voie mitochondriale (ERO)	(171)
		0, 10, 20, 30, 40, 50 µg/mL de Nanoparticules de carbone (FW200) pendant 24h	Hépatocytes isolés de souris C57BL/6	↑ de 27 % du ratio cellules apoptotiques / cellules totales	(271)
		DEP 200 µg/mL pendant 24h	Oligodendrocytes : précurseurs et matures, isolés de cerveaux de rats Sprague-Dawley nouveaux-nés	↑ NOX2 → ↑ ERO → ↑ p53, Bax, Caspase-3 clivée et ↓ Bcl-2 dans les 2 types cellulaires	(273)
		Nanoparticules de carbone 0, 5, 10, 20 et 40 µg/mL pendant 1, 4, 6 ou 24h	Cellules neuronales SH-SY5Y	↑ Production d'ERO → ↓ Δφm → ↑ [Ca ²⁺] et Caspase 3 → ↑ Apoptose	(172)
		Nanoparticules de carbone (13 nm) 20 mg/L pendant 24h	Hépatocytes isolés de souris C57BL/6	Apoptose précoce de 25,2 % via la voie mitochondriale (ERO)	(272)
		10 µg/mL de nanoparticules de silice associée ou non à 100 µM d'acétate de plomb pendant 24h	Cellules épithéliales alvéolaires humaines A549	Nanoparticules de silice renforcent l'apoptose induite par le plomb via la voie mitochondriale	(215)
	<i>In vivo</i>	Nanoparticules de carbone 15 ou 30 µg/m ³ , 6h/j pendant 28 j par instillation intranasale	Souris C57BL/6	↑ protéines pro-apoptotiques pulmonaires : Bcl-2, Bax, Caspase-3 clivée, Pro-caspase-3, Caspases 7,8,9, PARP-1	(171)
		DEP 0,4 mg/mL pendant 1 semaine	Rats Sprague-Dawley nouveaux-nés	<ul style="list-style-type: none"> ↑ Expression NOX2 et Caspase-3 clivée dans oligodendrocytes de la substance blanche et dans le lysat de cervelet Utilisation d'un inhibiteur de NOX2 ↑ la survie cellulaire 	(273)

Autophagie	<i>In vitro</i>	PUF ambiantes 100 µg/mL pendant 24h	Cellules épithéliales bronchiques humaines 16HBE	<ul style="list-style-type: none"> • Internalisation des PUF → Activation des autophagosomes • Blocage de l'autophagie → ↓ IL-6, IL-8, MUC5AC 	(274)
		Nanoparticules de carbone (Printex) 5, 10, 20 et 40 µg/mL pendant 24h	Cellules neuronales SH-SY5Y	<ul style="list-style-type: none"> • Autophagie via la voie de signalisation PI3K/Akt • Inhibition de l'autophagie → Accumulation p-Tau au stade précoce d'Alzheimer 	(276)
		PM _{0,3} 0,3 à 96 µg/cm ² pendant 24h	Cellules épithéliales bronchiques humaines BEAS-2B	<ul style="list-style-type: none"> • ↓ Atg5, Beclin-1 après 24h • ↓ Ratio LC3B-II/LC3B-I impliqué dans la formation des autophagosomes, après 48h 	(277)
		Nanoparticules de silice 25, 50, 75 et 100 µg/mL pendant 24h	Lignée de cellules endothéliales primaires de la veine ombilicale humaine	<ul style="list-style-type: none"> • Présence d'autophagosomes • ↑ dose-dépendante du ratio LC3-II/LC3-I • Cross-talk autophagie/angiogenèse médié par le VEGFR2 	(275)
	<i>In vivo</i>	PUF ambiantes 100 µg/j pendant 2j ou 4j par instillation intratrachéale	Souris Becn1 +/- et Lc3b -/-	<ul style="list-style-type: none"> • Blocage de l'autophagie → ↓ Inflammation et production de mucus • ↑ Autophagosomes → ↑ IL-8 et ↓ MUC5AC 	(274)
		Nanoparticules de silice 0 ; 29,5 ; 103,5 ; 177,5 mg/kg par injection intraveineuse	Souris ICR	<ul style="list-style-type: none"> • Présence d'autophagosomes dans les cellules endothéliales et les péricytes des souris exposées • ↑ Expression LC3 dans l'endothélium vasculaire des souris exposées 	(275)

5. Remodelage tissulaire et cancérogénèse

A. Généralités

La muqueuse respiratoire constitue le premier mécanisme de défense pulmonaire vis-à-vis des menaces extérieures. En plus d'être une barrière physique et dynamique, sa composition riche en cellules épithéliales lui confère des fonctions immunitaires indispensables à la protection de l'organisme. L'activation des récepteurs présents à leur surface (*e.g.*, PPR, Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)) entraîne une réponse inflammatoire d'intensité variable, avec sécrétion de médiateurs chimiques tels que des cytokines ou des facteurs de croissance, conduisant au recrutement massif de cellules immunitaires. Le dérèglement et/ou l'exacerbation des fonctions épithéliales peut léser l'épithélium de façon répétée et conduire à une inflammation chronique couplée une altération du processus de réparation tissulaire et d'élimination/remplacement des cellules anormales, ayant pour conséquence un remodelage tissulaire progressif de l'épithélium bronchique. Ce dernier est caractérisé par un épaississement du tissu musculaire lisse, une métaplasie de la muqueuse avec augmentation du nombre de cellules à mucus et une raréfaction des cellules ciliées ainsi qu'une fibrose péribronchique (155,182). En outre, il est le résultat d'un déséquilibre entre les mécanismes d'apoptose et/ou de nécrose d'une part, et ceux de prolifération et de différenciation des cellules inflammatoires et structurelles de la paroi bronchique telles que les cellules épithéliales, mésenchymateuses et musculaires lisses, d'autre part (288). Les conséquences sont variées avec une rigidification des bronchioles, une hyperréactivité bronchique, une hypersécrétion de mucus et une altération de la clairance mucociliaire. Ce mécanisme de pathogénicité pulmonaire est par ailleurs une caractéristique distinctive des pathologies pulmonaires chroniques à composante inflammatoire de type asthme et BPCO, observée notamment dans le cadre de la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) (288–290). Cette dernière correspond à un processus dynamique de dédifférenciation durant lequel les cellules épithéliales perdent leurs caractéristiques spécifiques et acquièrent des propriétés propres aux cellules mésenchymateuses. Elle est caractérisée par une dissolution des jonctions intercellulaires ainsi que par une dégradation de la matrice extracellulaire et de la lame basale bordant l'épithélium par des protéases conduisant à une altération de l'adhésion cellulaire. Elle est également définie par une réorganisation du cytosquelette d'actine avec formation de fibres de stress et conversion des filaments intermédiaires d'un type épithélial riche en cytokeratine à un type mésenchymateux riche en vimentine ainsi qu'une perte de la polarité cellulaire, qui confère aux cellules une grande plasticité et une capacité d'invasion/migration vers les tissus périphériques (291,292). Ces propriétés expliquent le rôle essentiel de ce mécanisme au cours du développement embryonnaire, de la régénération tissulaire et de la cicatrisation des épithéliums mais aussi son implication dans la progression tumorale (292). En effet, par l'intermédiaire de la TEM, les cellules cancéreuses sont capables d'acquérir un phénotype invasif leur permettant de se dissocier de la tumeur primaire et de migrer dans la circulation sanguine en plus de développer une capacité de survie et une résistance accrues vis-à-vis des cellules immunitaires (293). De nombreux signaux extracellulaires participent de façon active à la promotion de la TEM. Ceci est particulièrement le cas de certaines métalloprotéases (*e.g.*, MMP-3, MMP-9, MMP-11), des facteurs de croissances libérés par l'épithélium lésé (*e.g.*, Epidermal Growth Factor (EGF), Keratinocyte Growth Factor (KGF), Fibroblast Growth Factor (FGF), TGF- α/β) et des protéines sécrétées Wnt, Hedgehog et Notch qui vont induire l'expression de facteurs de transcription (*e.g.*, Snail/Slug, Twist, Zeb). Ces derniers contrôlent l'expression de protéines spécifiques du profil mésenchymateux tels que la N-cadhérine, la fibronectine, la vimentine, l'Alpha Smooth Muscle Actin (α -SMA) ou encore la Fibroblast-specific protein (FSP1) (292,294) (figure 34).

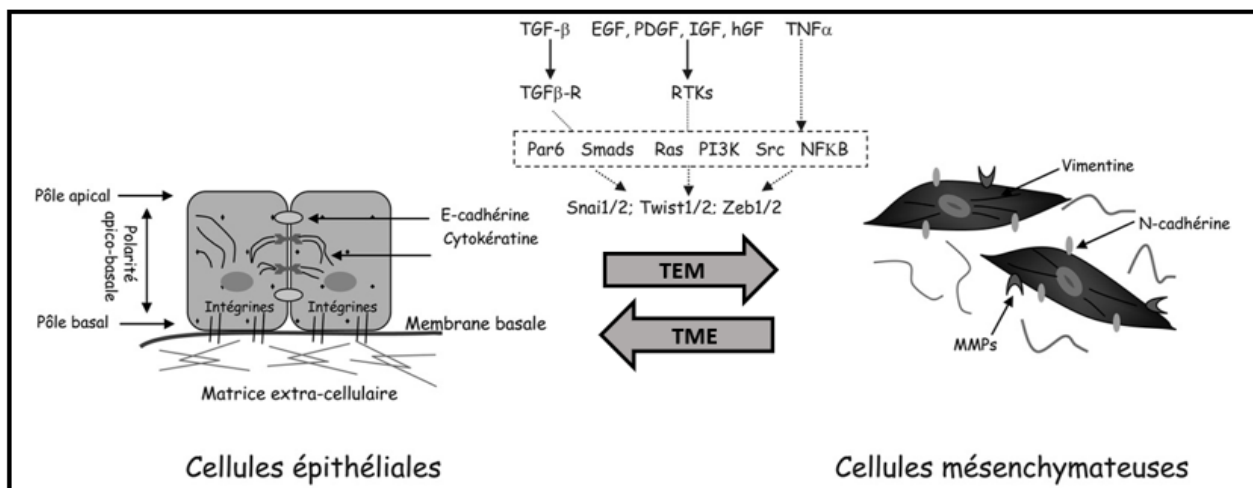


Figure 34 : Processus de transition épithélio-mésenchymateuse et de transition mésenchymato-épithéliale, d'après l'Académie nationale de médecine - 2009 (292).

F. Induction d'un remodelage tissulaire par les PM

Des études récentes ont démontré que les PM_{2,5} jouaient un rôle de promoteurs exogènes de fibrose et de cancer en induisant l'expression des biomarqueurs caractéristiques de la TEM (figure 35) (295). En effet, l'excès d'ERO générées par ces dernières serait capable d'activer des voies de signalisation impliquées dans l'initiation de la TEM. Au niveau pulmonaire, des études expérimentales ont ainsi montré qu'une exposition chronique aux PM_{2,5} induisait la voie de signalisation TGF-β1/SMAD2/3, ce qui avait pour conséquence une accumulation de fibres de collagène et une TEM pro-fibrotique (296,297). La dérégulation de cette voie de signalisation a également été constatée chez des souris à la suite d'une exposition aiguë à des PUF, favorisant ainsi le remodelage vasculaire (298). De la même manière, d'autres cascades de signalisation telles que NFκB, JAK/STAT3, Extracellular signal-regulated kinase (ERK), Akt, Notch ou Wnt/β-cathénine seraient également activées sous la dépendance, ou non, des ERO, initiant le processus de TEM (295). En parallèle, des composants spécifiques des PM_{2,5} et notamment les HAP, seraient également impliqués dans la promotion de ce mécanisme par l'intermédiaire de la voie de signalisation AhR/CYP1A1 (récepteur d'aryl hydrocarbure/cytochrome 1A1).

Des études expérimentales ont également cherché à démontrer la capacité des PUF à induire une TEM et un remodelage tissulaire (tableau 22). Longhin et son équipe (2016) ont ainsi démontré chez des cellules épithéliales bronchiques humaines HBEC3 la capacité d'une faible dose de PUF (*i.e.*, 2,5 µg/cm² pendant 2 semaines) de diesel à moduler l'expression de gènes impliqués dans la TEM, *SERPINB2* et *CDH1*, codant respectivement pour l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène-2 et la E-cadhérine (299). Cette surexpression de *SERPINB2* fut également constatée quelques années plus tard par Grilli et son équipe (2018) chez des cellules BEAS-2B (300). La sous-expression de *CDH1*, combinée à une surexpression des gènes *VIM* et *CDH2* codant respectivement pour la vimentine et la N-cadhérine, fut quant à elle également constatée par Rynning et son équipe (2018) chez le même type cellulaire exposé à une dose plus importante de DEP (*i.e.*, 100 µg/cm² pendant 72 heures) mais sur un temps plus court (301). Une diminution de la migration cellulaire accompagnant cette réduction d'expression de *CDH1* a également été décrite par LaGier et al (2013) à la suite de la TEM chez des cellules épithéliales pulmonaires murines exposées au même type de particules pendant 72 heures (302). En plus de démontrer cette diminution d'expression de *CDH1*, Thévenot et ses collaborateurs (2013) ont également montré qu'une exposition aiguë de cellules BEAS-2B ou de cellules épithéliales pulmonaires néonatales murines à une dose de 20 µg/cm² de PUF contenant du dichlorobenzène induisait une diminution concomitante de l'expression géniques d'autres protéines des jonctions cellulaires dont *OCN*,

NOTCH1, *CTNNB1* et *DSP* codant respectivement pour l'occludine, Notch1, la β -caténine et la desmoplakine, associée à une augmentation de l'expression génique de répresseurs de la E-cadhérine dont *SNAIL*, *SNAI2*, *SNAI3*, *TCF3* et *ZEB1/2* codant respectivement pour Snail, Slug, Smuc, les facteurs de transcription 3, ZEB1 et ZEB2 (303). Une étude menée par Lee et son équipe (2022) a par ailleurs démontré que la TEM de cellules épithéliales nasales humaines HBEC exposées à des DEP pendant 8 semaines était dépendante de cette protéine ZEB2 (304). En parallèle, Niranjana et al (2022) ont démontré chez des cellules épithéliales alvéolaires humaines A549 que la prolifération des éosinophiles combinée à une production accrue d'IL-13 induisait une restriction de la prolifération des cellules épithéliales alvéolaires et à terme leur apoptose (305). Par ailleurs, Bové et son équipe (2018) ont démontré que l'exposition de fibroblastes humains à des nanoparticules de carbone induisait une perturbation du remodelage de la matrice extracellulaire par ces cellules, entraînant une perte de structure et de fonctionnalité du tissu pulmonaire (306).

Des études menées *in vivo* permettent d'appuyer l'ensemble de ces données obtenues *in vitro*. En effet, Lee et al (2022) ont démontré qu'une exposition sub-chronique de souris Balb/c préalablement sensibilisées par un acarien à des DEP induisait une augmentation de l'expression protéique de Zeb2, α -SMA et N-cadhérine couplée à une diminution de l'expression de ZO-1 et de la E-cadhérine, se traduisant par un épaississement du collagène sous-épithélial (304). Cette augmentation de l'expression d' α -SMA couplée à une élévation du nombre de fibroblastes fut également constatée par Niranjana et son équipe (2022) chez des souris Balb/c à la suite d'une exposition unique à 100 μg de DEP (305). Il en est de même pour Singh et al (2022) pour qui cette augmentation d'expression fut accompagnée d'une élévation de l'expression de la fibronectine et de la vimentine, d'une diminution de la E-cadhérine, caractérisée par une diminution de la déposition du collagène, d'un épaississement de la paroi alvéolaire et d'une hyperplasie des muscles lisses chez des souris C57BL/6 exposées à des DEP (*i.e.*, 5 mg/m^3) pendant 8 semaines (307). Thévenot et al (2013) ont également constaté cette hyperplasie couplée à une diminution de l'expression de la E-cadhérine chez des souris C57BL/6 et des rats Brown-Norway exposée à des PUF contenant du dichlorobenzène (*i.e.*, 200 $\mu\text{g}/\text{m}^3$) pendant 7 jours (303). Il en est de même pour Yin et son équipe (2023) qui furent cette observation chez des souris C57BL/6 exposées à des DEP (*i.e.*, 3 mg/m^3) pendant 3 mois (308). Kim et al (2016) ont montré que cette déposition accrue de collagène était accompagnée d'une hyperplasie des cellules caliciformes et d'une augmentation de l'expression de VEGF conduisant à un phénotype fibrotique, chez des souris Balb/c exposées à des DEP (*i.e.*, 100 $\mu\text{g}/\text{m}^3$) pendant 3 mois (309).

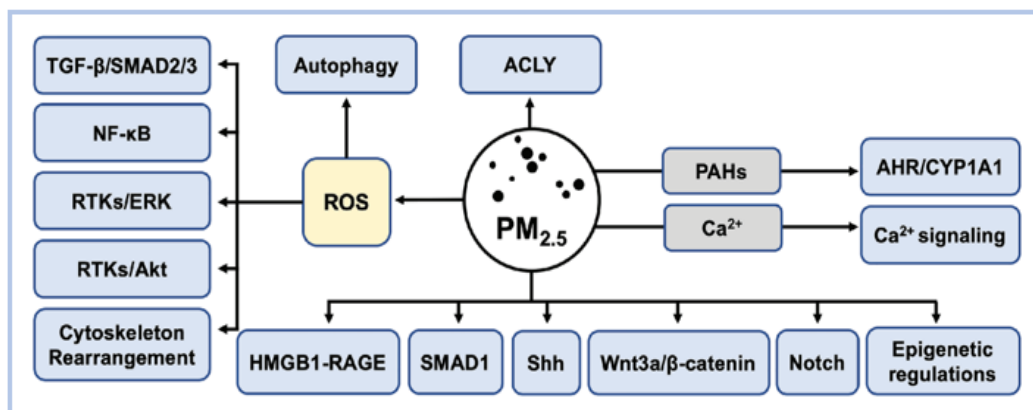


Figure 35 : Voies d'induction potentielle de la transition épithélio-mésenchymateuse par les $\text{PM}_{2.5}$, d'après Xu – 2019 (295).

Tableau 22 : Résumé des études citées analysant l'induction de la transition épithélio-mésenchymateuse par les PUF.

Conditions d'exposition		Modèle	Effets observés	Référence
<i>In vitro</i>	DEP 2,5 µg/cm ² pendant 2 semaines	Cellules épithéliales bronchiques humaines HBEC3	<ul style="list-style-type: none"> • ↑ <i>SERPINB2</i> • ↓ <i>CDHI</i> 	(299)
	DEP 2,5 µg/cm ² pendant 4, 8, 16 ou 20h	Cellules épithéliales bronchiques humaines BEAS-2B	<ul style="list-style-type: none"> • ↑ <i>GREM1, SERPINB2</i> 	(300)
	DEP (NIST SRM2975) 100 µg/cm ² pendant 72h	Cellules épithéliales bronchiques humaines HBEC3	<ul style="list-style-type: none"> • ↑ <i>CDH2, VIM</i> • ↓ <i>CDHI</i> • ↓ Migration et invasion cellulaires 	(301)
	DEP ou nanoparticules de carbone 0-100 µg/cm ² pendant 3 jours	Cellules pulmonaires de souris LA-4	<ul style="list-style-type: none"> • ↓ <i>Cdh1</i> • ↓ Migration cellulaire 	(302)
	PUF contenant du dichlorobenzène 20 µg/cm ² pendant 0, 3, 6 ou 24h	Cellules épithéliales bronchiques humaines BEAS-2B et Cellules épithéliales pulmonaires néonatales murines	<ul style="list-style-type: none"> • ↓ Expression des gènes codant pour des protéines de jonctions cellulaires : <i>CDHI</i> (E-cadhérine), <i>OCN</i> (Occludine), <i>NOTCH1</i> (Notch1), <i>CTNNB1</i> (B-caténine), <i>DSP</i> (Desmoplakine) • ↑ Expression des gènes codant pour des répresseurs de la E-cadhérine : <i>SNAI1</i> (Snail homolog 1), <i>SNAI2</i> (SLUG), <i>SNAI3</i> (SMUC), <i>TCF3/4</i> (Transcription factor 3/4), <i>ZEB1/2</i> <ul style="list-style-type: none"> • ↑ MMP3, MMP9, TGF-B1/2/3 • ↓ Expression protéique : E-cadhérine, TGF-B • ↑ Expression protéique : α-SMA, pFAK, collagène 1 	(303)
	DEP ± acarien 2,08 mg/cm ² ou 5,21 mg/cm ² pour les cellules immergées ; 26,3 mg/cm ² en interface air-liquide Pendant 0, 24, 48 et 72h	Cellules épithéliales nasales humaines HNEC	<ul style="list-style-type: none"> • TEM des cellules épithéliales pulmonaires et nasales dépendante de ZEB2 	(304)
	DEP 125, 250, 500 et 1000 µg/ml	Lignée cellulaire de leucémie humaine HL-60 et Cellules	Prolifération des éosinophiles combinée à une production accrue d'IL-13 → Induction d'une restriction de la	(305)

	pendant 24h	épithéliales alvéolaires humaines A549	prolifération des cellules épithéliales alvéolaires, puis apoptose	
	Nanoparticules de carbone 20 µg/cm ² pendant 24h	Fibroblastes pulmonaires humains MRC-5	<ul style="list-style-type: none"> • Perturbation des déplacements des fibroblastes → Inhibition du remodelage de la matrice → Perte de structure et de fonctionnalité du tissu pulmonaire • Retour à un état normal en présence d'antioxydants 	(306)
<i>In vivo</i>	PUF contenant du dichlorobenzène 200 µg/m ³ , 30 min/j pendant 7 jours, en corps entier	Souris C57BL/6 et Rats Brown-Norway âgés de 4 jours	<ul style="list-style-type: none"> • Hyperplasie des muscles lisses <ul style="list-style-type: none"> • ↓ <i>E-cadhérine</i> 	(303)
	20 µg de DEP par instillation intranasale 3x/semaine pendant 8 semaines ou 12,5 µg/g nose-only pendant 7 jours	Souris Balb/c préalablement sensibilisées par un acarien	<ul style="list-style-type: none"> • ↑ Zeb2, α-SMA, N-cadhérine • ↓ E-cadhérine, ZO-1 ↑ Épaisseur du collagène sous-épithélial	(304)
	DEP Exposition unique de 100 µg par instillation intranasale	Souris Balb/c	<ul style="list-style-type: none"> • ↑ α-SMA ↑ FSP-1 → ↑ du nombre de fibroblastes pulmonaires	(305)
	DEP 5 mg/m ³ , 30 min/j, 5j/semaine, pendant 8 semaines en exposition corps entier	Souris C57BL/6	<ul style="list-style-type: none"> • ↑ dépôt de collagène, épaississement de la paroi alvéolaire, hyperplasie des muscles lisses, présence foyers fibrotiques • ↑ α-SMA, fibronectine, vimentine <ul style="list-style-type: none"> • ↓ E-cadhérine • Activation de la voie de signalisation TGF-β/Smad3 	(307)
	DEP 3 mg/m ³ en exposition corps entier, 1h/j, 5j/semaine, pendant 3 mois	Souris C57BL/6	<ul style="list-style-type: none"> • Altérations des cils des épithéliums pulmonaires, ↑ dépôt de collagène, Hyperplasie des muscles lisses des voies aériennes → Processus dépendants de CXCL17 	(308)
	DEP 100 µg/m ³ ou 3 mg/m ³ en exposition corps entier 1h/j, 5j/semaine, pendant 3 mois	Souris Balb/c	<ul style="list-style-type: none"> • Infiltration de cellules inflammatoires, ↑ dépôt de collagène, Hyperplasie des cellules caliciformes, ↑ VEGF → Fibrose 	(309)

6. Altérations épigénétiques : focus sur la dérégulation des miARN

A. Généralités

La régulation de l'expression des gènes est cruciale pour le maintien de l'homéostasie tissulaire ainsi que pour le développement des phénomènes pathologiques. Les modifications épigénétiques jouent un rôle prépondérant dans cette régulation du transcriptome. Il s'agit de changement dans l'expression génique, n'impliquant pas de modifications de la séquence codante du génome mais pouvant être transmis lors de divisions cellulaires. Il en existe majoritairement trois : la méthylation de l'ADN et les modifications des histones qui influent toutes deux sur la structure de la chromatine, et la modification dans l'expression des microARN (miARN) (310) (figure 36).

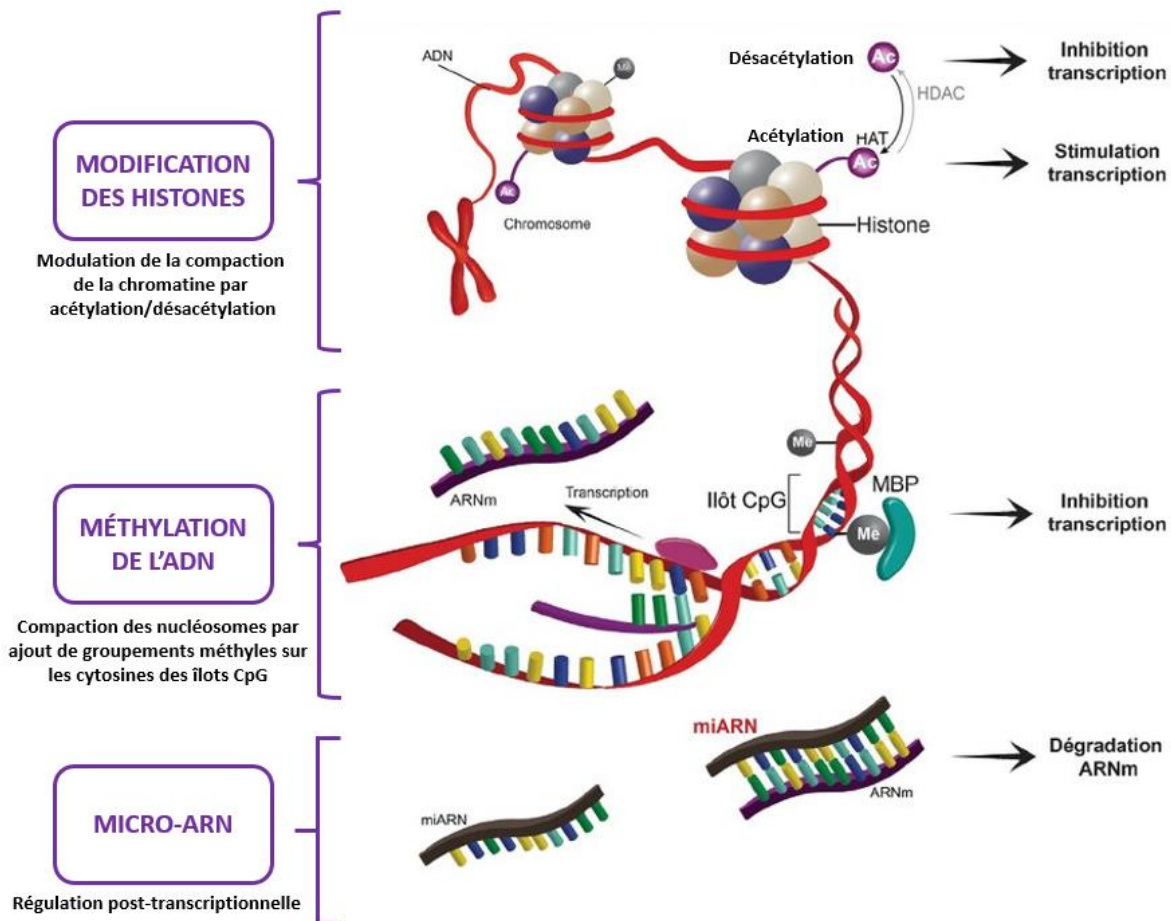


Figure 36 : Modifications épigénétiques modulant l'expression génique, adapté de Melchior – 2015 (310).

Ces derniers sont des petits ARN non codants de 19 à 22 nucléotides ayant une activité transcriptionnelle ou post-transcriptionnelle et capables de réguler négativement l'expression de certains gènes en se liant sur la région 3' non traduite (3'UTR) des ARN messagers (ARNm). Ce processus régulateur du transcriptome hautement conservé chez les eucaryotes est souvent retrouvé sous le terme anglais de « RNA silencing ». Une fois arrivés à maturité, ces miARN vont s'associer au complexe ribonucléique RISC (RNA Induced Silencing Complex) pour lui permettre de reconnaître spécifiquement les ARNm présentant une séquence complémentaire et induire leur répression (311) (figure 37). Il a ainsi été estimé que plus de 60% des gènes humains codant pour des protéines sont régulés par des miARN et que chaque miARN possède plusieurs centaines de gènes cibles (312).

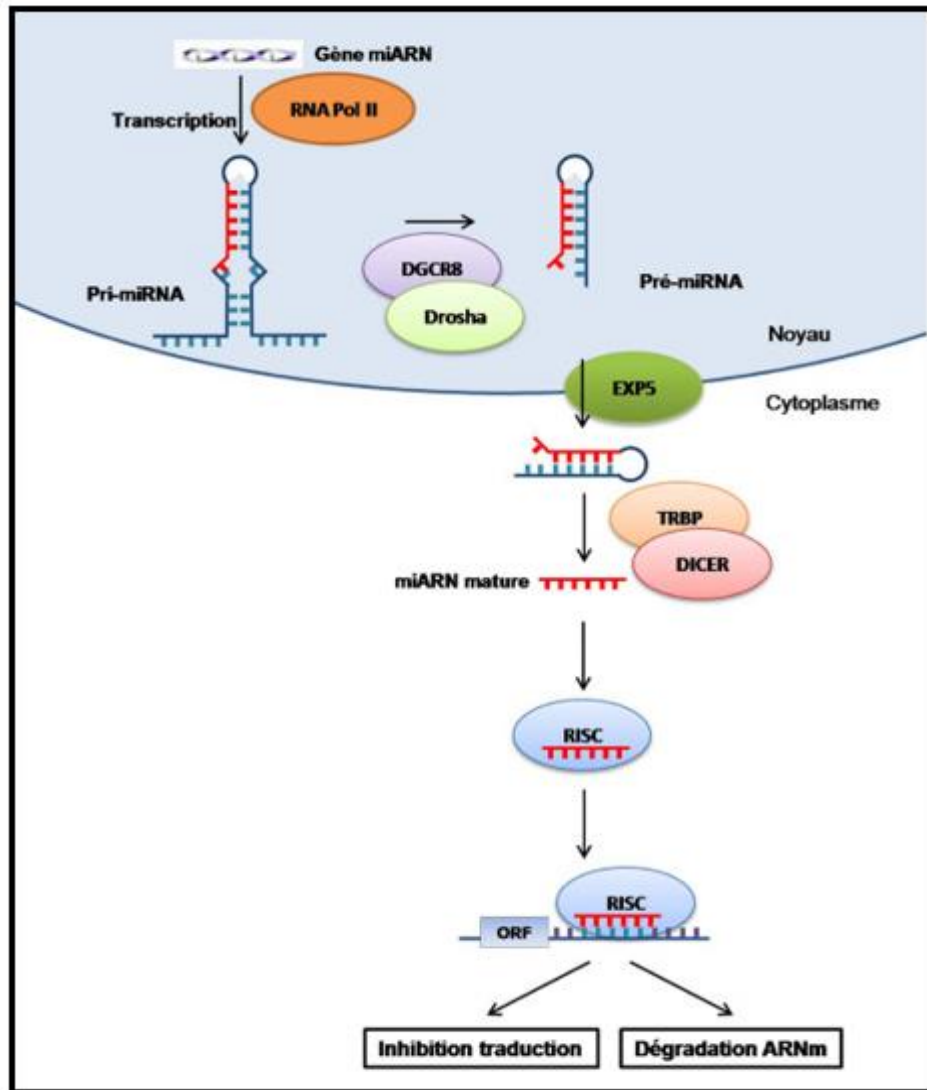


Figure 37 : Biogénèse des miARN et dégradation de l'ARNm cible, d'après Dunoyer - 2009 (311).

Les études fonctionnelles réalisées sur les miARN indiquent que ces derniers participent à la régulation de quasiment tous les processus cellulaires essentiels (*e.g.*, prolifération et différenciation cellulaires, apoptose, inflammation, signalisation hormonale, protection antivirale). En effet toute altération dans leur niveau d'expression est associée à des pathologies chez l'Homme (*e.g.*, cancers, maladies inflammatoires chroniques, pathologies cardiovasculaires, maladies neurodégénératives). À ce titre, la famille du let-7 a très largement été décrite comme appartenant à la catégorie des suppresseurs de tumeurs en intervenant dans l'inhibition de la croissance tumorale ainsi que dans la suppression des caractéristiques spécifiques des cellules souches cancéreuses telles que leur capacité à migrer, à se différencier et à se régénérer (313). A titre d'exemples, Cao et ses collaborateurs (2021) ont démontré que let-7a inhibait la métastase tumorale en régulant la signalisation TGF- β /Smad dans la lignée cellulaire d'adénocarcinome colorectal LS-174T (314). Li et son équipe (2021) ont également démontré que let-7b-3p inhibait la croissance tumorale en ciblant la voie de signalisation MAPK/ERK dans l'adénocarcinome pulmonaire humain (315). Shen et al (2020) ont par ailleurs démontré qu'une faible expression de let-7 pouvait être considérée comme un prédicteur significatif d'un pronostic défavorable chez les patients atteints de cancer pulmonaire (316). En parallèle, Bai et son équipe (2022) ont montré qu'au sein des cellules pulmonaires cancéreuses, cette réduction d'expression de let-7 combinée à une

forte expression du miR-21, indiquait en faveur de la progression tumorale (317). En effet, contrairement au let-7, il semblerait que le miR-21 agisse comme un oncogène dans de nombreux cancers, dont l'expression accrue indiquerait un pronostic défavorable notamment dans le cancer non à petites cellules (318). Ceci est également le cas du miR-214 dont l'expression accrue dans plusieurs types de tumeurs (*e.g.*, ovariennes, pulmonaires, pancréatiques) participe activement à l'inhibition des processus apoptotiques et au renforcement de la prolifération cellulaire (319).

Le rôle des miARN dans la réponse de l'organisme face aux xénobiotiques et plus spécifiquement aux substances toxiques environnementales (*e.g.*, polluants atmosphériques, métaux lourds, produits chimiques organiques) est un sujet qui commence à être évoqué dans la littérature scientifique depuis une quinzaine d'années (320–322). Aujourd'hui, des liens directs entre l'exposition environnementale et le développement de certaines pathologies lié à la dérégulation de miARN spécifiques ont été décrits (323–325). En effet, des miARN ont, à titre d'exemples, été identifiés comme étant associés à l'exposition aux polluants atmosphériques et au risque de développer un cancer du poumon (326). Ceci est le cas des miR-222, let-7a-5p, miR-21 ou encore miR-223 dont la dérégulation à la suite d'expositions aux PM_{2,5} serait en faveur de l'initiation des processus de cancérogenèse au niveau pulmonaire (327–330). Dans une étude épidémiologique menée en 2018 cherchant à investiguer la relation entre l'exposition à la pollution atmosphérique liée au trafic routier et l'expression des miARN chez 24 participants non-fumeurs, Krauskopf et son équipe (2018) ont également identifié une diminution du niveau d'expression des miR-27a-5p, miR-133a-3p, miR-145-5p, miR-193b-3p, miR-433-3p, miR-580-3p, miR-6716-3p, et une augmentation des miR-1224-5p and miR-3127-5p dont les cibles potentielles incluent des gènes impliqués dans des pathologies cardiovasculaires, pulmonaires et cancéreuses, ainsi que des voies de signalisation dont PI3k-Akt et p53 (331).

La présence de miARN circulants et présentant une stabilité importante dans les fluides biologiques (*e.g.*, plasma, urine, lait maternel, larmes, lavage broncho-alvéolaire) est aujourd'hui avérée. Ces derniers proviennent non seulement de la libération du contenu cytoplasmique lors de la mort cellulaire mais aussi de leur sécrétion complexe et finement régulée par les cellules. Certes les cellules responsables de la production de ces miARN sécrétés restent difficiles à déterminer mais dans le plasma, même si la proximité des cellules sanguines incite à les impliquer dans cette production, la présence de miARN spécifiques de certains organes, plaide pour une origine diverse et complexe de ces molécules circulantes (312). Certaines perturbations de profils de miARN circulants sont associées à l'apparition d'un contexte pathologique, ce qui explique pourquoi ils sont aujourd'hui utilisés comme biomarqueurs de diverses maladies et peuvent donc servir au diagnostic et au pronostic de ces dernières mais également de cible thérapeutique. Grâce à leur stabilité et leur accessibilité, les miARN circulants représentent donc une nouvelle famille de biomarqueurs à très fort potentiel. Puisque les niveaux d'expression des miARN varient d'un tissu à un autre, les profils des miARN circulants s'avèrent être un bon reflet des réponses spécifiques des tissus et organes exposés à un environnement nocif (332). La recherche de modifications quantitatives des miARN dans la circulation sanguine lors de ces situations pathologiques constitue donc un axe de recherche prometteur.

B. Induction d'altérations miRnomiques par les PM

À l'heure actuelle, peu d'études ont mis en évidence l'impact de la pollution atmosphérique sur les profils d'expression des miARN, qu'ils soient organo-spécifiques ou circulants, d'autant plus que les mécanismes exacts par lesquels ces facteurs environnementaux modifient l'expression des miRNA restent encore mal élucidés. Néanmoins, en 2020, Cheng et ses collaborateurs ont rédigé une revue regroupant 37 études montrant que suite à l'exposition à différentes tailles et sources de particules, de nombreuses modulations dans l'expression de miARN ciblant des gènes impliqués dans la régulation de l'inflammation (*e.g.*, miR-146a, miR-21, miR-155, miR-9), dans la prolifération cellulaire et la cancérogénèse (*e.g.*, miR-222, miR-331) ou dans la régulation de l'angiogenèse (*e.g.*, miR-29a) étaient observées (320). Parmi les quelques études s'intéressant plus spécifiquement aux PUF, celle de Krauskop et son équipe (2019) a permis d'identifier un lien entre l'exposition aux PUF chez des sujets sains 2 h après une activité physique ou une phase de repos, et la dérégulation significative de l'expression des miR-941, miR-532-5p, miR-28-3p, miR-222-3p et miR-146a-5p comme étant significativement dérégulés dans le plasma (333). Dans une autre étude réalisée par Vriens et ses collaborateurs (2016), une surexpression du miR-222 a été observée dans les échantillons salivaires de 80 enfants suite à l'inhalation récente de PUF (334). Par ailleurs, une étude réalisée par Mancini et al (2020) a réussi à mettre en évidence une corrélation entre la dérégulation de l'expression de 7 miARN (*i.e.*, miR-24-3p, miR4454, miR-4763-3p, miR-425-5p, let-7d-5p, miR-502-5p, miR-505-3p) extraits du sang total et à l'exposition aux PM_{2,5}, mais celle-ci n'était pas significative avec l'exposition aux PUF (328). Une revue publiée en 2021 a quant à elle identifié plusieurs miARN pouvant potentiellement être utilisés comme biomarqueurs afin de déterminer les populations exposées aux particules atmosphériques et ayant un risque significatif de développer un cancer pulmonaire (326). Parmi eux, sont retrouvés les miR-222 et miR-21, mais également les miR-223, miR-93, miR-425, miR-126 ou encore let-7a-5p, pour la plupart impliqués dans les processus inflammatoires et fonctionnant comme des oncogènes. Le tableau 23 résume les principaux miARN significativement dérégulés à la suite d'une exposition aux PM identifiés à ce jour et pouvant servir comme biomarqueur d'exposition (320,326,335). De manière intéressante, la grande majorité de ces miARN sont impliqués dans des voies de signalisation liées aux réponses immune et inflammatoire potentiellement impliquées dans la cancérogénèse pulmonaire.

En effet, le miR-222 est dérégulé dans de nombreux cancers dont le cancer pulmonaire non à petites cellules (336). Une surexpression de ce miARN a été observée dans les échantillons salivaires de 80 enfants suite à l'inhalation récente de PUF (334). Une autre étude va dans ce sens en constatant également une surexpression de ce miARN chez 63 travailleurs d'une usine d'acier, tout en ayant pu établir une corrélation avec la richesse en plomb des PM (337). À *contrario*, une diminution de son expression a été constatée chez des adultes sains exposés à de fortes concentrations de PM₁₀ ainsi que chez des personnes âgées exposées à des PM_{2,5} (330,327).

Le miR-21 est un oncogène qui est impliqué dans l'inhibition de l'apoptose et la promotion de la prolifération cellulaire. Tout comme ce qui avait été observé pour le miR-222, l'expression du miR-21 est augmentée chez les travailleurs de l'usine d'acier exposés aux PM, avec une corrélation avec le niveau de 8-OHdG (337). À l'inverse, d'autres études ont quant à elles constaté que ce miARN était significativement diminué à la suite d'une exposition aux PM. En effet, Louwies et son équipe (2016) ont démontré que l'exposition à de forte concentration de PM₁₀ induisait la diminution de son expression (330). De la même manière, cette sous-expression a été observée dans le sang chez des adultes jeunes et des personnes âgées ainsi que dans le tissu placentaire de couples mère/nouveau-nés à la suite d'une exposition aux PM_{2,5} (329,327,338).

La famille du miR-let-7 est elle-aussi impliquée dans la cancérogénèse en agissant sur la prolifération cellulaire et l'apoptose. Plusieurs études ont démontré que l'exposition aux PM_{2,5} induisaient une augmentation significative de l'expression de certains de ces miARN. En effet, Motta et son équipe (2013) ont démontré qu'une exposition aiguë à ces particules induisaient une surexpression du miR-let-7g dans le sang des travailleurs d'une usine de production d'acier (339). De la même manière, un monitoring de 24 heures a montré une augmentation de l'expression du miR-let-7-5p dans le sang de volontaires sains, qui a par ailleurs, été conforté dans une étude menée sur le plus long terme (321,328).

Tout comme ces prédécesseurs, le miR-126 régule des voies de signalisation impliquées dans l'apoptose et la cancérogénèse. L'exposition chronique d'adultes sains à des PM_{2,5} induit la surexpression de ce miARN dans les échantillons de sérums (321). À *contrario*, Fossati et son équipe (2014) ont constaté lors d'un monitoring allant de 4 heures à 28 jours, qu'une exposition aux PM_{2,5} induisait une diminution significative de son expression (327).

Le miR-425, qui joue le rôle d'oncogène, a un rôle prépondérant dans la croissance, l'invasion et la migration cellulaire, de même que dans l'apoptose et la transition épithélio-mésenchymateuse. Mancini et son équipe (2020) ont démontré que l'exposition aux PM_{2,5} induisait une surexpression de ce miARN dans le sang de sujets adultes (328). À l'inverse, deux autres études ont quant à elles, démontré que les PM_{2,5} induisaient une diminution de ce paramètre dans les échantillons sanguins chez des adultes sains et des obèses (333,340). À ce jour, les données concernant le miR-93 lui suggèrent un rôle à la fois d'oncogène et de suppresseur de tumeur. Il semblerait que l'exposition aux PM_{2,5} induise une surexpression de ce miARN chez des sujets exposés sur le long terme (321).

Contrairement aux miRNA précédents, le miR-223 fonctionne comme un suppresseur de tumeurs et est impliqué dans les réponses inflammatoire et immunitaire. Rodosthenous et son équipe (2016, 2018) ont démontré à deux reprises qu'une exposition aux PM_{2,5} induisait une augmentation significative de ce miARN dans le sang des sujets exposés (321,341).

L'ensemble de ces données suggèrent que la dérégulation de ces miARN serait potentiellement impliquée dans la toxicité des particules mais des études plus approfondies s'avèrent nécessaires afin d'établir le rôle précis de ces miRNA dans l'initiation et l'exacerbation de pathologies induites par les PM. Il apparaît également que des études longitudinales supplémentaires sont nécessaires pour voir s'il s'agit d'une altération transitoire ou d'une altération à long terme.

Tableau 23 : Principaux miARN pouvant potentiellement servir de biomarqueurs d'exposition et/ou d'effet aux PM.

miARN	PM	Voies de signalisation ou gènes cibles	Fonctions biologiques	Impact sanitaire	Référence
miR-222	10 ; 2,5 ; 0,1	PTEN (inhibiteur de PI3k-Akt)	Suppresseur de tumeur, inflammation	Cancer, pathologies pulmonaires, troubles de la reproduction, avortements	(327,330,334,337)
		MAPK	Inflammation, stress oxydant (SO), prolifération/différenciation/ survie cellulaires, apoptose		
		NFκB	Inflammation, Réponse immunitaire, Prolifération cellulaire, Tumorigénèse		
miR-21	10 ; 2,5	PTEN (inhibiteur de PI3k-Akt)	Suppresseur de tumeur, inflammation	Pathologies cardiovasculaires, Cancer, Avortements	(327,329,330,337,338)
		MAPK	Inflammation, stress oxydant, prolifération/différenciation/ survie cellulaires, apoptose		
		JAK/STAT	Inflammation, SO, Prolifération/Survie cellulaires		
		P53	Prolifération cellulaire, Apoptose		
		TGFβ	Développement embryonnaire, Inflammation, Différenciation cellulaire, Réponse immunitaire		
Let-7a	2,5	PTEN (inhibiteur de PI3k-Akt)	Suppresseur de tumeur, inflammation	Pathologies cardiovasculaires et pulmonaires, Cancer, Troubles de la reproduction masculine, Infertilité	(321,328,339)
		MAPK	Inflammation, stress oxydant, prolifération/différenciation/ survie cellulaires, apoptose		
		NFκB	Inflammation, Réponse immunitaire, Prolifération cellulaire, Tumorigénèse		
		JAK/STAT	Inflammation, SO, Prolifération/Survie cellulaires		
		P53	Prolifération cellulaire, Apoptose		
		TGFβ	Développement embryonnaire, Inflammation, Différenciation cellulaire, Réponse immunitaire		

miR-126	2,5	VCAM-1	Inflammation, Réponse immunitaire, Altérations endothéliales	Pathologies cardiovasculaires	(321,327)
		HMGB1/RAGE			
miR-425	10 ; 2,5	MAPK	Prolifération cellulaire, Apoptose, Tumorigénèse	Cancer, pathologies cardiovasculaires et pulmonaires	(328,340)
miR-93	2,5	NFκB	Inflammation, Réponse immunitaire, Prolifération cellulaire, Tumorigénèse	Pathologies hépatiques, rénales et neurodégénératives	(321)
miR-223	2,5	PTEN (inhibiteur de PI3k-Akt)	Suppresseur de tumeur, inflammation	Pathologies cardiovasculaires et pulmonaires, Cancer, Troubles de la reproduction	(321,330)
		NFκB	Inflammation, Réponse immunitaire, Prolifération cellulaire, Tumorigénèse		

En dépit du nombre croissant d'études expérimentales et épidémiologiques portant sur l'impact sanitaire des PM, les données s'intéressant spécifiquement à la fraction ultrafine demeurent, à ce jour, limitées. Cette lacune, qui s'explique en grande partie par les difficultés de suivi et d'échantillonnage de ces dernières, souligne l'importance d'entreprendre des études complémentaires, d'autant plus que leur composition physico-chimique complexe rend leurs mécanismes physiopathologiques de toxicité difficiles à appréhender. L'apport de nouvelles données relatives à la toxicocinétique et à la toxicodynamie de ces dernières s'avèrent donc être nécessaires et indispensables à la compréhension de leur impact biologique sur les organismes vivants. En outre, leur capacité à migrer dans la circulation systémique après inhalation et à atteindre l'ensemble des organes périphériques témoigne de la relevance d'opter pour des approches multi-organes bien que leur cible privilégiée soit l'appareil respiratoire, d'autant plus que des études épidémiologiques ont d'ores et déjà suggérer leur impact métabolique, cardiaque et cérébral en plus de leurs répercussions pulmonaires. Malgré ces conséquences sanitaires potentiellement délétères, les PUF n'entrent pas en tant que telles dans la réglementation actuellement en vigueur. Pourtant, bien qu'elles ne correspondent qu'à une faible masse des $PM_{2,5}$ (*i.e.*, de l'ordre de 1 à 8 %), elles sont, en nombre, très présentes dans la fraction fine des aérosols atmosphériques (*i.e.*, de l'ordre de 90%), ce qui suggère qu'à masse égale, la réactivité de surface et la solubilité des PUF soient supérieures aux particules de diamètre plus important et donc potentiellement plus toxiques après inhalation. Partant de ce constat, il est indéniable que l'apport de nouveaux éléments sur la toxicité des PUF se révèle être essentiel.

Problématique

La pollution atmosphérique, pourtant réduite par rapport aux situations qui prévalaient il y a quelques décennies, exerce encore aujourd'hui des effets néfastes pour la santé de chacun. Bien que son implication dans le développement ou l'exacerbation de diverses pathologies soit désormais mieux connue, il reste très difficile d'identifier précisément le(s) polluant(s) qui en sont à l'origine. Les résultats de nombreuses études expérimentales et épidémiologiques permettent toutefois de discerner la fraction particulaire et notamment les PM_{2,5} comme jouant un rôle clé dans cet impact sanitaire, faute de données à ce jour suffisantes permettant d'établir un lien direct entre l'altération des mécanismes conduisant à ces pathologies et l'exposition aux PUF. En outre, les difficultés de suivi et de prélèvement de ces dernières expliquent pourquoi elles n'intègrent pas la législation actuellement en vigueur. Or, même si elles ne correspondent qu'à une faible masse des PM_{2,5} (*i.e.*, de l'ordre de 1 à 8 %), les PUF sont, en nombre, très présentes dans la fraction fine des aérosols atmosphériques (*i.e.*, de l'ordre de 90%). A masse égale, la réactivité de surface et la solubilité supérieures des PUF laissent augurer une activité biologique plus importante que celles des particules de diamètre aérodynamique équivalent supérieurs, ce qui suggère qu'un même composé serait plus toxique après inhalation sous forme de PUF que de PM₁₀ ou PM_{2,5}. Des recherches sur les effets des PUF, en relation avec leurs caractéristiques physico-chimiques et leurs sources, sont donc nécessaires à l'amélioration des connaissances scientifiques et à l'instauration des mesures de prévention. Néanmoins, les approches épidémiologiques réalisées sur l'impact sanitaire de la pollution atmosphérique se heurtent aujourd'hui à des difficultés liées aux contraintes de mesure précise de l'exposition à l'échelon individuel sur le long terme, la prise en compte des parts relatives des atmosphères intérieures et extérieures, la variabilité interindividuelle ainsi que l'état général de l'individu (*e.g.*, âge, pathologies sous-jacentes) et enfin la complexité physico-chimique et la grande variabilité temporelle des émissions. Des approches globales et systématiques utilisant des modèles *in vivo* sont ainsi nécessaires pour mieux appréhender les bases cellulaires et moléculaires des mécanismes physiopathologiques sous-jacents impliqués dans les effets délétères des PUF. En outre, du fait de leur capacité à migrer profondément dans l'appareil respiratoire, à échapper à la clairance mucociliaire et à transloquer dans la circulation systémique, les PUF peuvent atteindre l'ensemble des organes périphériques, même si leur cible privilégiée reste l'appareil respiratoire. Bien que les PUF soient désormais une réelle préoccupation sanitaire, les données concernant l'impact biologique de ces dernières au sein des organismes après inhalation, non seulement au niveau respiratoire, mais aussi au niveau d'autres organes-cibles, de même que leur toxicocinétique et toxicodynamie restent parcellaires. Afin de mieux appréhender la toxicité des cocktails de polluants, présents généralement à de très faibles concentrations, que représentent les PUF, de définir des valeurs réglementaires de protection, et de guider les programmes de prévention, il est donc urgent de développer des outils d'estimation de l'exposition chronique et/ou cumulée aux PUF ou de l'effet des PUF, en intégrant, de par l'étude des interactions de type gène/environnement, les différences de sensibilité des individus face à ces polluants. À ce titre, les miARN circulants, très stables et hautement conservés entre les espèces, pourraient constituer de bons indicateurs d'exposition et/ou d'effets des PUF.

Ainsi, l'objectif général de ce projet de thèse est d'apporter des éléments originaux et novateurs afin d'accroître la connaissance sur : **(1) les propriétés physico-chimiques et biologiques** des PUF d'origine urbaine, représentatives de celles auxquelles nous sommes exposés **(2) le potentiel oxydant** des PUF et la pertinence de ce dernier au regard des lésions oxydatives observées *in vivo*, **(3) l'impact sur la fonction cognitive**, **(4) la distribution et la persistance** des PUF dans différents organes-cibles (*i.e.*, poumon, cœur, cerveau, foie, reins), **(5) les mécanismes toxicologiques** sous-jacents (*e.g.*, stress oxydant, inflammation, métabolisme mitochondrial, mort cellulaire, voies de signalisation impliquées dans le remodelage tissulaire, les maladies ischémiques, les maladies neurodégénératives, les maladies métaboliques voire la cancérogenèse)

impliqués dans la toxicité organo-spécifique des PUF, (6) l'utilisation des miARN circulants comme indicateurs d'exposition ou d'effets des PUF, susceptibles de refléter l'interaction précoce entre ce facteur environnemental et un organe-cible spécifique (figure 38). Afin de répondre à ces objectifs, des PUF prélevées en milieu urbain sous influence du trafic routier puis caractérisées physiquement et chimiquement, ont été administrées à un modèle murin pendant une période de 90 jours, suivie ou non d'une période de recouvrement (*i.e.*, sans exposition) de 90 jours, en optant pour une approche multi-organe.

Le traitement des échantillons des souris ayant subi une exposition de 3 mois suivie d'une période de recouvrement n'ayant pas encore été effectué pour l'ensemble des paramètres étudiés, seuls les résultats des observations histologiques seront présentés dans ce manuscrit de thèse.

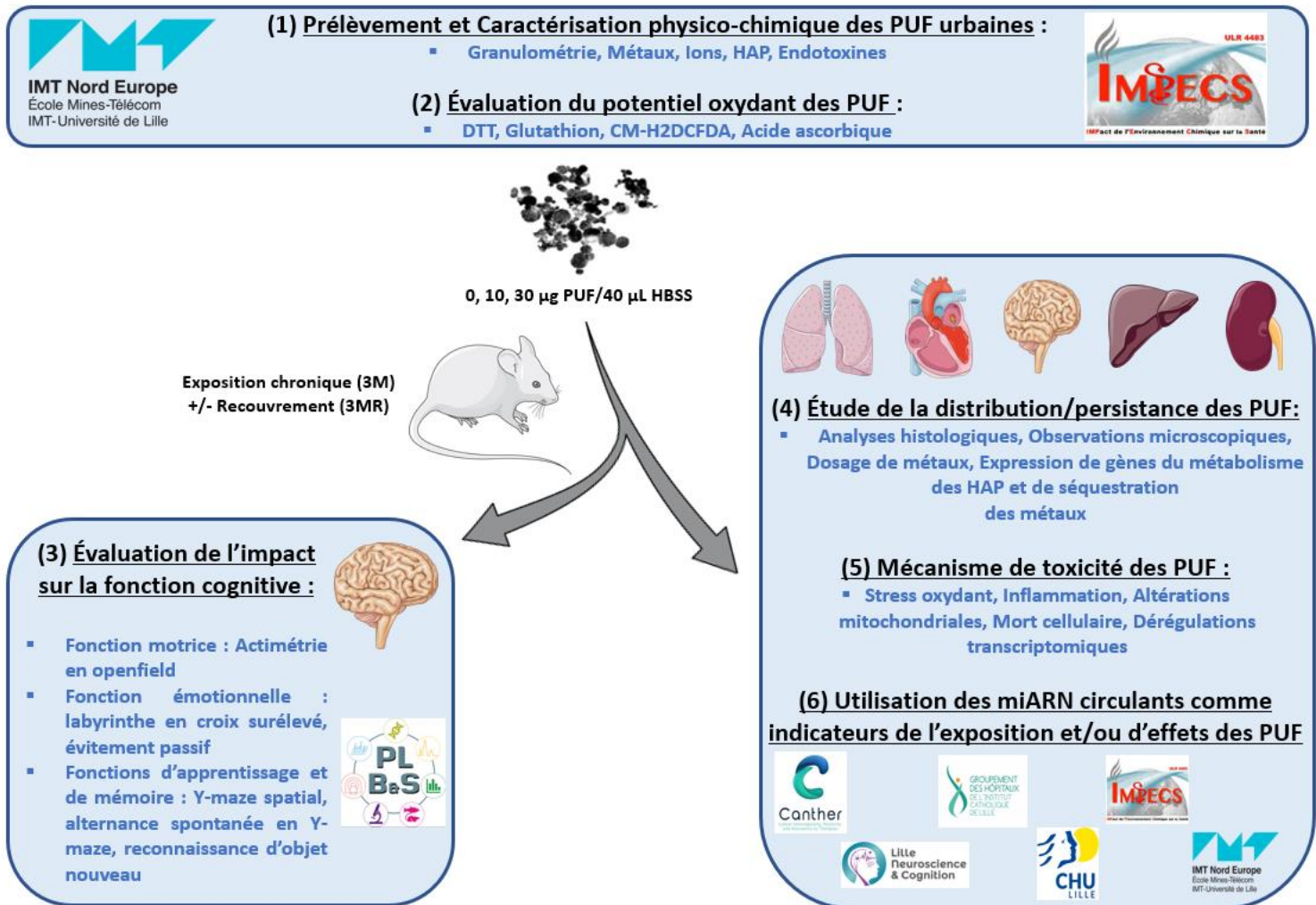


Figure 38 : Objectifs du projet de thèse. Cette figure a été créée à l'aide de Biorender.com

Partie II : Matériels et Méthodes

I. Matériels chimiques

1. Prélèvement des particules

Les particules ultrafines (PUF) utilisées dans le cadre de ce projet ont été prélevées dans la zone urbaine de Lille par le département SAGE (Sciences de l'Atmosphère et Génie de l'Environnement) de l'Institut Mines Télécom (IMT) Nord-Europe, à Douai. La ville de Lille, qui s'étend sur une superficie de 35 km², compte 238 104 habitants selon un recensement réalisé en 2023 par l'Institut National de la Statistique et des Etudes Economiques (INSEE), soit une densité de population de 6800 habitants/ km². Cette dernière est soumise à la pollution atmosphérique issue du trafic routier et transfrontalière et est fréquemment soumise à des épisodes de dépassement des valeurs réglementaires en termes de pollution particulaire. Lille peut donc être considérée comme un candidat de choix, représentatif, pour enquêter sur l'influence de la pollution atmosphérique urbaine avec des sources d'émission caractéristiques liées aux transports, au secteur résidentiel et aux activités tertiaires.

Le site de prélèvement (50.612967, 3.037309), situé sur le toit du bâtiment situé au 1 Avenue Oscar Lambret, est entouré d'immeubles de taille moyenne et situé à moins de 500 mètres d'un grand axe routier (A25) et de la gare du Centre Hospitalier Régional de Lille (figure 39). La campagne de prélèvement a été effectuée durant la période allant du 6 mai 2019 au 27 septembre 2019 à l'aide de deux impacteurs en cascade bas-débit Dekati DGI-1570 (70 L/min) à 4 étages permettant d'accéder à des diamètres de coupure adaptés de 2,5 ; 1 ; 0,5 et 0,2 µm. Les membranes de collecte en polycarbonate, changées deux fois par semaine, ont permis d'échantillonner une quantité suffisante d'environ 40 mg de PUF pour un total de 130 filtres, permettant de réaliser les essais toxicologiques au sein de notre laboratoire. En parallèle, deux impacteurs en cascade à bas-débit Dekati DLPI (30 L/min) comprenant chacun 3 seuils de coupure de 10, 1 et 0,2 µm ont permis de réaliser la caractérisation physico-chimique au sein de l'IMT Nord-Europe à Douai et du laboratoire « Micropolluants technologies » à Saint Julien Les Metz. L'un des impacteurs fut équipé d'une membrane en Téflon permettant les analyses des ions et éléments métalliques, tandis que l'autre fut doté d'une membrane en quartz permettant l'analyse du carbone organique et élémentaire et des HAP. Les échantillons de PUF collectés par impacteurs haut-débit sur l'ensemble des 130 filtres ont été extraits et combinés en un seul échantillon global de PUF dans de l'eau MilliQ, avec une sonde sans contact ultrasonique (Vibracell 75455, 500W, 20 KHz), maintenue à basse température, avant d'être répartis entre l'équipe IMPECS (protocoles d'exposition *in vivo*) et l'équipe SAGE (caractérisation physico-chimique et évaluation du potentiel oxydant).



Figure 39 : Site de prélèvements des particules ultrafines et impacteurs en cascade à haut-débit Dekati DGI-1570.

2. Caractérisation physico-chimique et biologique des PUF

A. Granulométrie

Afin d'analyser leur distribution granulométrique, les PUF collectées dans le cadre de ce projet, celles-ci ont été mises en suspension dans du sérum physiologique stérile à une concentration de 1 mg/mL, à l'aide d'une sonde sans contact Ultrasonic (Vibracell 75455, 500W, 20KHz) maintenue à basse température par circulation d'eau froide. Ces particules ont ensuite été soumises aux ultrasons durant 10 minutes puis agitées afin d'éviter l'agglomération et la sédimentation de ces dernières. Une technique de granulométrie laser, basée sur la mesure de la diffusion dynamique de la lumière par le mouvement brownien des particules, a ensuite été employée. Pour cela, la relation de Stokes-Einstein qui établit une relation proportionnelle entre la vitesse des particules et leur taille, est utilisée. Les petites particules diffuseront ainsi plus vite que les grosses particules. La quantité de lumière diffusée est mesurée à deux reprises durant un intervalle de temps très faible de l'ordre de 100 μ s, permettant l'analyse de l'intensité du mouvement brownien et la déduction de la taille des particules. L'appareil employé pour effectuer ces analyses est le Zetasizer Nano ZS (Malvern©, Worcestershire, Angleterre).

B. Caractérisation physico-chimique

Les analyses des métaux et métalloïdes ont été réalisées en collaboration avec le département SAGE de l'IMT Nord-Europe. Les concentrations de sept éléments majeurs (*i.e.*, Al, Ca, Fe, K, Mg, Na et Si) et d'une trentaine d'éléments traces métallique (*i.e.*, As, Ba, Be, Bi, Cd, Ce, Co, Cr, Cs, Cu, Hg, La, Li, Mn, Mo, Ni, Pb, Pd, Pt, Rb, Sb, Sc, Se, Sn, Sr, Th, Ti, Tl, U, V et Zn) ont ainsi été mesurées en triplicats pour trois sous-échantillons de 200 μ L d'une suspension de PUF ayant une teneur de 1,02 μ g/ μ L, par analyse par spectrométrie de masse à un plasma à couplage inductif ou ICP-MS (NeXion 300x, Perkin Elmer, Waltham, MA, USA). Il s'agit d'une méthode quantitative de haute résolution permettant la détection et la quantification des composants principaux d'un échantillon, mais aussi des éléments présents à l'état de trace. Pour cela, les PUF ont été digérées en conditions acides dans un mélange de réactifs ultrapurs (8 mL HNO₃; 0.5 mL HF; 2 mL H₂O₂), à 200°C pendant 20 minutes dans un four à micro-ondes (Milestone ETHOS, Thermo Fisher Scientific, Courtaboeuf, France) afin de limiter les interférences liées à la présence de aux matières organiques. À la suite d'une étape de nébulisation, la solution est vaporisée et les analytes sont ionisés par la torche à plasma. Enfin, le spectromètre de masse quadripolaire sépare les ions générés en fonction de leur rapport masse/charge.

Le dosage des anions, des cations, du carbone élémentaire et organique a, lui aussi, été réalisé en collaboration avec le département SAGE. Le dosage des anions et cations a ainsi été réalisé par chromatographie ionique tandis que celui du carbone organique et du carbone élémentaire a été effectué par analyses thermiques, respectivement sous atmosphère inerte et sous atmosphère oxydante, avec détection colorimétrique.

Le dosage des HAP, PBDD/F, PCB a, quant à lui, était effectué par le laboratoire « Micropolluants technologies » à Saint Julien Les Metz. Les analyses des HAP ont été réalisées à l'aide d'un système de chromatographie liquide haute pression (HPLC) Waters 2695 Alliance (Waters SA, Saint-Quentin-en-Yvelines, France) couplé à un réseau de photodiodes 996 et un détecteur fluorimétrique 2475. Les polychlorodibenzo-p-dioxines, les furanes (PCDD/F) et les dioxines ont été quantifiés par chromatographie en phase gazeuse à haute résolution/spectrométrie de masse à haute résolution (HRGC/HRMS) après extraction accélérée par solvant.

C. Quantification des endotoxines

Le kit « Pierce™ Chromogenic Endotoxin Quant Kit » (ThermoFisher Scientific, Illinois, USA) utilisant des lysats d'améboocytes dérivés du sang de limule a été employé en suivant scrupuleusement les instructions du fournisseur, afin de quantifier l'endotoxine lipopolysaccharide, composant membranaire des bactéries à gram négatives, dans les échantillons de PUF. Lorsque l'endotoxine est en présence du lysat d'améboocyte, une série de réactions enzymatiques entraîne l'activation du facteur C, du facteur B et de l'enzyme pro-coagulante. L'enzyme activée catalyse la libération de p-nitroaniline (pNA), produisant une couleur jaune. Après avoir arrêté la réaction, la pNA libérée est mesurée par spectrophotométrie à 405 nm. L'absorbance mesurée intensité de la couleur est proportionnelle à la quantité d'endotoxine présente dans l'échantillon de PUF.

3. Évaluation du potentiel oxydant des PUF

La mesure du potentiel oxydant (POTOX) des PUF totales (*i.e.*, fraction particulaire), qui correspond à leur capacité intrinsèque à oxyder des composés chimiques par génération et/ou action d'ERO, a été effectuée par l'intermédiaire de 4 méthodes acellulaires complémentaires : (1) le test d'oxydation par les ERO de la sonde diacétate de 2',7'-dichlorodihydrofluorescéine (CM-H₂DCFDA), (2) le test de déplétion d'un agent réducteur, le dithiothréitol (DTT), dont le taux d'épuisement est proportionnel aux taux de génération d'ERO, (3) la mesure de la consommation de l'ion ascorbate, proportionnelle au taux de génération d'ERO, et (4) la mesure de la déplétion en glutathion réduit (GSH), elle aussi proportionnelle aux taux de génération d'ERO.

Pour l'ensemble de ces tests, des nanoparticules manufacturées de référence certifiées, le dioxyde de titane (TiO₂), l'oxyde de zinc (ZnO) et les NIST 2584 (PM₄, poussières intérieures) ainsi qu'un contrôle positif, le H₂O₂, ont été utilisés en tant que matériaux de référence.

A. Test de déplétion d'un agent réducteur, le Dithiothréitol (DTT)

Le protocole décrit par Crobbedu et ses collaborateurs (2017) a été adapté et employé afin de mesurer l'oxydation progressive du DTT par les PUF (342). Pour cela, le DTT non oxydé est ajouté à du 5,5-dithio-bis-(acide 2-nitrobenzoïque) (DTNB) qui est converti en acide 5-mercapto-2-nitrobenzoïque qui pourra être mesuré par spectrophotométrie. Brièvement, dans une plaque 96 puits, 100 µL d'échantillons de particules (20, 100 et 200 µg/mL, en triplicas) sont incubés pendant 1 h à 37°C avec un volume égal de DTT (400 µM) dilué dans du tampon HEPES dégazé de 30 mM. La plaque est ensuite centrifugée pendant 15 min à 3500 g à 4°C. 100 µL de surnageant de chaque échantillon sont ensuite mélangés à un volume égal de 2,5 mM de DTNB. Pour finir, l'absorbance est mesurée à une longueur d'ondes de 405 nm avec un lecteur de microplaques multimode Spark® (TECAN, Männedorf, Suisse) en utilisant le logiciel "Sparkcontrol Magellan 2.2". Le pourcentage de déplétion du DTT est calculé de la manière suivante : $100 - (\text{concentration en DTT dans l'échantillon} / \text{concentration en DTT dans le blanc}) \times 100$.

B. Test d'oxydation de la sonde CM-H₂DCFDA

Le protocole décrit par Crobbedu et ses collaborateurs (2017), basé sur l'oxydation du diacétate de 6-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescéine (CM-H₂DCFDA) par les ERO produits par les PUF, a été utilisé (342). Il s'agit d'une molécule non fluorescente facilement transformée en forme molécule fluorescente, le vert 20, 7'-dichlorofluorescéine (DCF), lorsque les groupes d'acétate sont éliminés tandis que des phénomènes d'oxydation se produisent dans la cellule. En résumé, la sonde CM-H₂DCFDA est dissoute à une concentration de 0,33 mM dans de l'éthanol absolu, puis activé par incubation avec 10 mM de solution d'hydroxyde de sodium (NaOH) pendant 30 min dans l'obscurité à température ambiante. La solution est

neutralisée avec une solution saline tamponnée de tampon phosphate de Dulbecco (DPBS) 10 X exempt de magnésium et calcium. 100 µL de cette solution diluée au 1/64^{ème} ont ensuite été ajoutés à un volume égal de chaque échantillon de PUF à des concentrations croissantes de 20, 100 et 200 µg/mL (en triplicats) à tester dans une microplaque de 96 puits. La fluorescence générée par la sonde est lue toutes les 5 min pendant 1 heure à une longueur d'onde d'excitation de 485 nm et une longueur d'onde d'émission de 520 nm, à 37°C avec le lecteur de microplaques multimode Spark® (TECAN, Männedorf, Suisse) en utilisant le logiciel "Sparkcontrol Magellan 2.2". Les résultats ont ensuite été exprimés sous la forme du rapport de fluorescence entre les valeurs obtenues pour les échantillons de PUF et les échantillons contrôles pour chaque point temporel.

C. Test de déplétion d'une molécule antioxydante, le glutathion réduit

Le kit « Promega GSH/GSSG-GloTM Assay » a été employé en suivant les instructions du fournisseur, afin de mesurer la déplétion du GSH, en présence des PUF (343). Il s'agit d'un système basé sur la luminescence permettant de détecter et quantifier le glutathion total (GSH + GSSG), le GSSG et de calculer le ratio GSSG/GSH. Les déterminations du GSH et du GSSG sont basées sur la conversion dépendante du GSH d'une sonde, la luciférine-NT, en luciférine par l'enzyme glutathion S-transférase qui est couplée à une luciférase. La lumière émise par la luciférase dépend de la quantité de luciférine formée, qui à son tour dépend de la quantité de GSH présente initialement. Ainsi, le signal luminescent est proportionnel à la quantité de GSH présent dans l'échantillon. Dans un premier temps, cette réaction est utilisée pour mesurer le glutathion total. Pour cela, un agent réducteur est ajouté pour convertir le GSSG en GSH. Dans un second temps, la réaction est utilisée pour mesurer uniquement la forme oxydée GSSG. Dans ce cas, on ajoute un réactif qui bloque l'ensemble du GSH initialement présent tout en laissant le GSSG intact est ajouté. Cette étape de blocage est suivie d'une étape de réduction qui convertit le GSSG en GSH pour en permettre la quantification.

D. Test de déplétion d'une molécule antioxydante, l'ascorbate

Le protocole décrit par Janssen et son équipe (2014), consistant à mesurer la concentration en ascorbate en présence de PM_{2,5} sur une cinétique de 30 min, a été employé (344). Ainsi, si les PUF sont oxydantes, alors la concentration en ascorbate diminuera dans le temps au fur et à mesure de son oxydation. Cette cinétique de diminution est suivie par mesure de l'absorbance à la longueur d'onde de 265 nm. C'est donc la vitesse initiale d'oxydation qui est suivie, cette dernière correspondant à la pente de la droite qui représente la « concentration en acide ascorbique en fonction du temps ». Brièvement, dans une microplaque 96 puits transparente aux ultraviolets, déposer 180 µL d'échantillons puis y ajouter 20 µL d'acide ascorbique à 2 mM. L'absorbance est ensuite lue à la longueur d'onde de 265 nm toutes les 5 min pendant 1 h, à 37°C avec le lecteur de microplaques multimode Spark® (TECAN, Männedorf, Suisse) en utilisant le logiciel "Sparkcontrol Magellan 2.2".

II. Modèle murin

Des souris Balb/cJrj mâles (n = 120, 36 souris/groupe) initialement âgées de 10 semaines, pesant en moyenne 30 grammes et de statut sanitaire « specific opportunistic and pathogen free » (SOPF) selon la liste proposée par la « Federation of European Laboratory Science Associations » (FELASA) ont été utilisées dans le cadre de ce projet. Ce modèle murin, fourni par la société Janvier-Labs, a été décrit comme un modèle moyennement sensible au développement des pathologies et notamment des cancers en réponse à un stress chimique, ce qui la rend représentative de la sensibilité moyenne des individus (345). Cette spécificité explique pourquoi ce modèle est très largement utilisé pour les études de toxicologie des particules notamment en termes de cancérogénèse. Ces animaux ont été hébergés au nombre de 6 par cage, dans l'animalerie high-tech exempte

d'organismes pathogènes spécifiques (EOPS) de la Faculté de médecine de Lille - Pôle recherche (Agrément n°A59-35015). Un cycle jour/nuit comprenant 12 heures de luminosité et 12 heures d'obscurité et une alimentation *ad libitum* ont été initiés. Après une période d'acclimatation à leur nouvel environnement d'une durée d'une semaine, les expositions des souris ont débutées. Un examen clinique quotidien ainsi qu'une surveillance pondérale hebdomadaire des animaux furent réalisés durant toute la période de traitement ; une attention particulière a notamment été portée à l'apparition de signes de douleur chez les animaux. Toutes les procédures d'expérimentation animale ont été approuvées par le comité d'éthique local (Approval number : APAFIS#22734-201906070931570v4) et autorisées par le ministère en charge de l'enseignement supérieur et de la recherche.

III. Protocole d'exposition

Après une anesthésie légère à l'isoflurane (Zoétis, Malakoff, France) (induction à 2,5%, maintien à 1%, débit d'air : 1L/min), 120 souris mâles Balb/cJRj (n = 36 souris/groupe) ont reçu par instillation intranasale 40 µL de sérum physiologique stérile (groupe témoin), ou différentes doses (10 ou 30 µg) de PUF urbaines en suspension dans 40 µL de sérum physiologique stérile, à raison de 2 expositions par semaine pendant 12 semaines (90 jours) en prenant soin d'alterner entre chaque narine, pour un total de 24 instillations intranasales (figure 40). Un groupe « contrôle » composé de 12 souris qui n'ont été ni anesthésiées ni instillées a également été mis en place afin d'étudier une potentielle influence de l'anesthésiant. Afin de limiter la formation d'agrégats particulaires, les suspensions de PUF ont été préalablement traitées par ultrasons pendant 10 2 minutes avant d'être administrées aux animaux. Les souris ont ensuite été sacrifiées 24h après la dernière exposition ou à la suite d'une période de 90 jours de recouvrement (*i.e.*, sans exposition).

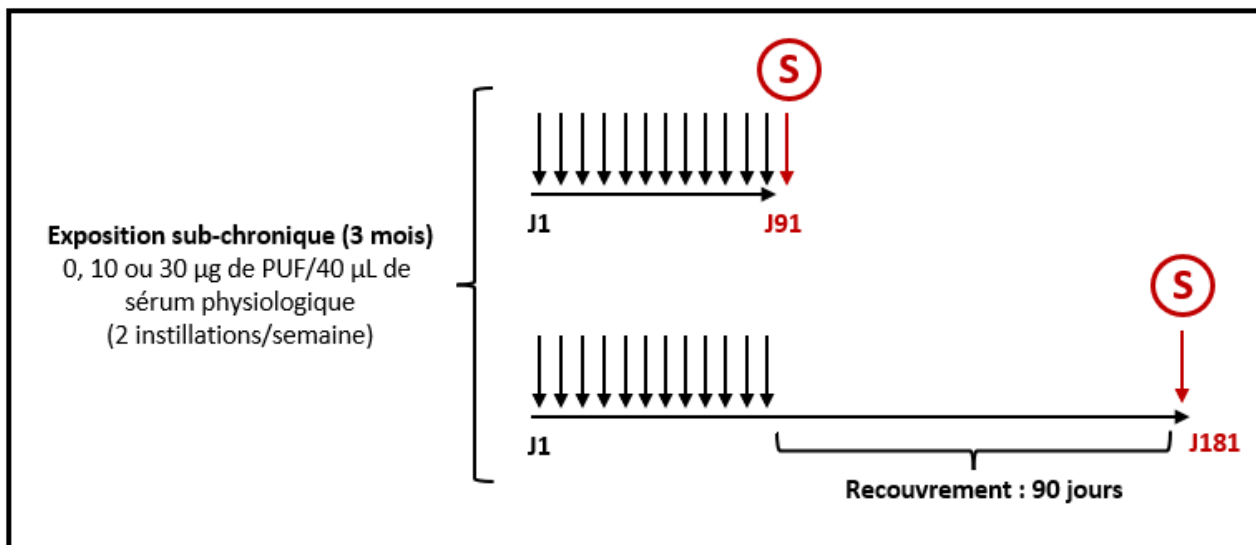


Figure 40 : Protocoles d'exposition sub-chronique des souris, avec ou sans période de recouvrement (S : Sacrifice).

IV. Tests comportementaux

Les souris qui n'ont pas été sacrifiées à la suite des 12 semaines d'exposition ($n = 12/\text{groupe}$, pour un total de 36 souris) ont été soumises à différents tests comportementaux cherchant à évaluer les fonctions motrice, émotionnelle, d'apprentissage et de mémoire.

i. Fonction motrice

Un test d'**actimétrie en open-field** a été réalisé, afin d'évaluer l'activité locomotrice spontanée en champ ouvert par détection infra-rouge. Ce test, qui repose sur la tendance naturelle du rongeur à explorer un environnement nouveau, permet d'évaluer l'activité générale du rongeur, les mouvements locomoteurs et stéréotypés ainsi que la posture debout ou d'exploration (figure 41). Le système BIOSEB – LE8816 (Vitrolles, France) employé est constitué d'une arène carrée de 22 x 22 cm à 2 dimensions, comptant 16x16 faisceaux infra-rouges de détection. À la suite d'une période d'acclimatation à la pièce d'une durée d'une heure, chaque souris est placée individuellement pendant 10 minutes dans l'arène, sous une faible intensité lumineuse de 20 lux. Les mouvements de l'animal sont enregistrés pendant l'entièreté du test. L'analyse des données générées est réalisée à l'aide du logiciel « Actitrack », qui permet de mesurer divers paramètres : vitesse (minimale, maximale, moyenne), distance parcourue, nombre de redressements, type de déplacement (activité lente/rapide, période de repos), distinction des zones explorées (périphérie, centre de l'arène). Afin de limiter la persistance d'odeurs potentiellement anxiogènes, l'arène est nettoyée à l'éthanol 70% après chaque passage de souris.

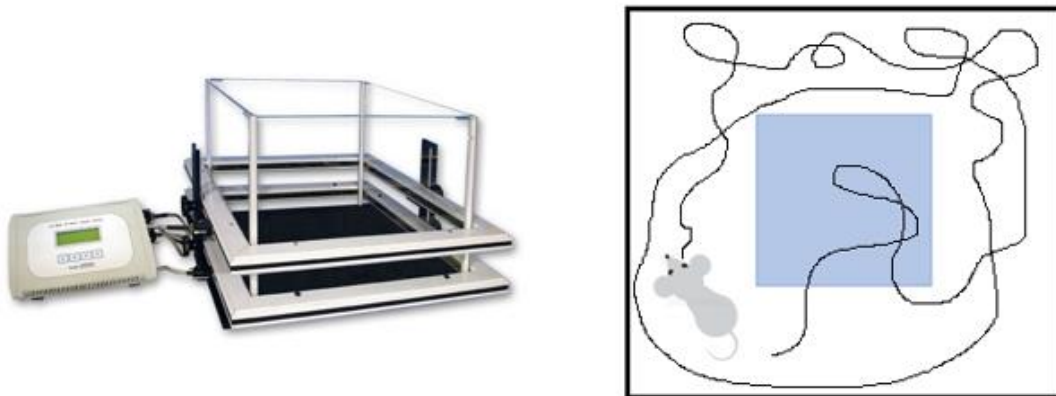


Figure 41 : Dispositif d'actimétrie (à gauche) et schéma représentatif du test d'actimétrie (à droite).

ii. Fonction émotionnelle

Dans un premier temps, un test du **labyrinthe en croix surélevé** (*i.e.*, « Elevated Plus Maze », EPM) a été réalisé (figure 42). Ce dernier consiste à évaluer le comportement anxieux du rongeur et repose sur la préférence de l'animal pour les endroits clos et sombres, comparativement aux endroits ouverts et éclairés (346). Ainsi, plus le rongeur est anxieux, plus il passera de temps dans les bras fermés. Le dispositif employé est constitué d'un plancher infra-rouge Viewpoint (Behavior Technology, Lyon, France), d'un labyrinthe en croix en plexiglas et d'un système de suivi vidéo Ethovision XT 14 (Noldus, Information Technology, Wageningen, Pays-Bas). Le labyrinthe en croix est lui-même composé de deux bras ouverts en opposition et de deux bras fermés, dont l'intersection forme « la zone centrale » d'où débutera le test. À la suite d'une période d'acclimatation à la pièce d'une durée d'une heure, chaque souris est placée individuellement pendant 10 minutes dans le labyrinthe, sous une intensité lumineuse de 150 lux dans les bras ouverts et de 40 lux dans les bras fermés. Les paramètres mesurés par le logiciel sont le nombre d'entrée et le temps passé dans le compartiment clair (*i.e.*, bras ouverts). Le dispositif est nettoyé à l'éthanol 70 % entre chaque animal, puis à l'Anios à la fin de l'expérience.

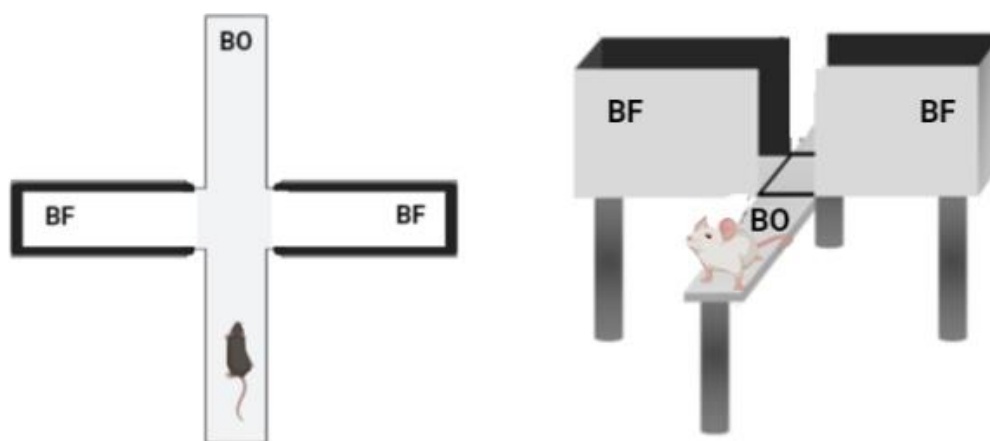


Figure 42 : Dispositif de labyrinthe en croix surélevé (BF : Bras Fermé, BO : Bras Ouvert).

Dans un second test, un test d'**évitement passif** a été effectué (figure 43). Ce dernier permet d'évaluer la mémoire à long terme conditionnée par la peur qui correspond à la mémoire émotionnelle. Ce test repose sur la tendance naturelle d'un rongeur à préférer un endroit sombre à un endroit éclairé. Le système BIOSEB – LE872 (Vitrolles, France) employé est constitué d'un grand compartiment éclairé, d'un petit compartiment sombre et de capteurs de poids permettant de détecter efficacement la position du rongeur. Les cages de souris ne se trouvent pas dans la pièce où est effectué le test afin de limiter le stress de ces dernières. Ce dernier se déroule en deux étapes distinctes, réalisées à 24 heures d'intervalle. La première est la phase d'acquisition d'une durée maximale de 1 min 30 durant laquelle le rongeur est placé dans le compartiment éclairé (*i.e.*, 3000 lux) de façon à le laisser explorer librement l'appareil. Après 10 sec, la porte séparant le compartiment sombre du compartiment éclairé s'ouvre. Une fois entrée spontanément dans le compartiment sombre, l'animal reçoit un léger choc électrique (latence = 2 sec, durée = 2 sec, intensité = 0,3 mA) au niveau des pattes. Si l'animal n'est pas entré dans le compartiment sombre dans ce délai, il est exclu de l'étude. La deuxième étape, qui se déroule 24 heures après l'étape d'acquisition, est la phase de rétention d'une durée maximale de 5min. L'animal ayant associé l'entrée dans le compartiment sombre au choc ressenti devrait avoir une latence pour

y retourner généralement grandement augmentée. Ainsi, le paramètre mesuré est la latence d'entrée dans le compartiment sombre. Le dispositif est nettoyé à l'éthanol 70 % entre chaque animal.



Figure 43 : Dispositif d'évitement passif (à gauche) et schéma représentatif du test d'évitement passif (à droite).

iii. Fonctions d'apprentissage et de mémoire

Dans un premier temps, le test du **Y-maze spatial** a été réalisé (figure 44). Il s'agit d'un labyrinthe en Y qui permet d'évaluer la mémoire de référence spatiale de l'animal. L'intensité lumineuse au centre des 3 bras est de 20 lux. À la suite d'une période d'acclimatation à la pièce d'une durée d'une heure, la phase d'acquisition d'une durée de 10 min durant laquelle la souris a libre accès à 2 des 3 bras peut débuter. Après un intervalle de temps de 10 min, la souris est replacée dans le labyrinthe et a libre accès aux 3 bras pendant 5 min. Le test est fondé sur la préférence de l'animal pour la nouveauté, en l'occurrence le bras inexploré auparavant. Le dispositif employé est constitué d'un labyrinthe en forme de Y en PVC blanc composé de 3 bras mesurant L30 x 18 x H15 cm, disposés en angle égaux de 120°, de repères visuels spatiaux extra-labyrinthe et d'un système de suivi vidéo Ethovision EVXT 13 (Noldus, Information Technology, Wageningen, Pays-Bas). Les paramètres mesurés par le logiciel sont le nombre d'entrées et le temps passé dans les différents bras ainsi que le ratio d'exploration du bras nouveau par rapport au cumul bras nouveau et bras familiers. Le dispositif est nettoyé à l'éthanol 70 % entre chaque animal, puis à l'Anios à la fin de l'expérience.

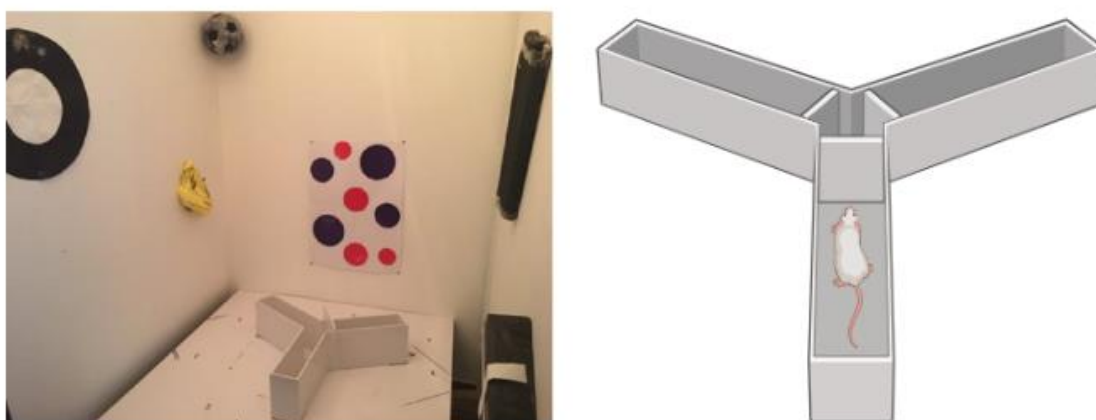


Figure 44 : Dispositif du Y-maze spatial (à gauche) et Schéma représentatif du test Y-maze spatial (à droite).

Dans un second temps, un test d'**alternance spontanée en Y-maze** a été effectué. Ce dernier se déroule dans un labyrinthe en forme de Y en polychlorure de vinyle blanc, composé de 3 bras de dimensions L30 x 18 x H15 cm disposés en angles égaux de 120° et d'un système de suivi vidéo Ethovision XT 14 (Noldus, Information Technology, Wageningen, Pays-Bas). L'intensité lumineuse au centre des 3 bras est de 40 lux. Ce test, d'une durée de 8 min, permet d'évaluer la mémoire de travail qui consiste à retenir à court terme une information et l'utiliser immédiatement pour exprimer un comportement approprié. Quand l'animal est placé dans le labyrinthe, il explore spontanément le bras le moins récemment visité, et montre un haut degré d'alternance des visites des trois bras. Pour ce faire, il utilise la mémoire de travail qui consiste à mémoriser les bras les plus récemment visités et à renouveler continuellement cette information. Une alternance correspond donc à la succession des trois bras dans un triplet de visites. Plus ce score est élevé, plus il témoigne d'une bonne capacité de la mémoire de travail de l'animal. Le paramètre mesuré est ainsi le score d'alternance qui correspond au nombre d'alternances / (nombre total de visites – 2) x 100. Les souris ayant réalisé moins de 10 visites dans les bras sont exclues du test. Le dispositif est nettoyé à l'éthanol 70 % entre chaque animal, puis à l'Anios à la fin de l'expérience.

Dans un troisième temps, un test de **reconnaissance d'objet nouveau** (*i.e.*, « Novel Object Recognition », NOR) a été réalisé, permettant de tester la mémoire épisodique chez le rongeur (figure 45). Il étudie l'intérêt que va porter l'animal à des objets nouveaux dans un environnement connu par rapport à des objets déjà présents dans la zone de test auparavant. Le système NOLDUS (Information Technology, Wageningen, Pays-Bas) employé est constitué de 4 arènes carrées de 50 x 50 cm chacune, permettant le passage simultané de 4 souris, et d'un système d'acquisition Ethovision EXVT11.5 (Noldus, Information Technology, Wageningen, Pays-Bas). L'intensité lumineuse est de 30 lux au centre de chaque arène. Ce test se déroule sur 3 jours consécutifs. Le premier jour, une phase d'habituation à l'arène sans objet, d'une durée de 10 min, est réalisée. Le jour suivant, une deuxième phase d'habituation de 10 min avec deux objets identiques est réalisée. Enfin, le 3ème jour, la souris est placée pendant 15 min dans l'arène contenant deux objets identiques mais différents de ceux vus la veille (*i.e.*, phase d'acquisition). Si la souris n'a pas exploré les 2 objets pendant au moins 20 sec pendant les 15 min d'acquisition le jour du test, elle est exclue du teste l'étude. Après un intervalle de temps d'une heure, le rongeur est de nouveau placé pendant 5 min dans l'arène contenant un objet familier et un objet nouveau (*i.e.*, phase de rétention). Le paramètre mesuré par le logiciel est le temps d'exploration de l'objet nouveau par rapport à l'objet familier. Le dispositif est nettoyé à l'éthanol 70 % entre chaque animal, puis à l'Anios à la fin de l'expérience.

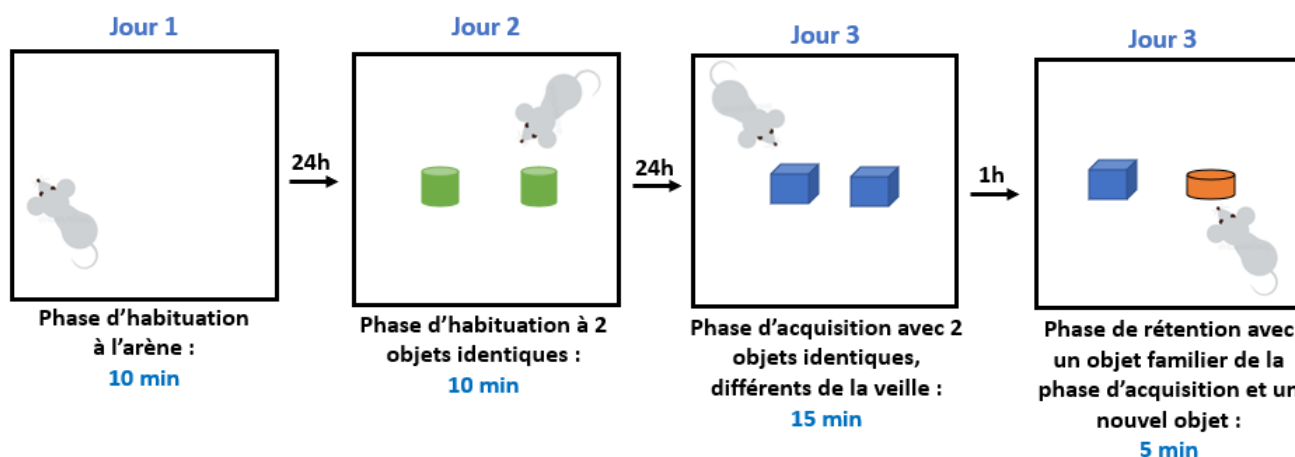


Figure 45 : Schéma représentatif du test de reconnaissance d'objet nouveau en 3 phases : habituation, acquisition et rétention.

V. Prélèvement des échantillons biologiques

24 heures après la dernière exposition ou à la suite des 3 mois de recouvrement (*i.e.*, absence d'exposition), les souris ont été soumises à une anesthésie générale sans réveil par injection intrapéritonéale de 200 µL d'un mélange constitué d'un sédatif analgésique, la Xylazine (10 mg/kg) et d'un anesthésique dissociatif, la Kétamine (100 mg/kg). Une première série de souris (n = 6/groupe) a été dédiée à l'étude de la distribution et la persistance des PUF dans les organes-cibles (*i.e.*, analyses histo- et cytopathologiques, de même que les observations en microscopie électronique). Une seconde série de souris (n = 6/groupe) a été dédiée à l'étude des mécanismes physiopathologiques sous-jacents (*i.e.*, stress oxydant, inflammation, métabolisme mitochondrial, mort cellulaire). Enfin, une troisième série de souris (n = 12/groupe) a été dédiée à l'étude des voies de signalisation activées (interactions miRNA/mRNA) et des miARN circulants. Un prélèvement sanguin sous-mandibulaire a ensuite été effectué sur tubes Microvette® APT 250 EDTA (Sarstedt, Nümbrecht, Allemagne) afin de préparer du sérum en limitant l'hémolyse en vue de l'étude des miARN circulants. Des lavages broncho-alvéolaires (LBA) ont été réalisés avant de procéder aux sacrifices des souris. Pour cela, 2 x 0,5 mL de PBS stérile (ThermoFisher Scientific, Illkirch, France) ont été injectés dans leurs poumons après avoir infiltré un cathéter dans la trachée des souris, puis le liquide a été réaspiré à deux reprises avant d'être centrifugé. Une laparotomie et une thoracotomie ont ensuite été réalisées avant d'effectuer une exsanguination par prélèvement intracardiaque. Enfin, les poumons, le cœur, les reins, le foie et le cerveau ont été prélevés et conservés dans des conditions optimales jusqu'à la réalisation des analyses biologiques présentées dans le tableau 24.

Ainsi, afin de pouvoir réaliser des extractions d'acides nucléiques, une partie de chaque organe a été conservée dans 2 mL de RNA later (Ambion, ThermoFisher Scientific, Illkirch, France), conservée 48h à 4°C puis congelés à -20°C selon les instructions du fournisseur. Une autre partie destinée aux extractions protéiques a, quant à elle, été congelée à sec dans de l'azote liquide avant d'être conservée à -80°C. Enfin, une autre partie a été conservée dans du glutaraldéhyde 2,5%, le fixateur utilisé pour la microscopie. Une autre série de souris (n = 6/ groupe) a aussi été utilisée afin de réaliser des analyses histologiques. Après perfusion corps entier de l'animal anesthésié par une solution d'héparine puis de paraformaldéhyde « Antigenfix » (Diapath, Martinengo, Italie), les organes ont été fixés par immersion dans une solution de Formalin 4 % pendant une nuit, puis déshydratés et ont ensuite été enrobés dans de la paraffine afin de pouvoir réaliser des coupes fines et ultrafines régulières à l'aide d'un microtome.

Tableau 24 : Tissus, matrices, stockage et volets d'étude utilisés pour les approches toxicologiques.

Tissus	Matrices	Stockage	Paramètres d'études
Sang	Sang total	-80°C	Métaux, Stress oxydant
	Plasma	-80°C	Stress oxydant, Inflammation, miARN circulants
LBA	Fluide	-80°C	Inflammation
	Culots	+4°C	Cellularité
Organes (<i>i.e.</i> , poumons, cœur, cerveau, foie, reins)	Tissus fixés et inclus	+ 4°C	Histo- et cytopathologies, M.E.T
	Tissus	-80°C	Métaux, Stress oxydant, Inflammation, métabolisme mitochondrial, type de mort cellulaire (<i>e.g.</i> , ferroptose), voies de signalisation
	Tissus	+4°C	Métabolisme mitochondrial
	Tissus (RNAlater™#)	-20°C	miARN, ARNm

VI. Étude de la toxicité des PUF

1. Évaluation de la distribution des PUF

A. Observations microscopiques

i. Observations en microscopie photonique

Le LBA recueilli (2 x 0,5 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 µL d'éthanol 50 %. 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, MGG (Sigma Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) afin d'y observer la présence possible d'un infiltrat inflammatoire ainsi que la présence de PUF dans les macrophages alvéolaires.

ii. Observations en microscopie électronique à transmission

Le lobe droit des poumons, la moitié d'un cœur et la moitié d'un cerveau de 3 souris par groupe ont été fixés pendant 2 heures avec du glutaraldéhyde à 2,5 % dans du tampon cacodylate 0,1 M (pH 7,2) avant d'être mis dans du glutaraldéhyde à 0,6 %. Les organes ont ensuite été lavés trois fois avec du cacodylate 0,1 M, pH 7,2 pendant 20 min chacun, suivi d'une post-fixation dans du tétroxyde d'osmium à 1% pendant 1 heure. Les échantillons ont ensuite été lavés trois fois avec de l'eau ultra pure pendant 5 min chacun. La déshydratation a été réalisée dans une série d'incubation avec des concentrations croissantes d'éthanol comme suit : 4 x 10 min d'éthanol à 70 %, 3 x 20 min d'éthanol à 95 %, 3 x 20 min d'éthanol à 100 %, puis 2 x 15 min dans une solution d'oxyde de propylène (C₃H₆O). Les échantillons ont ensuite été incubés pendant 2 x 30 min dans un mélange 1:1 d'Epon et d'oxyde de propylène, suivi d'une incubation d'une nuit dans de l'Epon, avant d'être incubés à 60°C pendant 24 heures. Les coupes (85 nm) ont été réalisées et colorées avec de l'acétate d'uranyle (2 % v/v) et du citrate de plomb Reynolds avant d'être examinées en MET.

B. Étude du profil métallique tissulaire et sanguin

Afin d'effectuer un contrôle biologique de l'exposition aux PUF, les concentrations de sept éléments majeurs (*i.e.*, Al, Ca, Fe, K, Mg, Na et Si) et d'une trentaine d'éléments traces métallique (*i.e.*, As, Ba, Be, Bi, Cd, Ce, Co, Cr, Cs, Cu, Hg, La, Li, Mn, Mo, Ni, Pb, Pd, Pt, Rb, Sb, Sc, Se, Sn, Sr, Th, Ti, Tl, U, V et Zn) ont été mesurées en triplicats sur des échantillons de sang ou des biopsies des différents organes (poumons, cœur, foie, reins et cerveau) broyés dans 1 mL d'eau ultrapure par ICP-MS (NeXion 300x, Perkin Elmer, Waltham, MA, USA). Une normalisation des valeurs acquises a ensuite été réalisée à partir de la concentration en protéines totales respective de chaque échantillon, obtenue à l'aide du kit Pierce™ BCA Protein Assay Kit (ThermoFisher Scientific, Illkirch, France).

C. Mesure de l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme des HAP et la séquestration des métaux

L'expression des gènes du récepteur à l'*AhR*, des cytochromes *Cyp1a1*, *Cyp1b1*, et des métallothionéines *Mt1*, *Mt2*, *Mt3* et *Mt4* de la matrice extracellulaire a été quantifiée par PCR (Polymerase Chain Reaction) quantitative en temps réel (tableau 25). Cette dernière permet de déterminer le niveau d'expression de gènes cibles et leur comparaison en fonction des paramètres d'exposition testés. Plusieurs étapes sont nécessaires : (1) Extraction des ARN (AllPrep DNA/RNA/miRNA Universal Kit, QIAGEN), (2)

Rétrotranscription (RT) des ARNm en ADN complémentaire (ADNc) et (3) Amplification et quantification des ADNc.

Tableau 25 : Liste des amorces utilisés pour étudier le métabolisme des HAP et la séquestration des métaux.

Gène	Référence (ThermoFisher Scientific)
<i>AhR</i>	Mm00478932_m1
<i>Cyp1a1</i>	Mm00487218_m1
<i>Cyp1b1</i>	Mm00487229_m1
<i>Mt1</i>	Mm00496660_g1
<i>Mt2</i>	Mm00809556_s1
<i>Mt3</i>	Mm07297185_m1
<i>Mt4</i>	Mm00485227_m1
<i>Ppia</i>	Mm02342430_g1

La chimie TaqMan® utilisée repose sur l'utilisation d'un couple d'amorces et d'une sonde fluorogénique spécifiques de chaque gène cible. Les ARN totaux ont été extraits à partir des tissus conservés dans le RNA later. Une masse de 20 à 25 mg de chaque organe a été broyée dans 600 µL de tampon RLT Plus supplémenté par du β-mercaptoéthanol, à l'aide du GentleMACS Dissociator (Miltenyi Biotec). Les ARN totaux ont ensuite été extraits à l'aide de l'automate QIAcube (Qiagen) en suivant les instructions du kit « AllPrep DNA/RNA/miRNA Universal kit » (Qiagen). Ce protocole contient une étape de digestion à la protéinase K qui permet d'optimiser le rendement d'extraction et de purifier des acides nucléiques ainsi qu'une étape de digestion à la Dnase I éliminant toute trace d'ADN génomique résiduel lors de l'extraction des ARN. Les ARN totaux ont ensuite été dosés par analyse spectrophotométrique sur le lecteur de microplaques multimode Spark® (TECAN, Männedorf, Suisse). Puis, la rétrotranscription (RT) des ARNm en ADNc a été réalisée en suivant les instructions du kit « high capacity cDNA reverse transcription » (Applied Biosystems). Des qPCR en temps réel ont ensuite été réalisées en employant le TaqMan™ Fast advanced Master MIX (Applied Biosystems) ainsi que des sondes et des amorces Taqman™ le dans le but de quantifier l'expression de gènes d'intérêt. Le gène de ménage *Ppia* (Peptidylprolyl Isomerase A, Mm02342430_g1) a été utilisé afin de normaliser les résultats obtenus. Les ARNm sont mis en évidence lorsqu'ils sont surexprimés ou sous-exprimés significativement, après normalisation par l'expression de ce gène de ménage, avec une valeur seuil à 2 (Fold-Change ou FC > 2 ou < 2).

2. Mesure de marqueurs biologiques du stress oxydant

A. Étude des défenses antioxydantes

i. Étude de la voie de signalisation NRF2

- **Mesure de l'activité de fixation à l'ADN du facteur de transcription Nrf2 par spectrophotométrie** (347) : Ce test ELISA (« TransAM™ NRF2 », Active Motif, La Hulpe, Belgique), réalisé selon les instructions du fournisseur, cherche à étudier la liaison de ce facteur de transcription à une séquence consensus immobilisée sur une microplaque à 96 puits. Pour cela, un extrait nucléaire activé est ajouté à chaque puit et le facteur de transcription d'intérêt se lie spécifiquement à cet oligonucléotide lié. Un anticorps primaire spécifique de la protéine Nrf2 est ensuite ajouté pendant 1 heure, puis le complexe est incubé pendant 1 heure avec un anticorps secondaire conjugué à une peroxydase. Un substrat incolore est alors ajouté et convertit en un produit chromogène, pour obtenir une lecture colorimétrique sensible et facilement

quantifiable, dont l'absorbance est mesurée à 450 nm l'aide du lecteur de microplaques multimode Spark® (TECAN, Männedorf, Suisse).

Étude de l'expression génique de NRF2 Nrf2 et de ses gènes cibles par RT-qPCR (348) : L'expression génique de *Nrf2* et de certains de ses gènes cibles, à savoir *Keap1*, *Hmox1*, *Txn1*, *Sod1*, *Nqo1*, *Gpx1*, *Gsr*, *Gclc*, *Gclm*, *Mgst1*, 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) (tableau 26). Les résultats sont rapportés par rapport à l'expression du gène de ménage *Ppia*. Les ARNm sont mis en évidence lorsqu'ils sont surexprimés ou sous-exprimés significativement, après normalisation par l'expression de ce gène de ménage avec une valeur seuil à 2 (Fold-Change ou FC > 2 ou < 2).

Tableau 26 : Liste des amorces utilisés pour étudier la voie de signalisation NRF2.

Gène	Référence (ThermoFisher Scientific)
<i>Gclc</i>	Mm00802655_m1
<i>Gclm</i>	Mm013224400_m1
<i>Gpx1</i>	Mm00656767_g1
<i>Gsr</i>	Mm00439154_m1
<i>Hmox1</i>	Mm00516005_m1
<i>Keap1</i>	Mm00497268_m1
<i>Mgst1</i>	Mm00498294_m1
<i>Nrf2</i>	Mm00477784_m1
<i>Nqo1</i>	Mm01253561_m1
<i>Ppia</i>	Mm02342430_g1
<i>Sod1</i>	Mm01344233_g1
<i>Txn1</i>	Mm00726847_s1

➤ **Analyse d'activités enzymatiques par colorimétrie :**

- Mesure de l'activité enzymatique de la **Catalase** (« Catalase Assay kit », Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) (349) : Cette enzyme est capable de catalyser la dégradation du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) en eau et dioxygène. Ainsi ce test, réalisé en suivant les instructions du fournisseur, est basé sur la mesure de l'absorbance à 520 nm du H₂O₂ restant après action de la CAT présente dans nos échantillons à l'aide du lecteur de microplaques multimode Spark® (TECAN, Männedorf, Suisse). Une normalisation des valeurs acquises a ensuite été réalisée à partir de la concentration en protéines totales respective de chaque échantillon, obtenue à l'aide du kit Pierce™ BCA Protein Assay Kit (ThermoFisher Scientific, Illkirch, France).
- Mesure de l'activité de la **Glutathion peroxydase (GPx)** (« Glutathione Peroxidase Cellular Activity Assay Kit », Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) (350) : Cette enzyme catalyse la réduction des peroxydes en alcools en utilisant dGSH comme agent réducteur. Le GSSG produit est ensuite réduit en GSH par la GR en utilisant du NADPH comme cofacteur. Il est ainsi possible de mesurer la décroissance de l'absorbance à 340 nm durant l'oxydation du NADPH en NAD⁺, reflétant l'activité de la GPx.

- Mesure de l'activité de la **Glutathion réductase (GR)** (« Glutathione Reductase Assay Kit », Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) (351) : Cette enzyme catalyse la réduction du GSSG en GSH en utilisant du NADPH comme cofacteur. Ainsi ce test, réalisé en suivant les instructions du fournisseur, est basé sur la mesure de l'augmentation de l'absorbance à 340 nm, causée par la réduction du DTNB préalablement ajouté, par le GSH formé.
 - Mesure de l'activité de la **Glutathion S-transférase (GST)** (« Glutathione S-Transferase (GST) Assay Kit », Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) (352) : Cette enzyme catalyse la conjugaison du groupement thiol du glutathion réduit avec les xénobiotiques électrophiles. En ajoutant du 1-Chloro-2,4-dinitrobenzène (CDNB), celui-ci va se coupler au thiol du glutathion sous l'action de la GST et il y aura une augmentation de l'absorbance à 340 nm qui pourra être mesurée, en suivant les instructions du fabricant.
 - Mesure de l'activité de la **NAD(P)H déshydrogénase quinone 1 (NQO1)** (« NQO1 activity assay kit – ab184867 », Abcam, Cambridge, Royaume-Uni) (353): Cette enzyme est une quinone réductase contenant de la flavine qui catalyse la réduction des quinones en hydroquinones en utilisant soit le NADH soit le NADPH comme donneurs d'électrons. L'activité enzymatique est ainsi déterminée en suivant la réduction de la Ménadione avec le cofacteur NADH et la réduction simultanée de WST1, ce qui entraîne une augmentation de l'absorbance à 440 nm qui peut être mesurée à l'aide du lecteur de microplaques multimode Spark® (TECAN, Männedorf, Suisse), en suivant les instructions du fournisseur. Une normalisation des valeurs acquises a ensuite été réalisée à partir de la concentration en protéines totales respective de chaque échantillon, obtenue à l'aide du kit Pierce™ BCA Protein Assay Kit (ThermoFisher Scientific, Illkirch, France).
 - Mesure de l'activité de la **Superoxyde Dismutase (SOD)** (« SOD Determination Kit », Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) (354) : Cette enzyme catalyse la réduction des anions superoxydes en oxygène et peroxyde d'hydrogène. Ce test, réalisé en suivant les instructions du fournisseur, utilise un sel de tétrazolium, le WST-1, qui produit un colorant formazan par réduction avec un anion superoxyde. Ce taux de réduction est linéairement lié à l'activité de la xanthine oxydase (XO) qui est inhibée par la SOD. Ainsi, l'activité d'inhibition de la SOD est déterminée mesure de l'absorbance à 450 nm à l'aide du lecteur de microplaques multimode Spark® (TECAN, Männedorf, Suisse). Une normalisation des valeurs acquises a ensuite été réalisée à partir de la concentration en protéines totales respective de chaque échantillon, obtenue à l'aide du kit Pierce™ BCA Protein Assay Kit (ThermoFisher Scientific, Illkirch, France).
- **Mesure de l'expression de protéines d'intérêt impliquées dans l'homéostasie redox et la voie de signalisation Nrf2 par Western Blot** : Celle-ci a été réalisée chez 6 souris témoins exposées au sérum physiologique et 6 souris exposées à la dose la plus élevée de PUF (*i.e.*, 30 µg de PUF/instillation intranasale) en utilisant les kits « p62/KEAP1/NRF2 Pathway » et « Redox Homeostasis and Signaling antibody » (Cell signaling Technology, Danvers, USA), selon les instructions du fournisseur (tableau 21). Dans un premier temps, le lobe pulmonaire gauche de chaque souris a été broyé dans 500 µL de tampon RIPA supplémenté en inhibiteurs de protéases et phosphatases (ThermoFisher Scientific, Illkirch, France). Puis, le kit « Pierce™ BCA Protein Assay Kit » (ThermoFisher Scientific) a été utilisé afin de déterminer la concentration en protéines totales au sein de chaque échantillon. Dans un second temps, les électrophorèses des protéines ont été réalisées sur des gels Bolt Bis-Tris 4-12% ou Novex Tricine 10-20 % en fonction du poids moléculaire des protéines analysées, en utilisant 30 µg de protéines par échantillon

et le marqueur de taille Novex Sharp Pre-Stained Protein Standard (ThermoFisher Scientific). À la suite de la migration, les gels ont été transférés sur des membranes de cellulose ou de polyfluorure de vinylidène (PVDF). Une fois le transfert terminé, les membranes ont alors été saturées à l'aide d'une solution de lait écrémé (ou d'albumine de sérum bovin, BSA, pour les protéines phosphorylées) (5 % v/v) et de Tween 20 (0,1 % v/v) dans une solution saline tamponnée au tris (Tris-buffered saline : TBS) pendant 45 min puis incubées pendant 12h à 4°C avec les solutions d'anticorps primaires diluées dans le même diluant, à la concentration recommandée par le fournisseur (tableau 27). Après 3 lavages au tween-tris-buffered saline (TBS-T), les membranes ont été incubées pendant 1h avec les solutions d'anticorps secondaires diluées dans le même diluant que précédemment. Puis, 500 µL de révélateur ECL Select™™ Western Blotting Detection Reagent (Cytiva, Amersham PI, Royaume-Uni) sont déposés sur les membranes avant d'observer la luminescence émise et les lire à l'aide de l'imageur Fusion FX Spectra (Vilbert-Lourmat, Marne-la-Vallée, France). Les images obtenues ont ensuite été analysées à l'aide du logiciel ImageJ.

Tableau 27 : Liste des anticorps employés lors des Western Blot ciblant des protéines d'intérêt impliquées dans l'homéostasie redox et la voie de signalisation Nrf2.

Anticorps	Fournisseur	Référence	Rôle de la protéine	Facteur de dilution AC I ^r
GPX4	Cell Signaling Technology (Danvers, USA)	52554	Réponse anti- oxydante et homéostasie redox	1000
HO-1		E3F4S		
KEAP1		D6B12		
NRF2		D1Z9C		
SOD1		E4G1H		
SOD2		D3X8F		
PRDX1		D5G12		
Thioredoxin 1		C63C6		
Thioredoxin 2		D1C9L		
TRXR1		D1T3D		
TXNIP		D5F3E		

ii. Étude de l'altération de l'homéostasie du glutathion

- **Mesure du ratio GSSG/GSH par luminescence** (343) : Le protocole utilisé dans le cadre de l'étude du POTOX des PUF (partie II, I, 3, C : « Promega GSH/GSSG-Glo™ Assay ») a une nouvelle fois été utilisé mais cette fois-ci les échantillons de PUF ont été remplacés par les échantillons de lysats pulmonaires, c'est-à-dire des biopsies de poumons lysées dans 500 µL de tampon RIPA (*i.e.*, 142 mM KCL, 5 mM MgCl₂, EDTA 1 mM, glycérol 5% v/v, SDS 0,1% v/v, NP40 1% v/v, HEPES 20 mM dans de l'eau ultrapure) supplémenté en inhibiteurs de protéases et phosphatases (ThermoFisher Scientific, Illkirch, France) permettant d'en extraire les protéines.

B. Recherche de lésions oxydatives

i. Marqueur d'oxydation de l'ADN et de l'ARN : 8-OHdG et 8-OHG

L'ADN et l'ARN ont été extraits des biopsies de tissus issus des 5 organes cibles étudiés en utilisant les kits DNeasy™ et RNeasy™ (Qiagen, Courtaboeuf, France) avant de subir une étape de digestion. Pour cela, 10 µg d'ADN ou d'ARN, mesurés par un spectrophotomètre ont été dissous dans de l'eau (10 µl volume final). La suspension a été incubée à 100°C pendant 2 min, traitée avec 1 µl de tampon d'acétate de potassium 250

mM (pH 5,4), 1 µl de sulfate de zinc 10 mM et 2 µl de nucléase P1 (6,25 U / µl) à 37 ° C pendant une nuit, puis traitée avec 2 µl de Tris-HCl 0,5 M (pH 8,3) et 2 µl de phosphatase alcaline (0,31 U / µl), à 37 ° C pendant 2 heures. La formation de 8-OHdG et de 8-OHG a été déterminée en utilisant les kits « OxiSelect™ Oxidative DNA/RNA Damage ELISA kit quantification » (Cell Biolabs, Inc, San Diego, USA) (355,356). Ces kits fournissent un immunodosage compétitif pour la mesure quantitative des adduits oxydatifs à l'ADN (8-OHdG) et à d'ARN (8-OHG). Pour cela, les échantillons et les standards sont déposés dans une plaque 96 puits contenant un conjugué 8-OHdG/BSA ou 8-OHG/BSA. Après une brève incubation, un anticorps polyclonal anti-8-OHdG ou anti-8-OHG est ajouté, suivi d'un anticorps secondaire conjugué à la HRP. L'absorbance peut être lue à une longueur d'onde de 450 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques multimode Spark® (TECAN, Männedorf, Suisse). La teneur en 8-OHdG ou 8-OHG dans les échantillons inconnus est ensuite déterminée par comparaison avec une courbe standard AGE-BSA prédéterminée.

ii. Marqueurs de peroxydation lipidique : 4-HNE

- Dosage du 4-HNE par électrochimiluminescence (Technologie Meso Scale Discovery : MSD) : Le dosage du 4-HNE a été effectué grâce à un test immunoenzymatique réalisé sur une microplaque à 96 puits. Le fond de chacun des puits, dans lequel se trouve des électrodes, a été revêtu de 30 µL/puits d'une solution de coating de 4-HNE-BSA à 2 µg/mL avec BSA 1% (v/v). Après incubation durant une nuit, la microplaque a été lavée à 3 reprises à l'aide de 150 µL/puits de tampon PBS Tween, puis 150 µL d'une solution de blocage (BSA 3%, v/v) ont été ajoutés à chaque puit. Après incubation durant 1 heure à température ambiante sous agitation orbitale à 500 rpm, l'ensemble des puits a de nouveau été lavé. Les échantillons de lysats de poumons ont été centrifugés et 25 µL de surnageant ont été déposés dans chaque puits. Ensuite, 25 µL de solution de détection (*i.e.*, anticorps polyclonaux de lapins anti-4-HNE) ont été ajoutés dans l'ensemble des puits avant de laisser la microplaque incubée durant 2 heures à température ambiante sous agitation orbitale (500 rpm). Les puits ont à nouveau été lavés et 25 µL de solution de détection sulfoTAG (anticorps de moutons anti-anticorps de lapins couplés à une sulfoTAG) ont été ajoutés. Après une heure d'incubation à température ambiante, la microplaque a de nouveau été lavée, puis 150 µL de tampon de lecture ont été ajoutés avant la détection du signal électrochimiluminescent par le lecteur de microplaque MESO QuickPlex SQ 120 MM (Meso Scale Discovery, Rockville, USA).

iii. Marqueur d'oxydation protéique : AGE, AOPP et Prot-CO

- Dosage des produits de glycation avancée (AGE) par spectrophotométrie (357) : Le kit « OxiSelect™ Advanced Glycation End Product (AGE) Competitive ELISA » (Cell Biolabs, Inc, San Diego, USA) a été employé en suivant les instructions du fabricant. Dans un premier temps, un conjugué AGE a été déposé sur une plaque 96 puits, puis les échantillons ou les standards AGE-BSA ont été ajoutés. Après une brève incubation d'une durée de 10 min, un anticorps polyclonal anti-AGE a été ajouté pendant 1 heure, suivi d'un anticorps secondaire conjugué à une peroxydase pendant 1 heure. L'absorbance a ensuite été lue à la longueur d'onde de 450 nm à l'aide du lecteur de microplaques multimode Spark® (TECAN, Männedorf, Suisse). La teneur en adduits protéiques AGE dans les échantillons inconnus a ensuite été déterminée par comparaison avec une courbe standard AGE-BSA prédéterminée.
- Dosage des produits protéiques d'oxydation avancée (AOPP) par spectrophotométrie (358) : Le kit « OxiSelect™ AOPP Assay Kit » (Cell Biolabs, Inc, San Diego, USA) a été employé en suivant les instructions du fabricant. Les échantillons inconnus contenant des AOPP ou les standards de chloramine ont d'abord été mélangés avec un initiateur de réaction de dosage qui déclenche un processus de

développement de la couleur. Après une incubation de 5 min, une solution d'arrêt a été ajoutée et l'absorbance a été lue à 340 nm à l'aide du lecteur de microplaques multimode Spark® (TECAN, Männedorf, Suisse). La teneur en AOPP des échantillons inconnus a ensuite été déterminée par comparaison avec la courbe standard de chloramine prédéterminée.

- **Dosage des protéines carbonylées par spectrophométrie** (359) : Lors de ce test, réalisé en suivant les instructions du fournisseur, la quantité de protéines carbonylées dans l'échantillon de protéines a été déterminée à l'aide du kit « OxiSelect™ Protein Carbonyl ELISA kit », en comparant son absorbance avec celle d'une courbe standard de BSA réduite/oxydée connue. Pour cela, les étalons de BSA ou les échantillons de protéines (10 µg/mL) ont été incubés durant une nuit sur une microplaque de 96 puits à 37°C. Les carbonyles de protéines présents dans l'échantillon ou l'étalon ont été dérivés en DNP hydrazone et sondés avec un anticorps anti-DNP, suivi d'un anticorps secondaire conjugué à la HRP. L'absorbance a ensuite été lue à la longueur d'onde de 450 nm à l'aide du lecteur de microplaques multimode Spark® (TECAN, Männedorf, Suisse). La teneur en protéines carbonylées de l'échantillon inconnu a alors été déterminée par comparaison avec une courbe standard préparée à partir d'étalons BSA réduits et oxydés prédéterminés.

3. Mesure de la réponse inflammatoire

A. Numération cellulaire du LBA

Le LBA recueilli a aussitôt été conservé dans de la glace, puis centrifugé à 4000 g pendant 10 min à 4°C. Le surnageant a immédiatement été stocké à -80 °C tandis que le culot cellulaire a été remis en suspension dans 500 µL de PBS puis conservé à 4°C. Ensuite, les cellules du LBA ont été déposées par cyto centrifugation (cytospin-2, Shandon Products Ltd., ThermoScientific) sur des lames superfrost et colorées par le MGG (Sigma Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France). Le pourcentage de macrophages ayant internalisé des PUF a été estimé à partir de 4 champs sélectionnés de manière aléatoire dans lesquels 200 macrophages ont été comptabilisés. Le pourcentage de PNN et de macrophages a ensuite été calculé de la même manière.

B. Analyses histologiques des tissus pulmonaires

Des coupes histologiques de 5 µm ont été réalisées à partir des échantillons de tissus pulmonaires inclus en paraffine. Afin d'évaluer quantitativement et qualitativement l'impact des PUF sur la morphologie des voies aériennes, une coloration à l'Hématoxyline-Éosine-Safran (HES) d'une première série de lames a été effectuée. Les lames ont été analysées à l'aveugle par un médecin anatomopathologiste de l'hôpital Saint-Vincent de Paul (Groupement des Hôpitaux de l'Institut Catholique de Lille) au moyen d'un microscope optique Eclipse Ni muni d'une caméra DS-Ri2 (Nikon, Amsterdam, Netherlands).

C. Étude de la polarisation macrophagique

i. Analyses immunohistochimiques

Ces analyses immunohistochimiques ont été réalisées sur les coupes pulmonaires à l'aide d'anticorps (Cell Signaling Technology, Danvers, USA) anti-F4/80 (PA5-32399), anti-iNOS (PA1-036) et anti-CD163 (BS-23128R) et d'un anticorps secondaire conjugué à la peroxydase de raifort (HRP). Les lames ont été analysées à l'aveugle par un médecin anatomopathologiste et de l'hôpital Saint-Vincent de Paul (Lille), au moyen d'un microscope optique Eclipse Ni muni d'une caméra DS-Ri2 (Nikon, Amsterdam, Netherlands).

ii. Mesure de l'expression de protéines d'intérêt impliquées dans la polarisation macrophagique par Western Blot

L'expression des protéines d'intérêt impliquées dans la polarisation macrophagique a été analysée par Western Blot chez 6 souris témoins exposées au sérum physiologique et 6 souris exposées à la dose la plus élevée de PUF (*i.e.*, 30 µg de PUF/institution intranasale) en utilisant la méthodologie employée page 111 (partie II, VI, 2, A, i). Pour cela, le kit « Mouse Reactive M1 vs M2 Macrophage IHC Antibody Sampler Kit » (Cell Signaling Technology, Danvers, USA) a été utilisé, en suivant les instructions du fournisseur (tableau 28).

Tableau 28: Liste des anticorps employés lors des Western Blot ciblant des protéines d'intérêt impliquées dans la polarisation macrophagique M1-M2.

Anticorps	Fournisseur	Référence	Rôle de la protéine	Polarisation	Facteur de dilution AC F'
CD11c	Cell Signaling Technology (Danvers, USA)	D1V9Y	Polarisation macrophagique M1/M2	M1+M2	1000
Iba1/AIF-1		E4O4W			
F4/80		D2S9R			
CD68		E3O7V			
CD86		E5W6H		M1	
CD206/MRC1		E6T5J		M2	

D. Étude de la voie de signalisation NFκB

- Mesure de l'activité de fixation à l'ADN du facteur de transcription NFκB par spectrophotométrie (360) : Le principe de ce kit (« TransAM™ Flexi NFκB Family Transcription Factor Assay Kit », Active Motif, La Hulpe, Belgique) réalisé selon les instructions du fournisseur, cherche à étudier la liaison des sous-unités p50 et p65 de ce facteur de transcription à une séquence consensus immobilisée sur une microplaque à 96 puits. Pour cela, un extrait nucléaire activé est ajouté à chaque puit et le facteur de transcription d'intérêt se lie spécifiquement à cet oligonucléotide lié. Un anticorps primaire spécifique de la protéine NFκB est ensuite ajouté pendant 1 heure, puis le complexe est incubé pendant 1 heure avec un anticorps secondaire conjugué à une peroxydase. Un substrat incolore est alors ajouté et convertit en un produit chromogène, pour obtenir une lecture colorimétrique sensible et facilement quantifiable, dont l'absorbance est mesurée à 450 nm l'aide du lecteur de microplaques multimode Spark® (TECAN, Männedorf, Suisse).
- Dosage des cytokines par électrochimiluminescence (Technologie MSD) (361,362) : Les concentrations de 19 médiateurs de l'inflammation ont été mesurées : Interféron γ (IFN-γ), les Interleukines 1β, 2, 4, 5, 6, 9, 10, 12p70, 15, 17 A/F, 27p28/IL-30, 33, Interféron Gamma-Induced Protein 10 (IP-10), Keratinocyte Chemoattractant/human Growth-Regulated Oncogene (KC/GRO-α), Monocyte Chemoattractant Protein MCP-1, Macrophage Inflammatory Protein 1-α et 2 (MIP- 1α et MIP-2) et le Tumor Necrosis Factor α (TNF-α). Le dosage de ces protéines a été réalisé en utilisant les kits « Cytokine panel 1 (mouse) » et « Proinflammatory Panel mouse 1 » (Meso Scale Discovery, Rockville, USA), en suivant les instructions du fabricant. Il s'agit d'un test immunologique de type sandwich utilisant une microplaque revêtue d'anticorps spécifiques des cytokines recherchées dans laquelle les échantillons vont ensuite être déposés pendant toute une nuit. Un anticorps de détection conjugué à un marqueur

électrochimiluminescent Sulfo-Tag est ensuite ajouté pendant 2 heures, puis la détection du signal électrochimiluminescent est analysée par le lecteur de microplaque MESO QuickPlex SQ 120 MM (Meso Scale Discovery, Rockville, USA).

- **Mesure de l'expression des protéines d'intérêt impliquées dans la voie de signalisation NFκB par Western Blot** : Celle-ci a été réalisée chez 6 souris témoins exposées au sérum physiologique et 6 souris exposées à la dose la plus élevée de PUF (*i.e.*, 30 µg de PUF/instillation intranasale) en utilisant la méthodologie employée à la partie II, VI, 2, A, i, permettant la détection et la séparation des protéines. Pour cela, le kit « NFκB pathway » (Cell Signaling Technology, Danvers, USA) a été utilisé en suivant les instructions du fournisseur (tableau 29).

Tableau 29 : Liste des anticorps employés lors des Western Blot ciblant des protéines d'intérêt impliquées dans la voie de signalisation NFκB

Anticorps	Fournisseur	Référence	Rôle de la protéine	Facteur de dilution AC I'
IKKα	Cell Signaling Technology (Danvers, USA)	D3W6N	Réponse immune et inflammatoire	1000
IKKβ		D30C6		
NFκB1 p105/p50		D4P4D		
NFκB p65		D14E12		
Phospho-NFκB p65 (Ser536)		93H1		
IκBα		44D4		

4. Évaluation des altérations transcriptomiques

A. Analyse des miARN circulants

L'analyse de l'expression des miARN circulants a été réalisée par la technique de séquençage à haut débit ou « Next-Generation Sequencing » (*i.e.*, NGS), en collaboration avec la plateforme de génomique fonctionnelle et structurale du Centre de Biologie Pathologie du Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Lille. Cette technique permet d'effectuer une caractérisation globale des miARN présents au sein d'un échantillon donné.

Dans un premier temps, les miARN circulants ont été extraits à partir des échantillons de plasma sous-mandibulaires, dont le volume variait entre 20 à 100 µL, à l'aide de l'automate QIAcube (Qiagen) en suivant les instructions du kit « miRNeasy serum/plasma » (Qiagen). Un contrôle exogène de référence, le cel-miR-39, a préalablement été ajouté à chaque échantillon, afin de déterminer le niveau d'expression des miARN avec précision. Puis, des bibliothèques de miARN sont générées à l'aide du kit « QIAseq miRNA Library » (Qiagen, Allemagne), en suivant les instructions du fournisseur. Pour cela, 1µL de QIAseq miRNA Library QC Spike-Ins (QIAGEN, Allemagne) a été ajouté à 3 µL d'ARN total de chaque échantillon de sérum. Des adaptateurs 3' et 5' spécialement conçus ont été ligaturés aux miARN matures. Les miARN ligaturés ont ensuite été transcrits en ADNc à l'aide d'une amorce de transcription inverse ayant un indice moléculaire unique (*i.e.*, UMI). Après nettoyage de l'ADNc à l'aide d'une méthode basée sur des billes magnétiques, les bibliothèques ont été amplifiées à l'aide d'un amorceur universel et d'amorces inverses d'indexation. Après un nettoyage final, les bibliothèques de miARN ont été analysées sur un bio-analyseur à l'aide d'une puce à ADN haute sensibilité (Agilent Technologies, USA) afin de déterminer la taille, la concentration et la pureté des bibliothèques. Enfin, les

librairies ont été séquencées à l'aide du système Flowcell Novaseq 6000 SP (Illumina, San Diego, USA) avec une concentration de 300pM. Le programme FastQC ont été utilisé afin de contrôler la qualité des lectures et le traitement des données. Enfin, l'analyse d'expression différentielle est réalisée à l'aide du package DESeq2 (version 1.30.1) en retenant les ARNm ayant un FC significativement inférieur à 0,66 (*i.e.*, downsous-exprimés-régulés) ou supérieur à 1,5 (*i.e.*, up-régulésexprimés) et une *p*-value ajustée inférieure à 0,05. Une normalisation des résultats obtenus a ensuite été réalisée en prenant en compte 3 paramètres : (1) le volume de plasma prélevé ; (2) le pourcentage d'hémolyse déterminé à l'aide d'une échelle visuelle et du niveau d'expression de deux miARN : miR-23a (stable vis-à-vis de l'hémolyse) et du miR-451 (sensible à l'hémolyse) ; (3) la combinaison de 3 miARN endogènes stables dans le sérum et non affectés par l'hémolyse : miR-92a, miR-93-5p et miR-191-5p.

Une fois cette normalisation effectuée, une liste des miARN différentiellement exprimés dans les groupes de souris exposées aux PUF par rapport au groupe témoin a pu être établie.

B. Recherche de miARN candidats dans les organes cibles

À partir de la liste des miARN circulants différentiellement exprimés, il a été possible de constater que le nombre de miARN significativement dérégulés par rapport au groupe témoin était nettement plus important dans le groupe de souris exposées à la dose la plus élevée de particules (*i.e.*, 30 µg/institution intranasale) par rapport aux souris exposées à la dose la plus faible (*i.e.*, 10 µg/institution intranasale). Afin de réduire la liste des miARN d'intérêt à rechercher au niveau des organes cibles, il a ainsi été décidé de se focaliser uniquement sur les miARN les plus significativement dérégulés chez les souris exposées à la dose la plus élevée de PUF. Puis, à partir de ce panel de miARN, une étude approfondie de la littérature couplée à l'utilisation de banques de données de miARN (*i.e.*, miRDB, DIANA TarBase, miRSearch, miRTarBase) a permis d'extraire une liste de 18 miARN d'intérêt (7 up- et 11 down-régulés) (tableau 30), majoritairement exprimés au niveau pulmonaire, à rechercher au niveau de l'ensemble des organes cibles par RT-qPCR en temps réel (TaqMan® MicroRNA Assays, Applied Biosystems). Pour cela, les ARN totaux ont été extraits à partir des échantillons d'organes conservés dans le RNA later. Une masse de 20 à 25 mg de chaque organe a été broyée dans 600 µL de tampon RLT Plus supplémenté par du β-mercaptoéthanol, à l'aide du GentleMACS Dissociator (Miltenyi Biotec). Les ARN totaux ont ensuite été extraits à l'aide de l'automate QIAcube (Qiagen) en suivant les instructions du kit « AllPrep DNA/RNA/miRNA Universal kit » (Qiagen). Puis, la RT et la PCR ont été réalisées en employant les kits « TaqMan™ Advanced miRNA cDNA Synthesis » et le « Master Mix TaqMan™ Fast Advanced » (ThermoFisher Scientific, Illkirch, France), en suivant les instructions du fournisseur. Ce protocole se déroule en 5 étapes principales : (1) Addition d'une queue poly(A) ; (2) Réaction de ligature à l'adaptateur ; (3) Réaction de rétro-transcription ; (4) Réaction d'amplification des miARN ; (5) Réaction de fast PCR.

Tableau 30 : Liste des miARN d'intérêt sélectionnés à rechercher dans les organes-cibles.

miARN	Référence (ThermoFisher Scientific)
miR-133a-5p	mmu481498_mir
miR-193a-5p	mmu482624_mir
miR-669c-3p	mmu483332_mir
miR-615-3p	mmu481930_mir
miR-146b-3p	mmu481547_mir
miR-485-3p	mmu481854_mir
miR-214-3p	mmu481652_mir
miR-19a-3p	mmu479228_mir

miR-142a-5p	mmu481324_mir
miR-144-3p	mmu482959_mir
miR-16-1-3p	mmu481508_mir
miR-19b-3p	mmu478264_mir
miR-32-5p	mmu482950_mir
miR-106b-5p	mmu478412_mir
miR-15a-3p	mmu481554_mir
miR-148b-3p	mmu477824_mir
miR-425-5p	mmu481161_mir
miR-18a-5p	rno480968_mir

Une étude de stabilité des miARN candidats suggérés par la littérature a ensuite été déterminée dans chaque organe de manière à sélectionner les trois les plus stables dans notre modèle murin. Les résultats ont ensuite été rapportés à l'expression de ces miARN les plus stables, spécifiques de chaque organe, sélectionnés en raison de la qualité de résultats obtenus (tableau 31).

Tableau 31 : Liste des miARN candidats sélectionnés comme références dans chaque organe-cible.

Organe	miRNA de référence	Référence (ThermoFisher Scientific)
Poumon	miR-103-3p	mmu478253_mir
	miR-221-3p	mmu481005_mir
	miR-423-5p	hsa478090_mir
Cœur	miR-16-5p	mmu482960_mir
	miR-93-5p	mmu481280_mir
	miR-103-3p	mmu478253_mir
Foie	miR-16-5p	mmu482960_mir
	miR-24-3p	mmu481011_mir
	miR-103-3p	mmu478253_mir
Reins	miR-24-3p	mmu481011_mir
	miR-191-5p	mmu481584_mir
	miR-103-3p	mmu478253_mir
Cerveau	miR-16-5p	mmu482960_mir
	miR-93-5p	mmu481280_mir
	miR-103-3p	mmu478253_mir

C. Analyses de l'expression des ARN messagers pulmonaires

Des analyses transcriptomiques ont été réalisées par la technologie 3'-RNA-seq, en collaboration avec la plateforme de génomique fonctionnelle et structurale du Centre de Biologie Pathologie du CHU de Lille (Plateformes Lilloises en Biologie et Santé, PLBS UAR 2014 – US 41). Cette technique permet d'étudier quantitativement et qualitativement le transcriptome grâce au séquençage à haut débit.

Dans un premier temps, les ARN pulmonaires ont été extraits à partir des tissus pulmonaires conservés dans le RNA later. Une masse de 20 à 25 mg de poumon a été broyée dans 600 µL de tampon RLT Plus supplémenté par du β-mercaptoéthanol, à l'aide du GentleMACS Dissociator (Miltenyi Biotec). Les ARN totaux

ont ensuite été extraits à l'aide de l'automate QIAcube (Qiagen) en suivant les instructions du kit « AllPrep DNA/RNA/miRNA Universal kit » (Qiagen).

Puis, des bibliothèques de fragments sont générées à partir de 50 à 200 ng d'ARN total à l'aide du kit « QuantSeq 3' mRNA-Seq Library Prep Kit FWD » (Lexogen, Vienne, Autriche), en suivant les instructions du fournisseur. Ce dernier permet de réaliser des séquences proches de l'extrémité 3' de l'ARN polyadénylé, compatibles avec la technologie Illumina utilisée lors de l'étape de séquençage. Puis, un contrôle de chaque bibliothèque est effectuée à l'aide du bio-analyseur Agilent 2100 (Agilent, Santa Clara, USA) en veillant à ce que l'indice de qualité « RIN » (*i.e.*, RNA Integrity Number) de chaque échantillon soit supérieur à 4, garantissant ainsi l'intégrité des ARN. Les bibliothèques sont ensuite séquencées à l'aide du système NovaSeq 6000 (Illumina, San Diego, USA) pouvant atteindre 20 milliards de lectures par échantillon analysé. Les programmes Qualimap, Fastp, FastQC et MultiQC ont été utilisés afin de contrôler la qualité des lectures et le traitement des données. Enfin, l'analyse d'expression différentielle est réalisée à l'aide du package DESeq2 (version 1.30.1) en retenant les ARNm ayant un FC significativement inférieur à 0,66 (*i.e.*, down-régulés) ou supérieur à 1,5 (*i.e.*, up-régulés) et une p-value ajustée inférieure à 0,05.

Dans un second temps, une combinaison de bases de données bio-informatiques incluant Gene Ontology (GO) Biological Processes and Molecular Functions, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) et ReactomePA a été utilisée afin d'identifier les fonctions cellulaires et moléculaires modulées par les gènes dérégulés à la suite des expositions particulières, en se basant sur les données bibliographiques.

D. Analyses des voies de signalisation dérégulées par l'exposition aux PUF

i. Évaluation du métabolisme mitochondrial

➤ **Recherche de signatures spécifiques liées à la fonction mitochondriale :**

À partir des résultats de l'analyse transcriptomique et des données issues des bases de données bio-informatiques, une recherche plus fine des gènes dérégulés spécifiquement liés à la fonction mitochondriale a été initiée en utilisant la base de données de signatures moléculaires « MSigDB » du logiciel « Gene Set Enrichment Analysis » (GSEA) afin d'en extraire d'éventuelles altérations mitochondriales spécifiques.

➤ **Observations microscopiques des mitochondries par Microscopie Electronique à Transmission :**

Méthodologie détaillée à la partie II, VI, 1, A, ii.

➤ **Étude de la respiration mitochondriale :**

La consommation cellulaire d'oxygène, ou Oxygen Consumption Rate (OCR), exprimée en pmol O₂/minute, a été mesurée en temps réel dans les biopsies pulmonaires des souris exposées ou non aux PUF, 24h après la dernière exposition. Cela s'est fait à l'aide d'un système de chambres hermétiques (plaques XFe24, Agilent) couplé à des sondes à oxygène présentes sur le système Seahorse XFe24 Extracellular Flux 210 Analyzer (Agilent). Afin d'isoler la respiration d'origine mitochondriale et de déduire les différents processus qui consomment l'oxygène, des inhibiteurs ou activateurs des différents complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale sont ajoutés séquentiellement. Ainsi, la mesure de l'oxygène utilisé pour la production d'ATP se fait par ajout d'oligomycine (1 µM) qui est un inhibiteur du complexe V (ATP synthase). Afin de mesurer la capacité de réserve des mitochondries, c'est-à-dire leur capacité à faire face à une augmentation de la demande en énergie, un agent découplant, le Carbonyl cyanide-p-trifluorométhoxyphénylhydrazone (FCCP) (0,27 µM et 0,34 µM) est ajouté dans le but d'inhiber le gradient de proton et la production d'ATP. Ainsi, la cellule fait alors face à une augmentation de la demande d'énergie et les réactions d'oxydation et la consommation d'O₂ sont à leur maximum. Enfin, pour mesurer la respiration

non mitochondriale, de l'antimycine A (0,5 μ M) et de la roténone (0,5 μ M) sont ajoutés pour inhiber les complexes I et III de la chaîne respiratoire mitochondriale, respectivement. La concentration totale en protéines, mesurée à l'aide du kit Pierce™ BCA Protein Assay Kit (ThermoFisher Scientific), a permis d'effectuer une normalisation des valeurs d'OCR. Enfin, le calcul des différents paramètres a été réalisé selon la méthode décrite par Divakaruni et son équipe (363).

➤ **Étude du métabolisme mitochondrial :**

L'expression des protéines d'intérêt impliquées dans le métabolisme, la biogénèse, la dynamique et la masse mitochondriale a été analysée par Western Blot chez 6 souris témoins exposées au sérum physiologique et 6 souris exposées à la dose la plus élevée de PUF (*i.e.*, 30 μ g de PUF/instillation intranasale) en utilisant la méthodologie employée à la partie II, VI, 2, A, i. Pour cela, les kits « Glycolysis Antibody Sampler kit », « Gluconeogenesis Antibody Sampler Kit » (Cell Signaling Technology, Danvers, USA) ont été utilisés, en suivant les instructions du fournisseur (tableau 32).

Tableau 32 : Liste des anticorps employés lors des Western Blot ciblant des protéines d'intérêt impliquées dans la biogénèse, la dynamique et la masse mitochondriales

Anticorps	Fournisseur	Référence	Rôle de la protéine	Facteur de dilution AC I ^r
MFN-1	Novus-Biologicals (Centennial, USA)	11E9-1H12	Fusion	500
MFN-2	ThermoFisher	7H42L13		1000
OPA-1	Novus-Bio	NB110-55290		500
FIS-1	Genetex (Irvine, USA)	GTX631209	Fission	500
Phospho-DRP1 (Ser616)	Cell Signaling Technology (Danvers, USA)	3455S		1000
Phospho-DRP1 (Ser637)		4867S		
DRP1	Novus-Biologicals (Centennial, USA)	NB110-55237		500
OXPHOS	ThermoFisher Scientific (Massachusetts, USA)	45-8099	Phosphorylation oxydative	500
VDAC	Cell Signaling Technology (Danvers, USA)	4661S	Masse mitochondriale	1000
TOMM20	Novus-Biologicals (Centennial, USA)	NBP1-81556		
PARKIN	Abcam (Cambridge, UK)	ab77924	Mitophagie	1000
PINK1	Novus-Biologicals (Centennial, USA)	BC100-494		

ii. Évaluation de l'induction de la mort cellulaire

L'expression des protéines d'intérêt impliquées dans le métabolisme, la biogénèse, la dynamique et la masse mitochondriale a été analysée par Western Blot chez 6 souris témoins exposées au sérum physiologique et 6 souris exposées à la dose la plus élevée de PUF (*i.e.*, 30 μ g de PUF/instillation intranasale) en utilisant la méthodologie employée page 111 (partie II, VI, 2, A, i). Pour cela, les kits « Autophagy Antibody Sampler kit », « Autophagy Induction ULK1 Complex Antibody Sampler kit », « Apoptosis/Necroptosis Antibody Sampler Kit », « Pro-Apoptosis Bcl-2 Antibody Sampler Kit », « Ferroptosis Antibody Sampler Kit »,

« Mouse Reactive Necroptosis Antibody Sampler Kit » (Cell Signaling Technology, Danvers, USA) ont été utilisés, en suivant les instructions du fournisseur (tableau 33).

Tableau 33 : Liste des anticorps employés lors des Western Blot ciblant des protéines d'intérêt impliquées dans l'autophagie, l'apoptose, la nécroptose et la ferroptose.

Anticorps	Fournisseur	Référence	Rôle de la protéine	Facteur de dilution
Beclin-1	Cell Signaling Technology (Danvers, USA)	D40C5	Autophagie	1000
LC3A/B		D3U4C		
Atg5		D5F5U		
Atg12		D88H11		
Atg16L1		D6D5		
Atg7		D12B11		
Atg3		3415		
ULK1		D8H5		
FIP200		D10D11		
Atg101		E1Z4W		
Caspase-3		D3R6Y		
Caspase-3 clivée		5A1E		
Caspase-8		D35G2		
Bad		D24A9		
Phospho-Bad (Ser112)		40A9		
Bim		C34C5		
Bak		D4E4		
RIP		D94C12	Nécroptose	
Phospho-RIP (Ser166)		E7G6O		
RIP-3		D8J3L		
Phospho-RIP-3 (Thr231/Ser232)		E7S1R		
FTH1		D1D4	Ferroptose	

iii. Évaluation du remodelage tissulaire et de la transition épithélio-mésenchymateuse

L'expression des protéines d'intérêt impliquées dans le remodelage tissulaire et la transition épithélio-mésenchymateuse a été analysée par Western Blot chez 6 souris témoins exposées au sérum physiologique et 6 souris exposées à la dose la plus élevée de PUF (*i.e.*, 30 µg de PUF/instillation intranasale) en utilisant la méthodologie employée page 111 (partie II, VI, 2, A, i). Pour cela, le kit « Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) Antibody Sampler Kit » (Cell Signaling Technology, Danvers, USA) a été utilisé, en suivant les instructions du fournisseur (tableau 34).

Tableau 34 : Liste des anticorps employés lors des Western Blot ciblant des protéines d'intérêt impliquées dans la transition épithélio-mésenchymateuse.

Anticorps	Fournisseur	Rôle de la protéine	Diluant	Facteur de dilution
α-SMA	Cell Signaling Technology (Danvers, USA)	D4K9N	Remodelage tissulaire et transition épithélio-mésenchymateuse	1000
E-cadhérine		24E10		
N-cadhérine		D4R1H		
Intégrine β1		34971S		
Smad2		D43B4		
Vimentine		D21H3		
ZEB1		E2G6Y		
ZO-1		D6L1E		
Cathepsine-K	Novus-Biologicals (Centennial, USA)	NBP1-45460		

5. Analyses statistiques

Les résultats obtenus lors des différentes expérimentations ont été analysés avec le logiciel GraphPad PRISM® v8 et exprimés pour la plupart en FC, correspondant au rapport du niveau moyen d'expression du paramètre étudié dans une condition comparé à celui du témoin négatif. Les groupes de souris (n = 6/groupe) exposées ont été comparées aux groupes témoins par utilisation d'un test non paramétrique de Mann Whitney avec un risque de première espèce $p \leq 0,05$. Les résultats obtenus pour l'étude du potentiel oxydant des PUF et pour la quantification des endotoxines (n = 3 / condition) ont été comparés par utilisation d'un test non paramétrique de Kruskal-Wallis et d'une correction de Bonferonni avec un risque de première espèce $p = 0,05$.

Partie III : Résultats et Discussions

I. Caractérisation physico-chimique et POTOX des PUF

1. Caractérisation physico-chimique et biologique des PUF

A. Distribution granulométrique

Les résultats de l'analyse de la distribution granulométrique des PUF ont montré une distribution bimodale (figure 46) avec un premier pic plus important de moyenne $180,07 \pm 28,35$ nm et un second pic de moyenne $600,30 \pm 119,46$ nm correspondant respectivement aux PM quasi-ultrafines (86,6 %) et à la formation d'agrégats des PUF, ces dernières s'agrégant partiellement progressivement qui ont naturellement tendance à s'agréger (13,4 %).

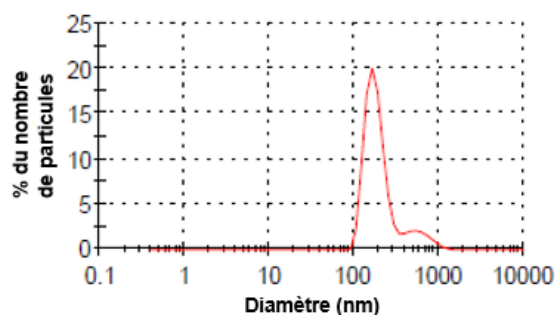


Figure 46 : Distribution granulométrique des PM_{0,1}.

B. Analyse des métaux et éléments traces métalliques

Le tableau 35 présente les résultats de l'analyse de la composition en métaux et éléments traces métalliques (ETM) des PUF. Les composants majeurs étaient le calcium (Ca ; 12258 $\mu\text{g/g}$ soit 30,2 %), le silicium (Si ; 9723 $\mu\text{g/g}$ soit 23,9 %), le fer (Fe ; 4108 $\mu\text{g/g}$ soit 10,1 %), le sodium (Na ; 3946 $\mu\text{g/g}$ soit 9,7 %), l'aluminium (Al ; 3510 $\mu\text{g/g}$ soit 8,6 %), le potassium (K ; 3317 $\mu\text{g/g}$ soit 8,2 %) et magnésium (Mg ; 916 $\mu\text{g/g}$ soit 2,3%). À cela s'ajoutaient des éléments présents en plus faible proportion : le cuivre (Cu ; 812 $\mu\text{g/g}$ soit 2,0 %), le zinc (Zn ; 775 $\mu\text{g/g}$ soit 1,9 %), le manganèse (Mn ; 329 $\mu\text{g/g}$ soit 0,8 %), le titane (Ti ; 249 $\mu\text{g/g}$ soit 0,6 %), le chrome (Cr ; 145 $\mu\text{g/g}$ soit 0,4 %), le plomb (Pb ; 114 $\mu\text{g/g}$ soit 0,3 %), l'antimoine (Sb ; 84 $\mu\text{g/g}$ soit 0,2 %), le baryum (Ba ; 83 $\mu\text{g/g}$ soit 0,2 %), le nickel (Ni ; 73 $\mu\text{g/g}$ soit 0,2 %) et le strontium (Sr ; 48 $\mu\text{g/g}$ soit 0,1 %). Enfin, l'arsenic (As), le béryllium (Be), le bismuth (Bi), le cadmium (Cd), le cérium (Ce), le cobalt (Co), le césium (Cs), le lanthane (La), le lithium (Li), le molybdène (Mo), le palladium (Pd), le platine (Pt), le rubidium (Rb), le scandium (Sc), le sélénium (Se), l'étain (Sn), le thorium (Th), le thallium (Tl), l'uranium (U) et la vanadium (V) étaient présents à moins de 0,1 %.

Tableau 35 : Composition en éléments traces métalliques des PUF, analysée par ICP-MS (n = 3).

Élément	µg/g	Élément	µg/g
Al	3510	Na	3946
As	9.4	Ni	73
Ba	83	Pb	114
Be	0.06	Pd	0.71
Bi	1.8	Pt	0.29
Ca	12258	Rb	11
Cd	2.9	Sb	84
Ce	6.4	Sc	0.99
Co	2.9	Se	15
Cr	145	Si	9723
Cs	1.3	Sn	38
Cu	812	Sr	48
Fe	4108	Th	0.45
K	3317	Ti	249
La	3.1	Tl	0.85
Li	4.1	U	0.23
Mg	916	V	22
Mn	329	Zn	775
Mo	13		

C. Quantification des HAP, dioxines, furannes et PCB

Le tableau 36 présente les résultats obtenus pour la quantification des HAP dans les PUF. Les composants majeurs étaient le Benzo(b)fluoranthène (12,74 ng/mg soit 12,8 %), le Benzo(e)pyrène (11,90 ng/mg soit 12,0 %), le chrysène (11,30 ng/mg soit 11,4 %) et le Benzo(ghi)perylene (10,73 ng/mg soit 10,8 %). À cela s'ajoutaient des éléments présents en plus faible proportion : Indeno(123cd)pyrène (7,90 ng/mg soit 7,9 %), Benzo(a)pyrène (7,40 ng/mg soit 7,4 %), Benzo(a)anthracène (5,80 ng/mg soit 5,8 %), Benzo(k)fluoranthène (5,70 ng/mg soit 5,7 %), Fluoranthène (5,51 ng/mg soit 5,5 %), Phenanthrène (4,94 ng/mg soit 5,0 %), Naphtalène (4,30 ng/mg soit 4,3 %), Pyrène (4,10 ng/mg soit 4,2 %), Acenaphtylène (2,10 ng/mg soit 2,1 %), Fluorène (2,10 ng/mg soit 2,1 %) et Dibenz(ah)anthracène (1,73 ng/mg soit 1,7 %). Enfin, l'Acenaphtène et l'Anthracène étaient présents à moins de 1 %.

Tableau 36 : Quantification de la composition en HAP des PUF analysée par HPLC.

Composés	Concentration (ng/mg)	TEF (WHO 2005)
Acenaphtène	0.93	0.001
Acenaphtylène	2.10	0.001
Anthracène	0.30	0.01
Benzo(a)anthracène	5.80	0.1
Benzo(a)pyrène	7.40	1
Benzo(b)fluoranthène	12.74	0.1
Benzo(e)pyrène	11.90	0.004
Benzo(ghi)perylene	10.73	0.01
Benzo(k)fluoranthène	5.70	0.1
Chrysène	11.30	0.01
Dibenzo(ah)anthracène	1.73	1.11
Fluoranthène	5.51	0.001
Fluorene	2.10	0.001
Indeno(123cd)pyrène	7.90	0.1
Naphtalène	4.30	0.001
Phenanthrène	4.94	0.001
Pyrène	4.10	0.001

Le tableau 37 présente les résultats obtenus pour la quantification des PCB dans les PUF. Dans un premier temps, concernant les PCB type dioxine, les deux composés majoritaires étaient les PCB 118 (22,22 ng/g soit 53,5 %) et 105 (10,47 ng/g soit 25,2 %). Les PCB 126, 169, 123, 157, 77, 114, 156 et 167 avaient, quant à eux, des concentrations respectives comprises entre 2 et 3 % des PUF. Enfin, les PCB 81 et 189 avaient une concentration plus faible de 2,0 et 1,3 %, respectivement. Dans un second temps, concernant les PCB indicateurs, les composés majoritaires étaient les PCB 138 (44,52 ng/g soit 27,5 %), 153 (39,10 ng/g soit 24,2 %), 101 (25,91 ng/g soit 16,0 %) et 180 (20,07 ng/g soit 12,4 %). Les PCB 52 et 28 avaient, quant à eux, des concentrations plus faibles de l'ordre de 10,2 % et 9,6 %, respectivement.

Tableau 37 : Quantification de la composition en PCB analysée par GC/HRMS.

PCB de type dioxine	Concentration (ng/g de PB)	TEF (WHO 2005)
PCB 81	0.8286	0.0003
PCB 77	0.8836	0.0001
PCB 123	0.9094	0.00003
PCB 118	22.2155	0.00003
PCB 114	0.8821	0.00003
PCB 105	10.4657	0.00003
PCB 126	1.1551	0.1
PCB 167	0.8443	0.00003
PCB 156	0.8728	0.00003
PCB 157	0.9070	0.00003
PCB 169	1.0394	0.03
PCB 189	0.5376	0.00003
TOTAL	32,681 < Total < 41,541	
PCB indicateurs	Concentration (ng/g de PB)	
PCB 28	15.534	
PCB 52	16.520	
PCB 101	25.907	
PCB 138	44.516	
PCB 153	39.062	
PCB 180	20.071	
Somme PCB_i (ng/g de PB)	161,609	

Le tableau 38 présente les résultats obtenus pour la quantification en dioxines et furannes des PUF. Dans un premier temps, concernant les dioxines, les deux composés majoritaires étaient l'Octachlorodibenzodioxine (OCDD) et l'1,2,3,4,6,7,8 HpCDD à hauteur de 5,01 ng/g soit 62,1 % et 2,34 soit 29,0 %, respectivement. À cela s'ajoutaient les 1,2,3,7,8,9 HxCDD (0,29 ng/g soit 3,5 %), 1,2,3,6,7,8 HxCDD (0,27 ng/g soit 3,3 %), 1,2,3,4,7,8 HxCDD (0,09 ng/g soit 1,0 %), 1,2,3,7,8 PeCDD (0,06 ng/g soit 0,7 %) et 2,3,7,8 TCDD (0,03 ng/g soit 0,3 %) à de plus faibles proportions. Dans un second temps, concernant les furannes, les composés majoritaires étaient l'Octachlorodibenzofurane (OCDF) et l'1,2,3,4,6,7,8 HpCDF à hauteur de 4,97 ng/g soit 56,5 % et 1,30 ng/g soit 14,8 %, respectivement. Le 2,3,4,6,7,8 HxCDF (0,50 ng/g soit 5,7 %), le 1,2,3,4,7,8 HxCDF (0,41 ng/g soit 4,7 %), le 2,3,4,7,8 PeCDF (0,40 ng/g soit 4,5 %), le 1,2,3,6,7,8 HxCDF (0,38 ng/g soit 4,3 %), le 1,2,3,4,7,8,9 HpCDF (0,30 ng/g soit 3,4 %), le 1,2,3,7,8,9 HxCDF (0,22 ng/g soit 2,5 %), le 1,2,3,7,8 PeCDF (0,22 ng/g soit 2,5 %) et le 2,3,7,8 TCDF (0,10 ng/g soit 1,1 %) étaient, quant à eux, présents à des concentrations plus faibles.

Tableau 38 : Quantification de la composition en dioxines et furannes analysée par GC/HRMS.

Congénère	Concentration (ng/g)	TEF (WHO 2005)
2,3,7,8 TCDD	0.0225	1
1,2,3,7,8 PeCDD	0.0580	1
1,2,3,4,7,8 HxCDD	0.0847	0.1
1,2,3,6,7,8 HxCDD	0.2666	0.1
1,2,3,7,8,9 HxCDD	0.2862	0.1
1,2,3,4,6,7,8 HpCDD	2.3362	0.01
OCDD	5.0146	0.0003
Dioxines	7,9882-8,0687	
2,3,7,8 TCDF	0.0991	0.1
1,2,3,7,8 PeCDF	0.2229	0.03
2,3,4,7,8 PeCDF	0.3997	0.3
1,2,3,4,7,8 HxCDF	0.4122	0.1
1,2,3,6,7,8 HxCDF	0.3758	0.1
2,3,4,6,7,8 HxCDF	0.5009	0.1
1,2,3,7,8,9 HxCDF	0.2157	0.1
1,2,3,4,6,7,8 HpCDF	1.3001	0.01
1,2,3,4,7,8,9 HpCDF	0.2997	0.01
OCDF	4.9694	0.0003
Furannes	8.7954	

D. Quantification des endotoxines

Les résultats de la quantification des endotoxines dans notre échantillon de PUF aux concentrations respectives de 10 µg et 30 µg/institution intranasale ont montrés une concentration en unités d'endotoxines par mL, exprimée en fold change, en moyenne égale à 2,11 et 6,72, respectivement (figure 47). Le facteur 3 existant entre les deux doses de PUF choisies a donc bien été retrouvé pour cette quantification. La valeur brute de la concentration en endotoxines du témoin négatif (*i.e.*, solution de sérum physiologique) était de 0,57 EU/mL.

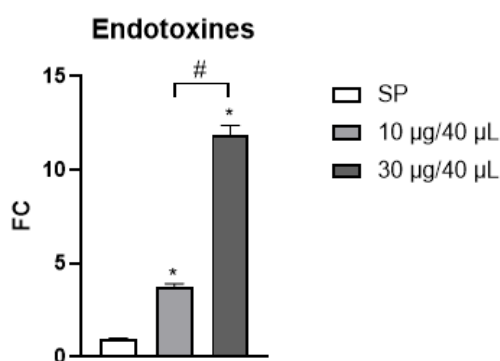


Figure 47 : Quantification des endotoxines dans les PUF. (FC = Fold Change, n = 3, p < 0,05* vs témoins, SP ; p = 0,05#, vs 10 µg/institution).

E. Discussion

Le rôle clé joué par la fraction particulaire dans l'impact sanitaire de la pollution atmosphérique est aujourd'hui avéré. Néanmoins, l'implication de la fraction ultrafine est encore méconnue, faute d'études expérimentales et épidémiologiques en nombre suffisant pour établir un lien clair entre l'exposition à ces dernières et l'apparition d'effets délétères sur la santé humaine. Cette lacune, qui s'explique en grande partie par les difficultés de suivi et d'échantillonnage de ces dernières, souligne l'importance d'entreprendre des études complémentaires, d'autant plus que leur composition physico-chimique complexe rend leurs mécanismes physiopathologiques de toxicité difficiles à appréhender.

Dans notre travail, des PUF ont été prélevées dans la zone urbaine de Lille, à proximité d'un grand axe routier, l'autoroute A25, ainsi que de la gare du Centre Hospitalier Régional de Lille. Cette zone de prélèvement est idéalement représentative de l'exposition des populations vivant en ville car elle est influencée à la fois par des émissions atmosphériques de particules industrielles, urbaines et routières. Ces prélèvements ont été réalisés à l'aide d'impacteurs à cascade dont le diamètre de coupure le plus faible était de 0,2 μm , ne garantissant donc pas la collecte de PUF au sens strict du terme, c'est-à-dire ayant un diamètre inférieur à 0,1 μm . Afin de définir avec précision la taille des échantillons, une évaluation de la distribution granulométrique a été réalisée. Cette dernière a permis d'établir que les particules prélevées étaient en réalité des particules quasi-ultrafines avec un diamètre moyen de 180 nm ($\text{PM}_{0,18}$). Ces dernières ont été prélevées durant la période printemps/été de l'année 2019, marquée par deux vagues de chaleur d'une durée de 6 jours chacune. La saison de prélèvement des PUF, de même que les conditions météorologiques sont des facteurs majeurs influençant la composition de ces dernières. Alors que l'été est une saison durant laquelle les émissions particulaires sont principalement liées aux épandages agricoles, l'hiver est plutôt sujet aux émissions liées au trafic routier et au chauffage au bois (364). L'Institut de Veille Sanitaire (InVS) a d'ailleurs montré en 2012 qu'une augmentation de 10 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ en PM_{10} en été dans 9 villes françaises, dont Lille, se traduisait par une augmentation de la mortalité totale de 3,9 %, de la mortalité cardiovasculaire de 4,4 %, de la mortalité cardiaque de 5 % et de la mortalité ischémique de 5,7 % (365). Füre et ses collaborateurs (2020) ont également montré que le nombre de PUF déposées dans les différentes régions pulmonaires variait en fonction de la saison de l'année. Ainsi, dans la région bronchique, le nombre de PUF déposées était en moyenne de 4,7 milliards en été et de 18 milliards en hiver, et que ce nombre était encore plus élevé dans la région acineuse des poumons avec 8,3 et 33,8 milliards de PUF, respectivement (366). Par ailleurs, l'utilisation intensive des climatisations dans les bâtiments et véhicules est une source de pollution particulaire additionnelle. Cette saisonnalité des émissions particulaires a été démontrée dans le projet « PARTICLES » réalisé au sein de notre laboratoire et sur lequel a porté mon projet de Master 2 et de thèse de pharmacie (367). Dans ce dernier, il a été démontré que des $\text{PM}_{2,5}$ prélevées à Lille durant des saisons contrastées (*i.e.*, printemps/été et automne/hiver) possédaient une composition chimique variable avec une concentration plus importante en composés inorganiques secondaires SO_4^+ et NH_4^+ durant l'été et en carbone élémentaire et organique l'hiver, suggérant une variabilité des sources impactant la zone d'étude. Cette différence de composition confère aux particules des niveaux de toxicité variable. En plus d'influencer la composition des particules, la température influe sur leur concentration dans l'atmosphère. En effet, les températures chaudes et plus particulièrement les périodes de forte chaleur et d'ensoleillement sont le plus souvent accompagnées de pressions atmosphériques importantes, empêchant la dispersion des polluants au-dessus des villes. Outre cette problématique, la chaleur tend à transformer les particules primaires en particules secondaires fines et ultrafines qui pourront avoir un impact sanitaire plus important que les particules de diamètre plus important. En outre, ces particules présenteront une richesse en allergènes végétaux et notamment en pollens plus conséquente, elle-même favorisée par les périodes de chaleur prolongée. La composition chimique étant l'un des facteurs principaux conditionnant la toxicité des particules, une identification précise des différents composants de ces dernières s'avère donc indispensable à la compréhension de leurs mécanismes d'action toxique.

En ville, les PUF trouvent principalement leur origine dans le transport routier, le chauffage domestique et les activités industrielles. L'évaluation de la teneur en éléments traces métallique (ETM) des PUF prélevées à Lille a pu confirmer ce caractère urbain et industriel. En effet, les ETM retrouvés en grande majorité c'est-à-dire Al, Ca, Fe, Mg et Si sont principalement issus de la combustion de carburant puisqu'ils représentent 82% de la teneur totale en métaux dans le carburant diesel (368). Les additifs des huiles lubrifiantes utilisées pour les moteurs à essence sont également riches en Fe, Ca et Zn (369). Plusieurs études ont par ailleurs déjà démontré que les PUF issues du trafic routier étaient riches en ETM susceptibles de provenir de l'usure des pneus, des interactions pneus/chaussée et de l'utilisation d'huile de moteur (370,371). L'usure des équipements des véhicules (moteurs, freins, pneus) et des revêtements routiers est une source possible de ces PUF. En effet, Ba, Cu, Mo et Sb peuvent provenir de l'abrasion des systèmes de freinage automobile, de même que Zn et Fe peuvent provenir de l'usure des pneus (372–374). Sanders et son équipe (2003) ont d'ailleurs montré que les émissions associées à l'usure des freins pouvaient contenir des PUF riches en métaux (375). Dans une étude dans laquelle Saffari et son équipe (2013) ont réalisé une campagne d'échantillonnage de particules quasi-ultrafines ($PM_{0,25}$) pendant un an, il a été démontré que leur teneur en ETM provenaient des poussières du sol, de l'abrasion des véhicules, de la combustion des huiles et du placage métallique (376). Les sources industrielles prennent également une place prépondérante dans l'origine des ETM particulaires. Ces dernières sont principalement liées à l'incinération des déchets, aux activités sidérurgiques et métallurgiques, à la combustion du charbon, à la pétrochimie et à la production de ciment et de chaux. Outre le Fe, Ba, Zn, Al et Mg issus des émissions des véhicules à essence et diesel, Morishita et son équipe (2011) ont ainsi identifié l'incinération des boues comme étant responsable d'émissions de particules contenant du Cd, Sb, As, Cr, Zn, Rb, K, Ni et Cu, le raffinage pour le La et Ce, la production de ciment et de chaux pour S, Sr, Ca et Mg, et la fabrication de l'acier pour le Fe, Pb et Zn (377). Wu et ses collaborateurs (2007) ont également démontré que les procédés industriels étaient associés à des émissions de particules contenant des métaux, en particulier l'incinération des déchets qui est une source de K, Zn, et Pb, la combustion du charbon qui rejette du Cr et la fabrication de l'acier qui est source de Fe, Mn et Pb (378). L'absence d'activités métallurgiques dans la zone urbaine de Lille explique que les teneurs en métaux soient globalement plus faibles que d'autres villes du Nord-Pas-de-Calais (NPDC) et notamment de la ville portuaire de Dunkerque (143,192). Les résultats obtenus sont néanmoins similaires avec ceux d'une précédente étude réalisée au sein du laboratoire et portant sur des $PM_{2,5}$ prélevées à Lille, et dont les ETM majeurs étaient également Al, Ca, Fe, K, Mg, Na et Si (379). Malgré l'implémentation de systèmes de capture visant à limiter les émissions à la sortie des cheminées industrielles, une inefficacité persiste pour les particules fines et ultrafines (380). Pourtant, les directives européennes 2008/50/CE et 2004/107/CE transposées dans la réglementation française ne prennent en compte que l'As, le Cd, le Ni et le Pb, bien que d'autres métaux retrouvés dans les émissions particulières puissent être préjudiciables pour la santé.

Outre ces ETM, la quantification en HAP, PCB, dioxines et furannes a montré la présence de certains congénères à des concentrations non négligeables. En effet, des concentrations relativement importantes élevées en benzo(a)pyrène, benzo(b)fluoranthène, benzo(e)pyrène, benzo(ghi)pérylène, chrysène et indéno(123cd)pyrène ont été enregistrées. Ces derniers, à l'exception du benzo(e)pyrène, ont été classés comme polluants prioritaires par l'Environmental Protection Agency (EPA). Le benzo(a)pyrène a, de plus, été classé comme cancérigène avéré pour l'Homme par le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC). Ces mêmes analyses réalisées sur des PUF prélevées à Dunkerque avaient montré des concentrations inférieures qui peuvent une nouvelle fois s'expliquer par les différentes sources d'émissions qui sont majoritairement issues des activités métallurgiques à Dunkerque, et du trafic routier à Lille. Les différences de tailles de ces villes, la durées d'échantillonnage et les conditions climatiques pendant la durée des prélèvements pourrait aussi contribuer à ces différences de composition chimique (381). De la même manière, ces mêmes analyses réalisées sur des $PM_{2,5}$ prélevées à Lille ont quant à elles montré des concentrations inférieures pouvant s'expliquer par la différence de taille des particules qui confèrent une plus grande surface spécifique

aux PUF et donc une capacité d'absorption de ces composés nocifs plus importante (367). Par ailleurs, des concentrations relativement importantes en polluants organiques persistants ont été mesurés dans les PUF. Il s'agit de substances organiques qui ont pour caractéristiques d'être persistantes, bioaccumulables, toxiques et mobiles sur de grandes distances et donc largement distribuées dans l'environnement. En effet, des concentrations non négligeables en PCB dioxin-like, dioxines et furannes ont été mesurées dans les PUF. Ces composés trouvent leur toxicité dans leur capacité à se lier à l'AhR, induisant une altération de la détoxification des xénobiotiques et une potentielle accumulation de ces derniers dans l'organisme. En outre, des concentrations dose-dépendantes en endotoxines membranaires des bactéries à Gram négatif ont été mesurées au sein de PUF, témoignant de l'existence d'une fraction biologique au sein des particules. Ces dernières sont connues pour stimuler la réponse pro-inflammatoire et pourraient potentiellement renforcer la réponse de l'organisme à l'égard des particules, même à de faibles concentrations (382). Des études ont par ailleurs démontré l'existence d'une interaction synergique entre les particules diesel et les endotoxines induisant la production accrue de radicaux libres pulmonaires et de cytokines pro-inflammatoires, accompagnée par une infiltration de neutrophiles dans les poumons (383–385). Ainsi, l'évaluation de la composition physico-chimique et biologique des PUF prélevées dans le cadre de ce projet suggère une composition complexe de ces dernières. Un grand nombre de facteurs, qu'ils soient physico-chimiques (*e.g.*, taille, morphologie, capacité à adsorber des composés hautement nocifs) ou environnementaux (*e.g.*, conditions climatiques, localisation, source), influencent la composition de ces dernières, qui est donc évolutive d'un point de vue spatio-temporel. Cette hétérogénéité des particules atmosphériques constitue une difficulté majeure pour l'évaluation de leur niveau de toxicité. Pourtant, la réglementation actuelle ne prend pas en vigueur la diversité de leurs compositions chimiques, n'intégrant que leur aspect massique. Du fait de leur diamètre réduit, les PUF ne participent que faiblement à la masse des aérosols atmosphériques bien qu'elles soient très riches en nombre et n'entrent donc pas en tant que telles dans la réglementation en vigueur. Afin de pallier à cette lacune réglementaire, le potentiel oxydant (POTOX) a été proposé comme une nouvelle métrique, susceptible de compléter les autres métriques actuellement utilisées et insuffisamment prédictives. A terme, la pondération des concentrations massiques des PM, et surtout des PUF, par des indicateurs de POTOX permettrait de mieux évaluer leur réactivité biologique et leur potentiel toxique et, par conséquent, d'avoir une stratégie préventive plus efficace auprès des populations.

2. Potentiel oxydant

A. Évaluation du POTOX des PUF

La figure 48 présente les résultats de la mesure du potentiel oxydant des PUF par les tests du CM-H₂DCFDA (figure 48a), du DTT (figure 48b), du glutathion (figure 48c) et de l'acide ascorbique (figure 48d), exprimés en FC. Pour l'ensemble de ces tests, un contrôle positif, le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), ainsi qu'un contrôle négatif, le sérum physiologique, ont été utilisés. Les valeurs brutes des témoins négatifs pour ces 4 tests étaient respectivement de 21775,7 +/- 1061,0 RFU ; 1,94 +/- 0,01 U Abs ; 0,40 +/- 0,10 et 0,000422 +/- 0,00002 nmol/L/min pour les tests du CM-H₂DCFDA, du DTT, du glutathion et de l'acide ascorbique.

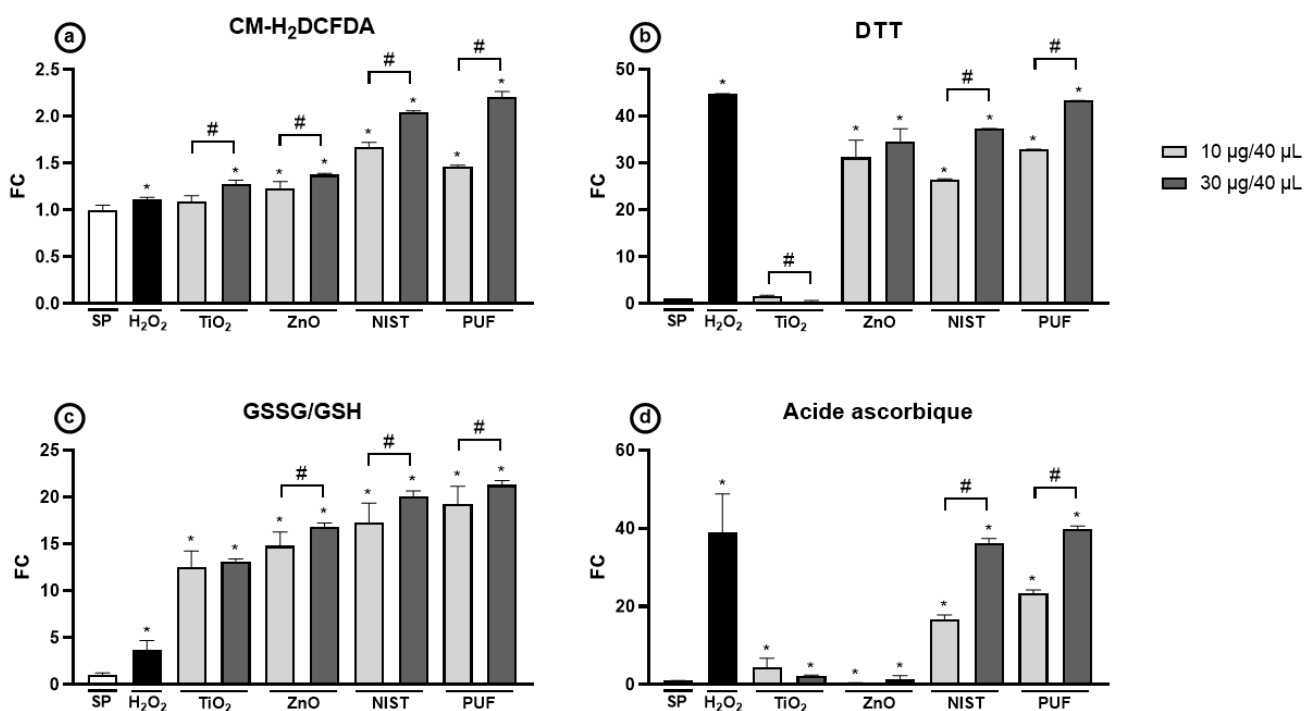


Figure 48 : Étude du potentiel oxydant des PUF par les tests du CM-H₂DCFDA (a), du Dithiothréitol (b), du Glutathion (c) et de l'Acide ascorbique (d) avec utilisation de SP comme contrôle négatif et de contrôles positifs sous forme d'oxydant, le peroxyde d'hydrogène H₂O₂, ainsi que sous forme de nanoparticules de référence : TiO₂, ZnO et NIST. (FC = Fold Change, n = 3, p < 0,05 vs témoins, SP ; p = 0,05#, vs 10 µg/instillation).*

Les données obtenues pour le test du CM-H₂DCFDA ont montré une oxydation significative et progressive de la sonde pour l'ensemble des particules testées. Cette dernière s'est faite de manière dose-dépendante, avec des valeurs moyennes obtenues de 2,21 contre 1,46 avec 30 µg de PUF/instillation et 10 µg de PUF/instillation, respectivement. Des résultats similaires ont été obtenus avec les particules NIST pour lesquelles une oxydation fut observée à hauteur de 1,68 pour la dose la plus faible de particules contre 2,05 pour la dose la plus élevée. L'oxydation induite par les particules de référence TiO₂ et ZnO était, quant à elle, plus faible, mais toujours dose dépendante.

Les résultats obtenus pour le test du DTT, quant à eux, ont montré une consommation significative du DTT présent dans les échantillons en présence des particules NIST et des PUF, et ce, quelle que soit la dose de particules utilisée. Cette oxydation était néanmoins plus importante avec la dose de 30 µg de PUF/instillation, se faisant de manière dose dépendante. En effet, cette dernière a induit une oxydation du DTT à hauteur de 43,3 pour la dose la plus élevée et de 32,9 pour la dose la plus faible de PUF. Des résultats similaires ont été obtenus pour les particules NIST. L'oxydation induite par les particules métalliques a été, quant à elle, très faible voire nulle à l'exception des nanoparticules du ZnO qui ont induit une oxydation importante du DTT.

L'analyse des résultats obtenus pour le glutathion ont montré une augmentation significative du ratio GSSG/GSH pour l'ensemble des particules testées, quelle que soit la dose de PUF étudiée. Cette augmentation s'est faite de manière dose avec des valeurs respectives obtenues de 21,31 et 19,28 pour la dose de 30 µg de PUF/instillation et de 10 µg de PUF/instillation, respectivement. Cette augmentation semblait, de plus, être plus marquée pour les PUF et les NIST par rapport aux nanoparticules métalliques (TiO₂ et ZnO).

Enfin, concernant le test de l'acide ascorbique, les NIST et les PUF ont induit une oxydation importante et dose dépendante de l'ascorbate. En effet, à la dose de 30 µg de PUF/instillation, il a été observé

une oxydation de l'ascorbate à hauteur de 39,9 contre 37,4 pour la dose de 10 µg de PUF/instillation. L'oxydation induite par les nanoparticules métalliques était, quant à elle, très faible.

B. Discussion

Afin de pallier à cette lacune réglementaire, le potentiel oxydant (POTOX) a été proposé comme une nouvelle métrique, susceptible de compléter les autres métriques actuellement utilisées et insuffisamment prédictives. A terme, la pondération des concentrations massiques des PM, et surtout des PUF, par des indicateurs de POTOX permettrait de mieux évaluer leur réactivité biologique et leur potentiel toxique et, par conséquent, d'avoir une stratégie préventive plus efficace auprès des populations.

Dans ce projet de recherche, la mesure du POTOX des PUF, qui correspond à la capacité des différents composés des PUF à générer des ERO et/ou à oxyder les molécules antioxydantes, a été déterminé par 4 méthodes complémentaires acellulaires (*i.e.*, DTT, GSH, CM-H₂DCFDA, et AA) et comparé à celui de nanoparticules de références (*i.e.*, TiO₂, ZnO) ou d'autres particules (*i.e.*, NIST PM₄). Les PUF ont présenté un POTOX relativement important, généralement supérieur à ceux des autres nanomatériaux testés (*i.e.*, TiO₂, ZnO) et équivalent à celui des autres PM urbaines (*i.e.*, NIST PM₄). L'utilisation de ces approches complémentaires pour l'évaluation du POTOX est nécessaire et indispensable afin de prendre en compte l'ensemble des constituants particuliers, la sensibilité de chacun de ces tests vis-à-vis des ERO étant fluctuante. Ainsi, l'AA a une sensibilité accrue à l'égard des métaux, notamment du Fe, Cu, Cr, Mn, Co et Ni. En parallèle, le DTT est lui aussi particulièrement sensible aux métaux de transition mais aussi aux espèces organiques oxygénées telles que les quinones et les HAP. Le test du CM-H₂DCFDA, quant à lui, permet une détection plus spécifique des radicaux nitryle ([•]NO₂), hydroxyle ([•]OH), aloxyle (RO[•]), peroxyde (ROO[•]), du peroxydite (ONOO[•]) et des peroxydes. Enfin, l'oxydation du glutathion reflète les capacités d'oxydation du GSH permet la détection de la plupart des ERO, y compris des peroxydes, des alcénals, des disulfures de protéines et des acides sulféniques, tout en ayant une sensibilité accrue pour le cuivre. Indispensable au maintien de l'homéostasie redox, le glutathion est la molécule antioxydante la plus abondante de l'organisme, constituant le premier rempart vis-à-vis des oxydants environnementaux. De par son intervention dans des réactions de réduction et de conjugaison, il permet l'élimination des peroxydes et de nombreuses molécules électrophiles. En conditions physiologiques, ce dernier est majoritairement retrouvé sous forme réduite (GSH) mais en cas de stress oxydant sa forme oxydée (GSSG), dont le taux n'excède physiologiquement pas les 1 %, devient prédominante. En plus de pouvoir être quantifié dans les PUF, le ratio GSSG/GSH a l'avantage de pouvoir l'être dans les matrices biologiques y compris *in vivo*, permettant ainsi de faire le lien entre ce qu'il se passe dans les milieux acellulaires et ce qu'il se passe réellement dans les milieux biologiques, à savoir les poumons, le cœur, le cerveau, le foie et les reins murins. Ainsi, la combinaison de ces 4 tests a permis de déterminer que les PUF prélevées dans le cadre de ce projet possédaient un POTOX intrinsèque élevé, ces dernières étant sources d'ERO à la fois endogènes et exogènes. En effet, de par leur fraction soluble de même que la réactivité de surface de leur fraction insoluble, elles sont sources exogènes d'ERO. A cela s'ajoute leur capacité à catalyser des réactions cellulaires génératrices d'ERO endogènes telles que la réponse inflammatoire ou le stress mitochondrial. Le POTOX de ces PUF est à mettre en perspectives avec leur composition chimique riche en métaux et métalloïdes, HAP, PCDD, PCDF et PCB. En effet, Zhang et ses collaborateurs (2016) ont démontré que le POTOX pouvait avoir des déterminants chimiques différents en fonction de la taille des particules, les PM_{0,18-2,5} riches en carbone organique et élémentaire ayant un POTOX nettement plus important que les PM_{2,5-10} (386). Par ailleurs, Liu et son équipe (2018) ont démontré l'importance de la bioaccessibilité de la fraction métallique des PUF dans l'induction d'un stress oxydant par des réactions génératrices d'ERO impliquant trois acteurs : les quinones, les métaux et les réducteurs présent au niveau pulmonaire (387). Parmi les métaux impliqués, le Cu, le Fe et le Mn présents à la surface des PUF semblent jouer un rôle clé dans leur

POTOX et dans leur capacité à induire un stress oxydant (159,388). Une autre étude épidémiologique réalisée chez des volontaires sains a par ailleurs démontré qu'une exposition à des PM_{0,3} riches en Ag, Al, Ba, K, Li, Ni, Sn, V et possédant un potentiel oxydant élevé était associée à une augmentation des biomarqueurs systémiques de l'inflammation et du stress oxydant (387). Le stress oxydant étant l'un des mécanismes sous-jacents majoritairement impliqués dans la toxicité des particules en général, et des PUF en particulier, le POTOX de ces PUF a supporté leur capacité à générer des ERO dans des matrices acellulaires et par conséquent, très probablement, au sein des matrices biologiques.

II. Protocole d'exposition et toxicocinétique des PUF

1. Description du protocole d'exposition des souris

Les expérimentations animales nécessaires à l'exécution de ce projet de recherche se sont inscrites en conformité avec la Directive 2010/63/UE du Parlement Européen et du Conseil du 22 septembre 2010, relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques et la charte nationale portant sur l'éthique de l'expérimentation animale et avec la règle des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner). Trois lots de souris (36 souris/groupe) ont été nécessaires : un lot utilisé comme groupe témoin (sérum physiologique, SP) et deux autres exposés à des doses croissantes de PUF, à savoir 10 et 30 μg /instillation intranasale, durant 12 semaines. Un lot de 12 souris de chaque groupe exposé ainsi qu'un lot de 12 souris témoins négatifs ont ensuite été soumis à une période de recouvrement de 3 mois avant d'être sacrifiées. L'ensemble du protocole s'est déroulé dans des conditions optimales en veillant constamment au bien-être animal. Un examen clinique quotidien ainsi qu'une mesure hebdomadaire du poids des animaux furent réalisés (figure 49). Aucun des points limites initialement choisis (*i.e.*, perte de poids rapide, > 20% ; longue période de perte de poids conduisant à un état d'amaigrissement, > 20% ; déficience respiratoire avérée ; présence de larges plaques d'alopécie provoquées par la maladie ; apparence avec poil hérissé, dos rond, abdomen distendu ou léthargie ; paralysie ; saignement par un des orifices ; automutilations persistantes ; lésions interférant avec l'abreuvement ou la prise de nourriture ; diarrhée associé ou si le signe est prolongé) n'a été franchi. Aucun animal n'a donc dû être euthanasié.

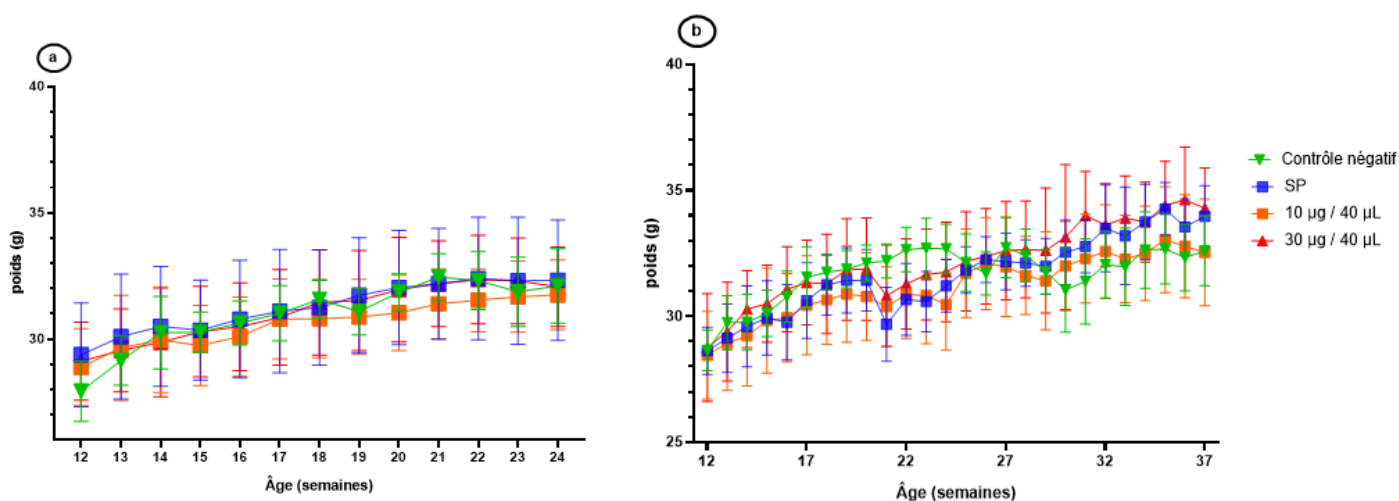


Figure 49 : Suivi du poids corporel des souris lors des périodes d'exposition subchronique avec (b) ou sans (a) période de recouvrement.

2. Tests comportementaux

Un lot de 12 souris par condition d'exposition a subi une série de tests comportementaux directement à la suite du protocole d'exposition. Ces tests, réalisés au sein du plateau d'explorations fonctionnelles de la Plateforme Lilloise en Biologie & Santé (PLBS) de la faculté de médecine de Lille, ont préalablement nécessité un changement d'animalerie et une période d'acclimatation d'une semaine.

A. Actimétrie en openfield

La figure 50 présente les résultats obtenus pour la mesure de la vitesse moyenne en cm/s (figure 50A), de la distance totale parcourue en cm (figure 50B), du temps passé dans le centre de l'arène par rapport au temps passé en périphérie de cette dernière (figure 50C), du % d'immobilité (*i.e.*, < 1 cm/s), de lenteur (*i.e.*, 1 à 5 cm/s) et de rapidité (*i.e.*, > 5 cm/s) (figure 50D, 50E et 50F, respectivement), chez les souris exposées ou non aux PUF pendant 3 mois. Pour l'ensemble de ces paramètres, à l'exception du pourcentage de lenteur, la seule différence statistiquement significative a été observée entre les deux groupes d'exposition, et non en comparaison avec le groupe des souris témoins. En effet, des diminutions significatives de la vitesse moyenne, de la distance totale parcourue, du temps passé dans le centre de l'arène et de la rapidité des souris ont été observées chez les souris exposées à la plus forte dose par rapport aux souris exposées à la plus faible dose de PUF, de même qu'une augmentation significative du pourcentage d'immobilité. Aucune différence significative n'a été identifiée entre les groupes d'exposition et le groupe témoin bien qu'une tendance soit observable entre le groupe de souris exposées à la dose la plus faible de PUF et le groupe témoin. En effet, la vitesse et la rapidité, de même que la distance totale parcourue sont augmentées chez les souris exposées à la dose de 10 µg de PUF/instillation intranasale par rapport au groupe témoin, bien que cela ne soit pas statistiquement significatif. De la même façon, une tendance à la diminution du pourcentage d'immobilité a été observée chez ces mêmes souris. Enfin, concernant le temps passé dans le centre de l'arène par rapport à la périphérie, qui est un paramètre permettant de mesurer le niveau d'anxiété des individus, une tendance à l'augmentation a été observée chez ce même groupe d'individus.

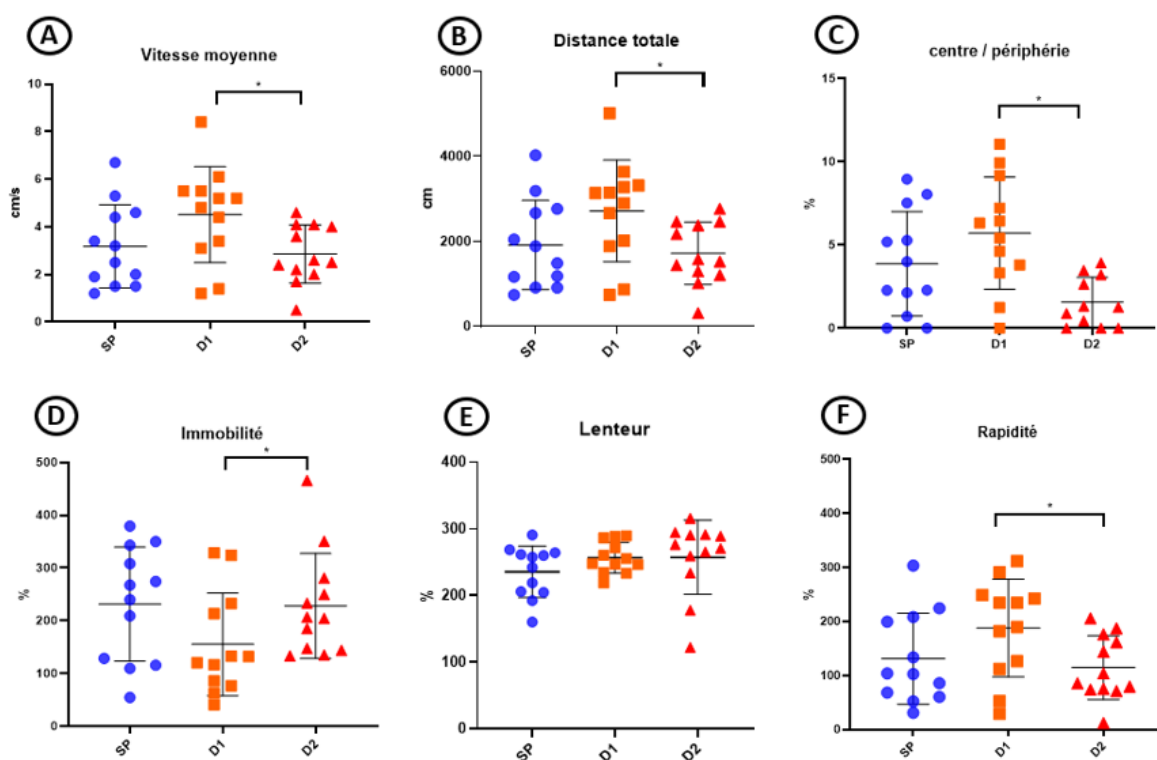


Figure 50 : Vitesse des souris en cm/s (A), distance parcourue en cm (B), temps passe dans le centre de l'arène versus périphérie en % (C), immobilité en % (D), lenteur en % (E) et rapidité en % (F) durant le test de l'actimétrie en openfield (SP = sérum physiologique, D1 = 10 µg/instillation, D2 = 30 µg/instillation, $p < 0,05$ * témoins, SP).

B. Labyrinthe en croix surélevé

La figure 51 présente les résultats obtenus pour la mesure du temps passé dans le bras ouvert et le centre de l'arène (figure 51A), le nombre de « head dipping » (*i.e.*, plongeon de la tête, figure 51B), le nombre de « rearing » (*i.e.*, redressement de tête, figure 51C), le nombre de « grooming » (*i.e.*, toilettages, figure 51D), le nombre de « stretch posture » (*i.e.*, étirements du corps, figure 51E), le nombre de head dipping par seconde dans le bras ouvert (figure 51F), le nombre de rearing par seconde dans le bras fermé (figure 51G) et le nombre de grooming par seconde dans le bras fermé (figure 51H), chez les souris exposées ou non aux PUF pendant 3 mois.

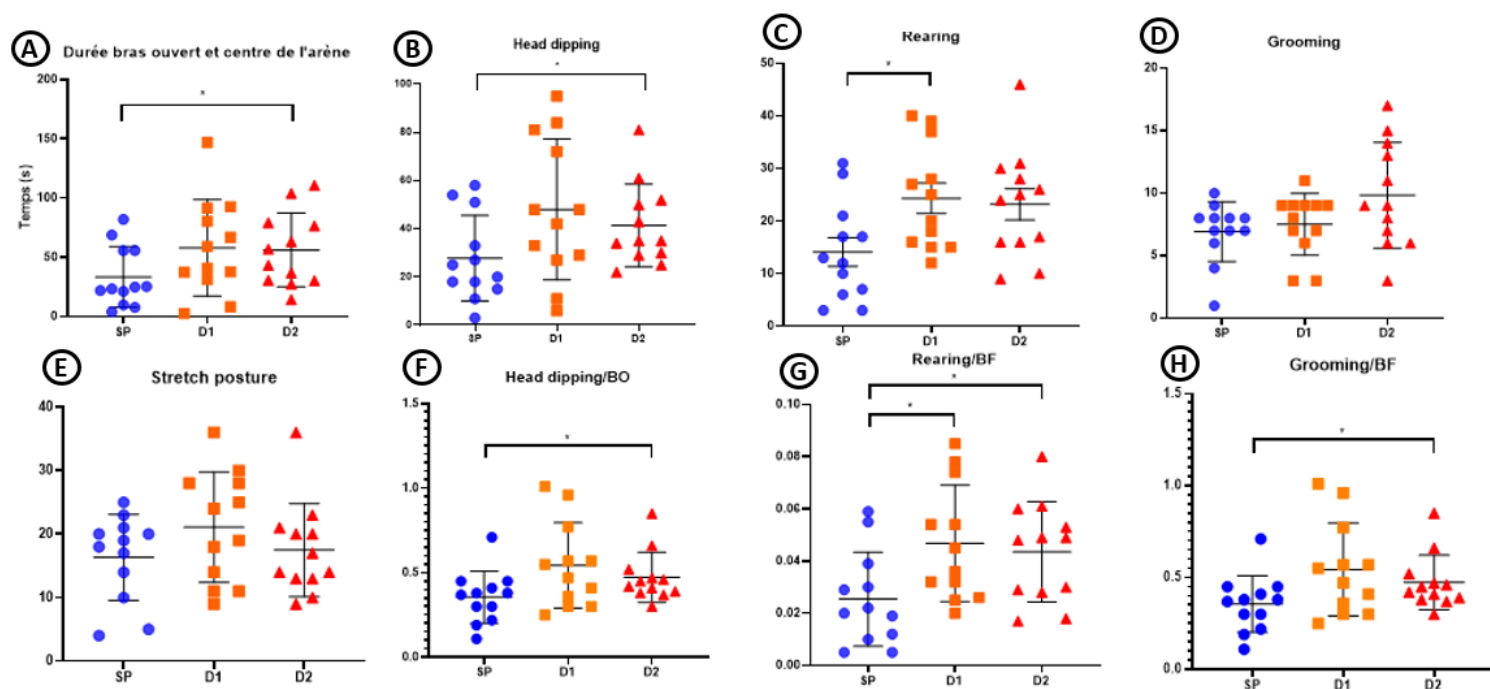


Figure 51 : Temps passé dans le bras ouvert et le centre de l'arène (A), Nombre de head dipping (B), de Rearing (C), de grooming (D), de stretch posture (E), nombre de head dipping par seconde dans le bras ouvert (F), nombre de rearing par seconde dans le bras fermé (G), nombre de grooming par seconde dans le bras fermé (H), durant le test du labyrinthe en croix surélevé. (SP = sérum physiologique, D1 = 10 µg/instillation, D2 = 30 µg/instillation), p < 0,05 témoins, SP).*

Des différences significatives ont été observées entre le groupe de souris exposé à la dose la plus élevée de PUF et le groupe témoin notamment une augmentation significative de la durée passée dans le bras ouvert et le centre, du nombre de head dipping, du nombre de head dipping par seconde dans le bras ouvert, ainsi que du nombre de rearing et de grooming par seconde dans le bras fermé. Compte tenu de la grande disparité des individus du groupe exposé à la dose la plus faible de PUF, aucune différence significative n'a été constatée par rapport au groupe témoin, à l'exception d'une augmentation du nombre total de rearing et du nombre de rearing effectué par seconde dans le bras fermé. Quelles que soient les conditions d'exposition, aucune différence significative n'a été observée concernant le nombre de toilettage et de stretch posture bien qu'une tendance à l'augmentation ait été observée.

C. Évitement passif

La figure 52 présente les résultats obtenus pour la latence d'entrée dans le compartiment sombre pendant la phase d'acquisition et de rétention. Quel que soit le groupe étudié, les souris ont bien mémorisé le choc électrique puisqu'il y avait une nette augmentation du temps de latence entre la phase d'acquisition et la phase de rétention. À la suite d'une exposition sub-chronique aux PUF, aucune différence significative n'a été constatée entre les différents groupes, quelle que soit la phase étudiée. Cependant, il est possible de constater que les souris exposées à la dose la plus faible de PUF avaient tendance à retourner dans le compartiment sombre plus rapidement que les souris témoins, bien que cela ne soit pas significatif d'un point de vue statistique.

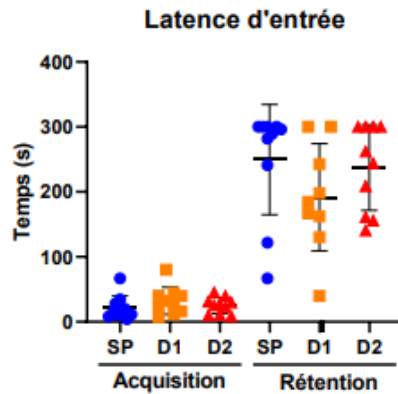


Figure 52 : Latence d'entrée dans le compartiment sombre pendant les phases d'acquisition et de rétention exprimée en secondes (SP = sérum physiologique, D1 = 10 μ g/instillation, D2 = 30 μ g/instillation).

D. Y-maze spatial

La figure 53 présente les résultats obtenus pour la mesure du nombre d'entrées dans le bras nouveau, exprimé en %, chez les souris exposées ou non aux PUF. À la suite d'une exposition sub-chronique aux PUF, aucune modification significative n'est observée par rapport au groupe témoin.

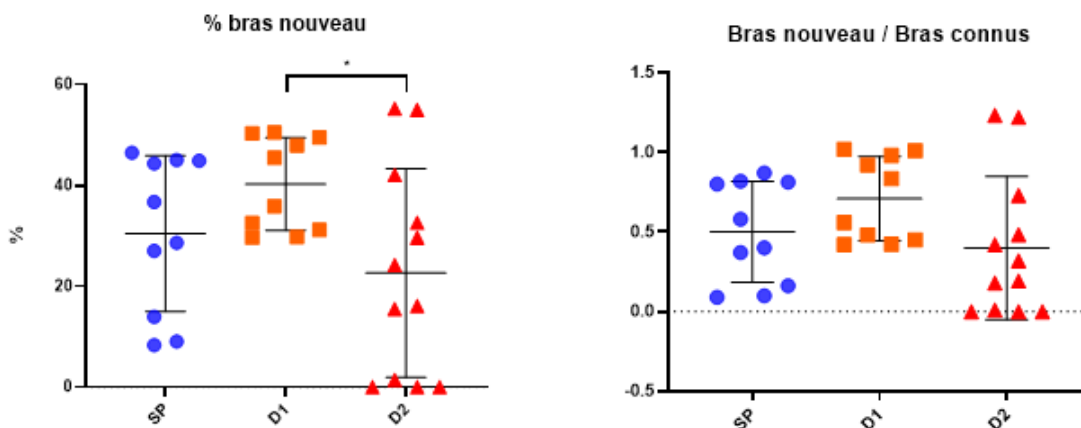


Figure 53 : Temps passé dans le bras nouveau exprimé en % (A), temps passé dans le bras nouveau par rapport au bras connu (B), lors du test du Y-maze spatial (SP = sérum physiologique, D1 = 10 μ g/instillation, D2 = 30 μ g/instillation, $p < 0,05^*$ témoins, SP).

E. Alternance spontanée en Y-maze

La figure 54 présente les résultats obtenus pour l'alternance spontanée exprimée en % (figure 54A) ainsi que pour le nombre d'entrée dans le bras nouveau (figure 54B) chez les souris exposées ou non aux PUF. Concernant le premier paramètre, aucune modification significative n'a été observée, quelles que soient les conditions d'exposition étudiées. Pour ce qui est du second paramètre, à la suite d'une exposition sub-chronique aux PUF, une augmentation significative a été observée chez les souris exposées à la dose la plus faible de PUF mais pas avec la dose la plus élevée, comparativement aux souris témoins. Une diminution significative de ce paramètre a également été observée chez les souris exposées à la dose la plus élevée de PUF, par rapport aux souris exposées à la dose la plus faible.

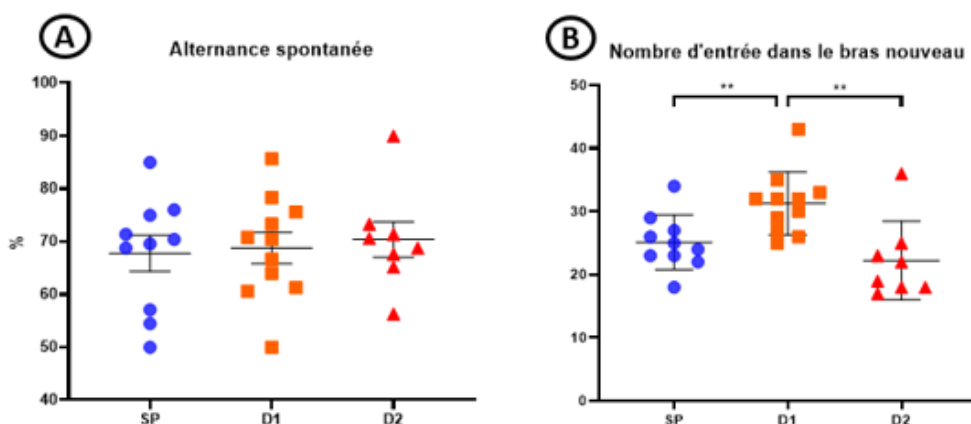


Figure 54 : Alternance spontanée exprimée en % (A) et nombre d'entrées dans le bras nouveau (B) (SP = sérum physiologique, D1 = 10 µg/instillation, D2 = 30 µg/instillation, p < 0,01** témoins, SP).

F. Reconnaissance d'objet nouveau

Le protocole de ce test imposant d'exclure les souris ne s'étant pas rendues au centre de l'arène afin de se familiariser avec les objets s'y trouvant lors de la phase d'acclimatation, les résultats obtenus n'ont pas été exploitables. En effet, le nombre de souris non exclues après la phase d'habituation est demeuré insuffisant pour réaliser des tests statistiques. L'hypothèse retenue pour expliquer ce phénomène est qu'il devait y avoir des résidus d'odeurs de souris C57BL/6 ayant réalisées ce test la veille, bien que l'arène soit nettoyée de manière rigoureuse à l'éthanol, ce qui serait donc une source de stress pour les souris BALB/c utilisées dans le cadre de notre projet.

G. Discussion

Dans le cadre de ce projet de recherche, des souris Balb/cJrj mâles ont été choisies comme modèle d'étude. Ces dernières sont décrites comme ayant une sensibilité moyenne au développement des pathologies et notamment des cancers en réponse à un stress chimique, ce qui les rend représentatives de la sensibilité moyenne des individus (345). De ce fait, il s'agit d'un modèle très fréquemment employé dans les études de toxicité des xénobiotiques et plus particulièrement des aérocontaminants. Seules des souris de sexe mâle ont été utilisées, permettant ainsi d'éviter l'influence du cycle hormonal nettement plus prononcé chez la femelle. Néanmoins, une validation des résultats obtenus devra être envisagée chez des souris femelles, l'influence du genre dans l'impact sanitaire des polluants atmosphériques étant désormais avérée (389–391). Afin de pouvoir obtenir une puissance statistique suffisante pour mettre en évidence des différences significatives tout en respectant la règle de 3R « Réduire, Remplacer, Raffiner », un total de 120 souris réparties en 6 groupes de 6 souris chacun, a été employé.

Ces souris ont été exposées par instillations intranasales à 40 µL de sérum physiologique pour les groupes témoins, ou à différentes doses de 10 ou 30 µg de PUF urbaines suspendus dans 40 µL de sérum physiologique pour les groupes exposés, à raison de 2 expositions par semaine pendant 12 semaines (90 jours) pour un total de 24 instillations intranasales. Cette durée d'exposition, qui équivaut à une exposition d'environ 10 ans chez l'Homme, permet d'avoir un rationnel avec les expositions quotidiennes des personnes habitant en milieu urbain. En plus d'être très fréquemment employée dans des études toxicologiques similaires, la dose de 10 µg présente l'avantage d'être une dose réaliste et représentative du niveau d'exposition des personnes habitant dans les villes polluées lors des pics de pollution. En effet, la fréquence respiratoire de la souris étant en moyenne de 50 mL/min, la dose de 10 µg administrée par instillation intranasale à chaque exposition est l'équivalent en masse chez l'Homme d'une concentration de particules atmosphériques de l'ordre de 150 µg/m³ d'air (392). Actuellement, aucune donnée n'est disponible concernant la distribution des PUF (*i.e.*, PM_{0,1}) dans l'atmosphère, la surveillance des émissions particulières ne prenant en compte que les particules totales en suspension, les PM₁₀, les PM_{2,5} et plus rarement les PM₁. De la même manière, l'indice européen de la qualité de l'air et son équivalent national, l'indice « ATMO », qui cherchent à évaluer quotidiennement la qualité de l'air, ne prennent en considération que 5 polluants majeurs de l'atmosphère parmi lesquels les PM₁₀ et PM_{2,5}, faute de données concernant les PUF. Néanmoins, en se référant aux PM₁₀ qui incluent par définition les PUF, la concentration de 150 µg/m³ correspond approximativement à ce qui peut être retrouvé lors d'un pic de pollution en France, selon le réseau régional de surveillance de la qualité de l'air « Atmo Hauts-de-France » (393). Or, ces pics de pollution sont assez récurrents dans les Hauts de France, puisqu'en 2022, 19 jours d'épisodes de pollution aux PM₁₀ avaient été enregistrés, dont 5 jours dépassant le seuil d'information et de recommandation fixé à 50 µg/m³, 13 jours d'alerte sur persistance (*i.e.*, dépassement du niveau d'information et de recommandation pendant plusieurs jours), et un jour dépassant le seuil d'alerte journalier français de 80 µg/m³ (394). De plus, il s'agit d'une concentration observable lors d'événements ponctuels tels que les incendies de forêt, comme constaté en 2009 à Marseille lors d'un feu de végétation durant lequel l'une des stations de surveillance de la qualité de l'air avait mesuré une concentration en PM₁₀ passer de 52 µg/m³ en moyenne avant l'incendie à 158 µg/m³ en moyenne durant l'incendie, atteignant une concentration horaire maximale de 302 µg/m³ (395). Lors de ce même incendie, une autre station avait par ailleurs mesuré la concentration en PM_{2,5} passer de 22 à 43 µg/m³ en moyenne sur les mêmes périodes, atteignant une concentration horaire maximale de 186 µg/m³. Bien que plutôt rare en Europe, cette concentration de 150 µg/m³ est régulièrement dépassée en Chine, atteignant jusqu'à 400 µg/m³ à Pékin de manière récurrente que ce soit pour les PM₁₀ ou les PM_{2,5} (396,397). En janvier 2013, Pékin avait d'ailleurs enregistré son record de pollution avec 993 µm de PM_{2,5}/m³, représentant plus de 60 fois le seuil recommandé par l'OMS (396,398,399). En outre, le protocole d'exposition choisi, d'une durée de 3 mois, déjà utilisé dans le projet « Polluants atmosphériques nanoparticulaires : identification, caractérisation physico-chimique et recherche de biomarqueurs de pathogénicité pulmonaire » (NANATMOPATH, ANSES, 2014-2017) au sein de notre laboratoire, a montré qu'il permettait une distribution pulmonaire homogène des PUF et que la dose de 10 µg/instillation intranasale employée était suffisante pour induire des réponses observables au niveau moléculaire, cellulaire et histologique dans les poumons des souris exposées. Enfin, la dose de 30 µg de PUF a quant à elle été utilisée pour observer les effets toxiques induits en cas d'exposition à une dose plus importante de particules.

Ces PUF ont été introduites par instillations intranasales, technique d'exposition simple et peu coûteuse ayant pour avantages d'éviter l'exposition systémique en ciblant majoritairement la voie respiratoire. Ceci lui confère l'avantage d'induire une distribution pulmonaire homogène des particules qui parcourent ainsi l'arbre respiratoire dans son ensemble, depuis le nez jusqu'aux poumons, contrairement à l'exposition intratrachéale (140,141). Bien plus naturelle que le recours aux instillations intratrachéales, cette méthode

indolore et non-invasive ne nécessite pas de contention de l'animal, permettant ainsi de limiter le stress de ce dernier. De plus, l'anesthésie légère et non invasive employée offre la possibilité d'utiliser cette technique de façon répétée, permettant une exposition à long terme des animaux. En outre, il s'agit d'un procédé fréquemment utilisé dans le cadre des études toxicologiques portant sur les PM (142–144). Comme toute méthode d'exposition, cette technique présente aussi des inconvénients. En effet, ce modèle d'exposition affecterait la distribution des PM en fonction de leur Dae et ne refléterait pas réellement les interactions des PM avec le système respiratoire, contrairement à l'exposition contrôlée par inhalation directe d'aérosols (*i.e.*, technique dites "nose-only") (145). Bien qu'étant la méthode d'exposition la plus réaliste, cette dernière nécessite des quantités importantes de PM environnementales dont l'accès est très limité, ne rendant pas cela possible dans le cadre de ce projet. C'est pourquoi le mode d'exposition par instillations intranasales a été jugé comme étant le plus adapté ici. Après avoir effectués les prélèvements particuliers journaliers et collectée une quantité suffisante de PUF, les expositions ont pu être initiées. L'ensemble du protocole d'exposition s'est déroulé dans des conditions optimales en veillant quotidiennement au bien-être animal. Aucun des points limites initialement choisis (*i.e.*, perte de poids rapide ; longue période de perte de poids conduisant à un état d'amaigrissement ; déficience respiratoire avérée ; présence de larges plaques d'alopécie provoquées par la maladie ; apparence avec poil hérissé, dos rond, abdomen distendu ou léthargie ; paralysie ; saignement par un des orifices ; automutilations persistantes ; lésions interférant avec l'abreuvement ou la prise de nourriture ; diarrhée associé ou si le signe est prolongé) n'a été franchis. Alors que le poids des souris exposées au sérum physiologique et à la dose de 30 µg/instillation continue de croître, le poids des souris témoins et des souris exposées à la dose de 10 µg/instillations n'évolue pas et stagne. À noter qu'aucun animal n'a dû être euthanasié au cours du protocole.

En plus de veiller quotidiennement au bien-être animal, une attention particulière a été portée sur les éventuelles modifications de comportement et l'identification des changements d'activité des souris utilisées dans le cadre de ce projet. Des manifestations biologiques à connotation cérébrale, telles qu'une légère agressivité et une anxiété plus importante, ont ainsi pu être constatées à la suite des expositions aux PUF, en plus d'avoir déjà été constaté dans un ancien projet portant sur les PM_{2,5}, nous encourageant à initier une série de tests comportementaux visant à étudier les fonctions motrice, émotionnelle, d'apprentissage et de mémoire. Globalement, l'ensemble des résultats obtenus a suggéré une hyperactivité et une désinhibition des souris exposées à la dose la plus faible de PUF qui, de manière surprenante, n'est pas présente chez les souris exposées à la dose la plus élevée de PUF. Deux hypothèses pourraient expliquer ce phénomène : (1) la quantité moindre de PUF dans la dose de 10 µg les rendraient plus solubles et donc plus facilement transportables au niveau cérébral. En parallèle, la quantité de PUF plus importante dans la dose de 30 µg conduirait à une saturation de l'épithélium nasale et donc à un transport moindre de ces dernières au niveau cérébral. (2) la mise en place d'un mécanisme compensatoire d'adaptation à la suite des expositions à la forte dose de PUF. En parallèle, aucun trouble de la mémoire de travail ni de la mémoire émotionnelle n'a été constaté. A ce jour, aucune étude n'a cherché à étudier l'impact de la fraction ultrafine de la pollution atmosphérique sur le comportement de souris adultes exposées de manière sub-chronique, rendant la comparaison de nos résultats difficile. Une seule étude, réalisée chez des souris 3xTgAD servant de modèle de la maladie d'Alzheimer et des souris témoins non transgéniques, exposées de manière subaiguë aux PUF à l'âge de 12,5 mois en corps entier 4 heures par jour, 4 jours par semaine pendant 2 semaines, a montré des déficits de la mémoire spatiale à court terme et des altérations de l'apprentissage, sans effet sur l'activité locomotrice, indépendamment du contexte pathologique (400). Un certain nombre d'études a par ailleurs cherché à évaluer l'impact des PUF sur la fonction cognitive lors de la période de développement des souriceaux. Cory-Slechta et son équipe (2018) ont ainsi montré que l'exposition de souriceaux mâles durant cette période induisait des altérations spécifiques des fonctions d'apprentissage et de mémoire, tandis que l'exposition des femelles induisait des altérations du comportement

motivationnel (401). Ces troubles comportementaux sexe-dépendants des souris faisant suite à une exposition aux PUF ont également été démontrés dans d'autres études (116,122). En plus de ces déficits cognitifs, l'exposition post-natale précoce aux PUF induirait une altération du comportement social (402). Le nombre d'études cherchant à évaluer l'impact de l'exposition aux particules fines sur les fonctions cognitives est un peu plus conséquent. À titre d'exemple, Shih et son équipe (2018) ont déterminé que l'exposition sub-chronique aux PM_{10} induisait un déficit de la mémoire à court terme sans changement de l'activité motrice chez des rats Sprague Dawley (403). Shou et ses collaborateurs (2020) ont également montré l'induction d'un déclin cognitif et d'une neuroinflammation à la suite d'une exposition chronique aux $PM_{2.5}$ chez des souris C57BL/6 (404). Le nombre encore très restreint d'études portant spécifiquement sur la fraction ultrafine de la pollution atmosphérique rend la comparaison des résultats obtenus dans le cadre de notre projet très difficile. Néanmoins, l'étude élargie de la littérature apportent de nouvelles preuves quant à l'impact sanitaire des particules atmosphériques sur la fonction cognitive. En outre, bien que les études cherchant à évaluer les fonctions cognitives soient le plus souvent réalisées sur des souris C57BL/6 et Balb/c, ces dernières présentent des différences majeures qui se doivent d'être prises en compte lors du choix du modèle d'étude. En effet, il a été démontré que les souris Balb/c étaient beaucoup plus sensibles aux situations de stress, susceptibles d'altérer les résultats des tests comportementaux (405). À titre d'exemple, ces dernières présentent une mémoire conditionnée par la peur naturellement beaucoup plus importante que les souris C57BL/6, les rendant ainsi beaucoup plus sensibles au choc électrique reçu lors du test d'évitement passif. De la même manière, leur sensibilité accrue au stress peut stimuler leur comportement exploratoire et influencer sur les résultats de certains tests tel qu'un nombre d'alternances beaucoup plus élevé lors du test de l'alternance spontanée en Y-maze. Pris ensemble, ces paramètres indiquent qu'il serait préférable d'utiliser des souris C57BL/6 pour nos projets futurs dans lesquels l'évaluation de la fonction cognitive serait un des objectifs principaux. Les modifications de comportement observés dans le cadre de notre projet amènent néanmoins à s'interroger sur la distribution et le passage systémiques des PUF.

3. Étude de la distribution des PUF

A. Observations par microscopie photonique et électronique à transmission

Les premières observations effectuées par microscopie optique sur les LBA et les biopsies pulmonaires des souris ont montré un afflux de cellules immunitaires de type polynucléaires neutrophiles et lymphocytes ainsi que des amas de PUF au sein des vésicules macrophagiques persistants jusqu'à trois mois après la dernière exposition dans les groupes de souris exposées aux PUF (figures 55 et 56), confirmant ainsi la distribution homogène des PUF au niveau pulmonaire après instillation intranasale. Les observations réalisées par MET au niveau pulmonaire ont montré la ciliation sur le pôle apical des macrophages et l'internalisation des PUF au sein de leurs vésicules, confortant les observations histologiques (figure 57).

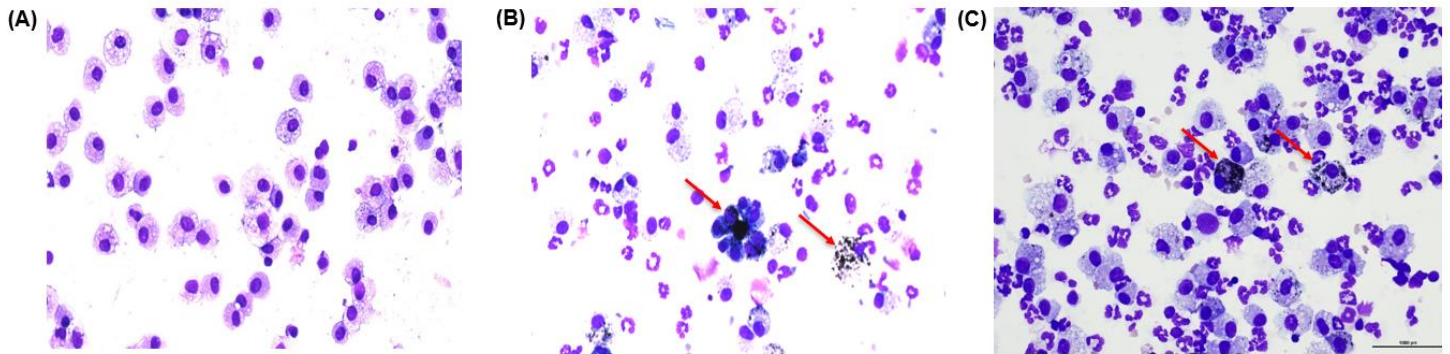


Figure 55 : Analyses cytologiques de LBA de souris exposées au sérum physiologique (A), à la dose de 10 µg de PUF/instillation (B) et à la dose de 30 µg de PUF/instillation, 24 h après le protocole d'exposition sub-chronique (x200) : Macrophages alvéolaires pigmentés indiqués par les flèches rouges (B et C).

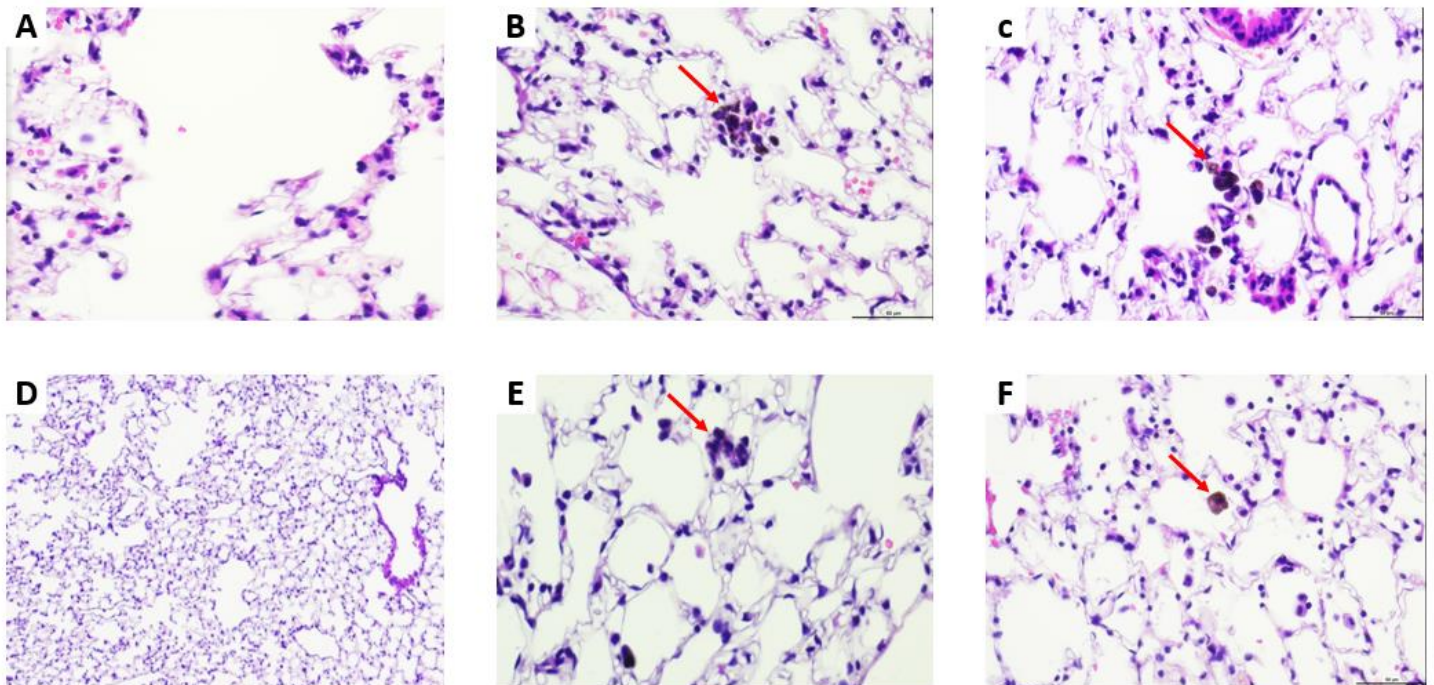


Figure 56 : Observations histologiques de coupes de poumons de souris exposées au sérum physiologique (A,D), à la dose de 10 µg de PUF/instillation (B,E) et à la dose de 30 µg de PUF/instillation (C,F), 24 h après le protocole d'exposition sub-chronique (x200 : A,B,C) et après la période de recouvrement (x40: D et x200: E,F) : Macrophages alvéolaires pigmentés indiqués par les flèches rouges (B, C, E, F).

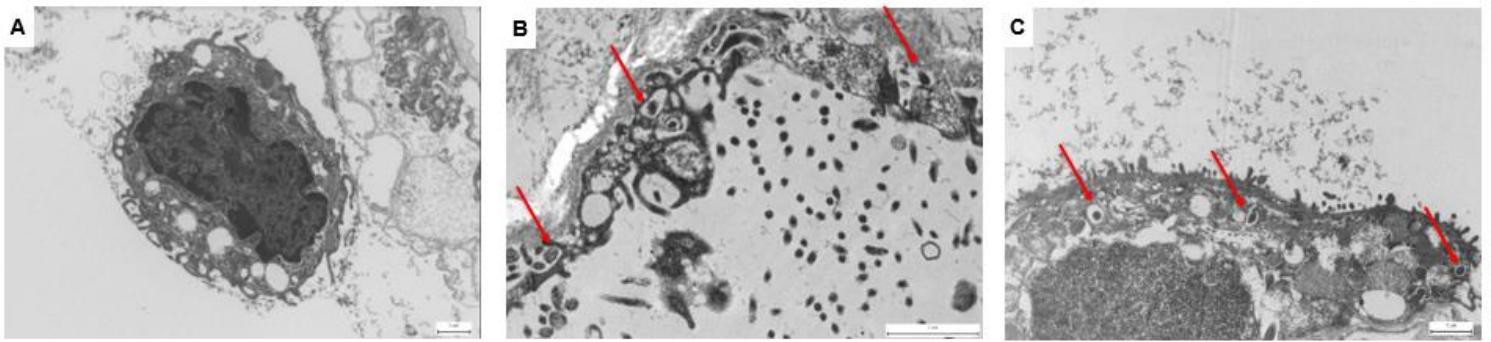


Figure 57 : Images de poumons de souris exposées au sérum physiologiques (A), à la dose de 10 µg/instillation (B) ou de 30 µg de PUF/instillation (C) obtenues par Microscopie Electronique à Transmission : (A, x3597) Macrophage vide, (B x7750 et Cx4646) Coupes cellulaires montrant la présence de pseudopodes et d'amas particulières au sein des vésicules macrophagiques, indiqués par des flèches rouges.

Les observations effectuées par MET au niveau cardiaque et cérébral n'ont pas montré, quant à elles, de modifications notables entre les différents groupes d'exposition (figures 58 et 59). En effet, aucun argument n'a suggéré la présence de PUF au sein de ces organes à l'échelle ultra-structurale. Au niveau cardiaque, des mitochondries altérées ont parfois pu être observées mais celles-ci semblaient artéfactuelles. Cependant, les biopsies utilisées pour la MET ayant une taille très réduite (*i.e.*, $\approx 1 \text{ mm}^3$), la représentativité de ces derniers n'est par conséquent que très limitée vis-à-vis des organes entiers étudiés.

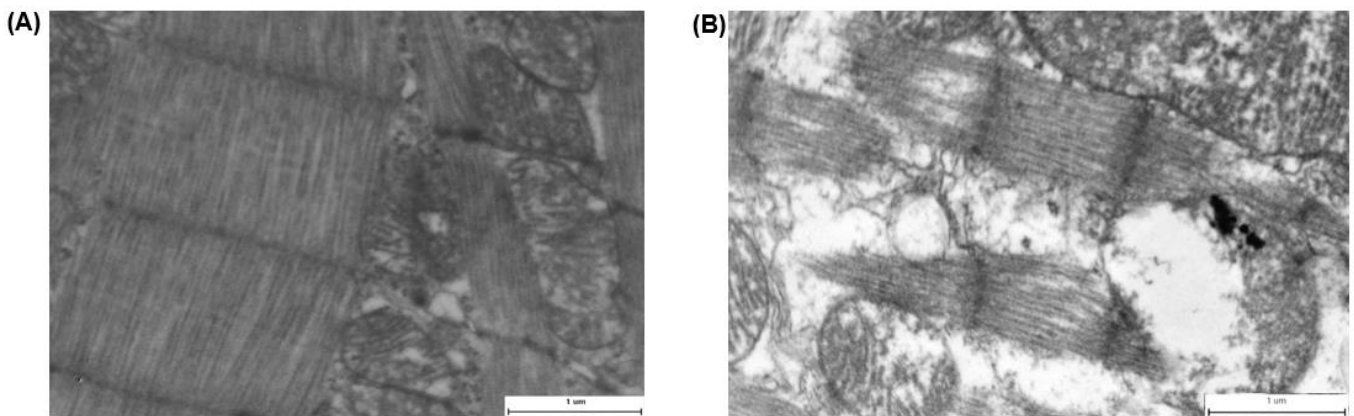


Figure 58 : Images de muscle cardiaque avec présence de mitochondries chez une souris exposée au sérum physiologique (A, x 7750), et exposée à une dose de 10 µg de PUF/instillation (B, x 10000) obtenues par Microscopie Electronique à Transmission.

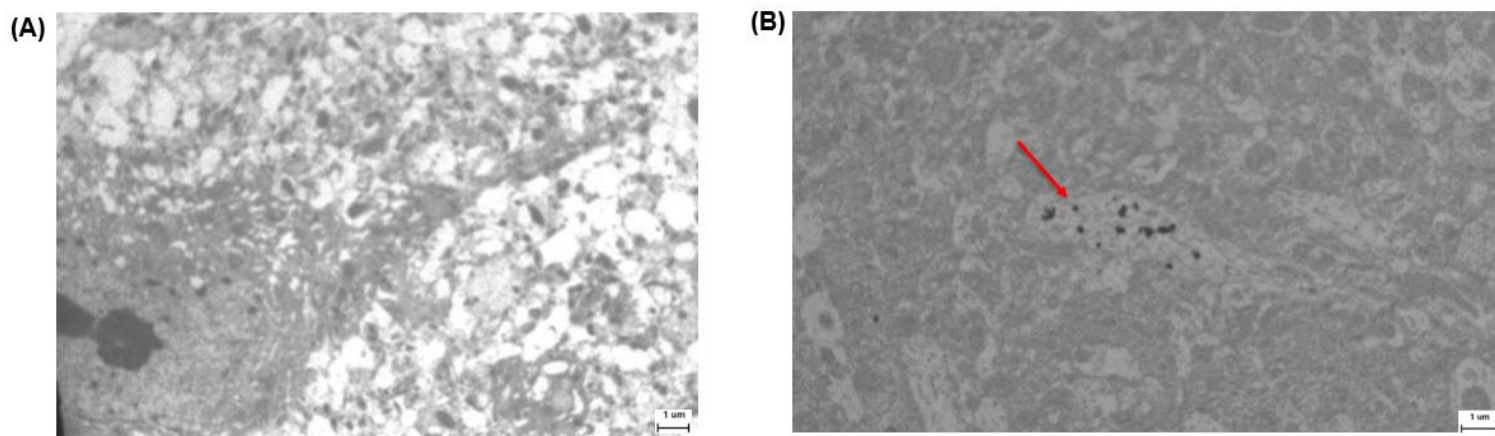


Figure 59 : Images du corps cellulaire d'un neurone avec son axone chez une souris exposée au sérum physiologique (A, x1670) et exposée à une dose de 10 µg de PUF/instillation (B, x2156), obtenues par Microscopie Electronique à Transmission. Présence de PUF indiquées par la flèche rouge.

B. Étude du profil métallique tissulaire et sanguin

Une comparaison entre les teneurs retrouvées chez les souris non exposées et celles exposées à faible ou forte dose de PUF par rapport à la dose en éléments instillée a permis de définir les éléments métalliques dont l'impact pouvait être significatif. Ainsi le K, Fe, La, Mo, Rb, Sb, Se, Sn et Zn présentaient des ajouts théoriques (différence entre ce qui est naturellement présent dans les organes et ce qui a été instillé dans les souris par l'intermédiaire des suspensions de PUF) soit trop faibles, soit incohérents avec ce qui est mesuré sur les organes après exposition. L'incohérence peut être liée à une grande variabilité entre les souris ou à des apports en éléments provenant d'autres sources d'exposition telle que l'alimentation. Concernant le sang, il est apparu que les teneurs étaient très faibles et peu variables avant ou après exposition pour la majorité des éléments, ce qui semble indiqué un transfert rapide depuis la circulation systémique vers les organes d'épuration notamment.

Les éléments qui présentaient des résultats relativement cohérents sont le Cr, Cs, Cu, Mn, V, Cd et Co pour lesquels le tableau 39 reporte les organes présentant un enrichissement en éléments (exposition forte) par rapport à des souris non exposées.

Tableau 39 : Enrichissement en métaux des organes-cibles après l'exposition sub-chronique des souris aux PUF.

Éléments	Poumons	Cœur	Reins	Foie	Cerveau
Cr			+		
Cs	+		++	++	
Cu			++	++	+
Mn	+		++	++	
V	+				
Cd	+		+	+	
Co	+		++	++	+

Il est ainsi possible de constater une augmentation significative de la teneur de l'ensemble de ces éléments à l'exception du V dans les organes de filtration (*i.e.*, reins et foie). Dans les poumons, tous les éléments étaient significativement augmentés à l'exception du Cr et du Cu tandis que dans le cerveau, seules

les teneurs en Cu et en Co étaient significatives. Enfin, aucune augmentation significative en éléments métalliques n'a été constatée dans le cœur.

C. Mesure de l'expression génique de gènes impliqués dans le métabolisme des HAP et dans la séquestration des métaux

Les niveaux d'expression des gènes *Ahr*, *Cyp1a1*, *Cyp1b1*, *Mt1*, *Mt2*, *Mt3* et *Mt4* ont été mesurés par RT-qPCR dans 5 organes cibles (poumons, cœur, cerveau, foie et reins) des souris exposées ou non aux PUF (figure 60).

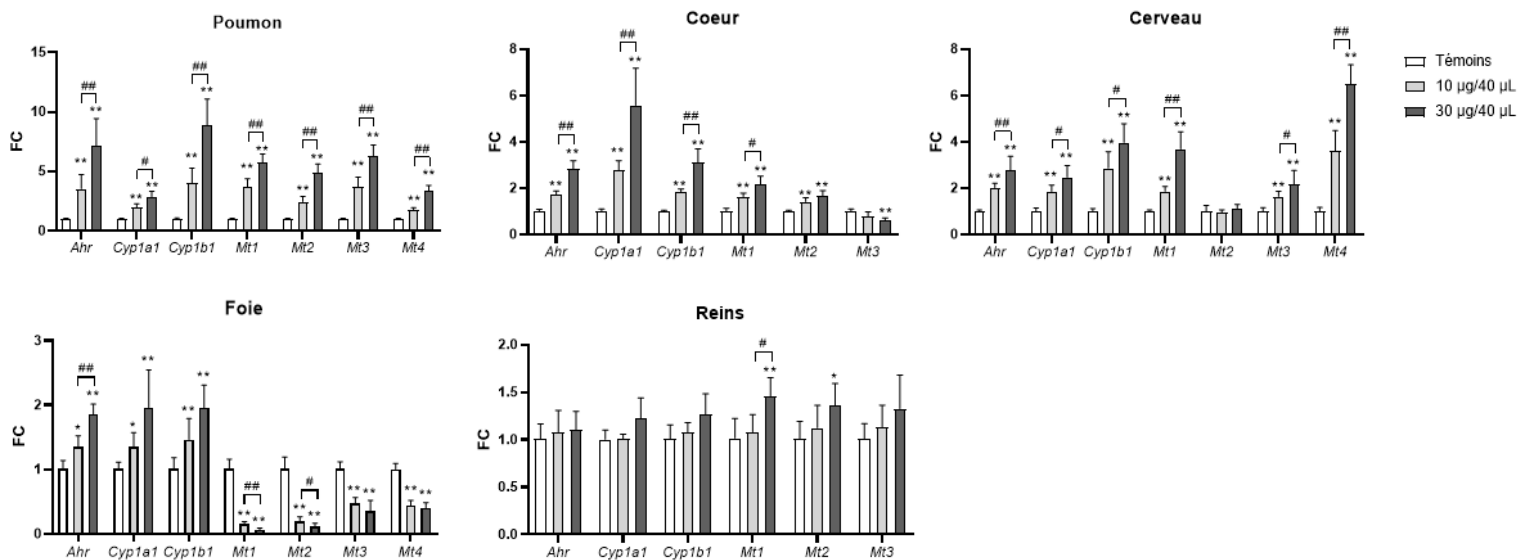


Figure 60 : Expression génique du AhR, des métallothionéines (i.e., Mt1, 2, 3 et 4) et des cytochromes P450 (i.e., Cyp1a1 et 1b1) dans les organes-cibles, 24 h après l'exposition sub-chronique des souris aux PUF. (FC = Fold Change ; p < 0,05, p < 0,01** vs Témoins, SP ; p < 0,05#, p < 0,01## vs 10 µg/instillation).*

Les résultats obtenus pour *Ahr*, *Cyp1a1* et *Cyp1b1* ont montré que leur expression était significativement augmentée dans l'ensemble des organes à l'exception des reins, quelle que soit la dose de PUF étudiée. Cette augmentation était d'autant plus importante que la dosée testée était élevée, atteignant à titre d'exemples, des FC de 3,57 et 7,15 pour *Ahr*, et de 4,07 et 8,91 pour *Cyp1b1* au niveau pulmonaire pour les doses respectives de 10 µg et 30 µg de PUF/instillation intranasale. De plus, dans l'ensemble des organes étudiés, cette augmentation était dose-dépendante pour l'ensemble des paramètres, à l'exception de l'expression des cytochromes dans le foie pour lesquelles une tendance était tout de même observable. Il est néanmoins possible de constater que, dans cet organe, les FC observés n'étaient que rarement supérieurs à la valeur seuil de 1,5, suggérant que ces observations n'auront que peu d'impact d'un point de vue biologique.

Concernant les métallothionéines, les profils d'expression diffèrent en fonction de l'enzyme et de l'organe étudiés. En effet, dans les poumons, l'expression génique de l'ensemble des métallothionéines était significativement augmentée de manière dose-dépendante à la suite d'une exposition sub-chronique aux PUF. Ainsi, dans cet organe, l'expression des *Mt1*, *2*, *3* et *4* a atteint des FC respectifs de 3,69 ; 2,48 ; 3,74 et 1,78 à la dose de 10 µg de PUF/instillation intranasale, et de 5,74 ; 4,86 ; 6,29 et 3,37 à la dose 30 µg de PUF/instillation intranasale.

Dans le cœur, il est possible de constater un profil similaire pour *Mt1* et *Mt2* avec des FC respectifs de 1,64 et 1,43 à la dose de 10 µg de PUF/instillation intranasale et de 2,16 et 1,68 à la dose de 30 µg de

PUF/institution intranasale. *A contrario*, une diminution significative de *Mt3* a été observée à la suite d'une exposition sub-chronique à la dose de 30 µg de PUF/institution atteignant un FC de 0,63 tandis que *Mt4* n'était pas du tout exprimé. Les FC observés étaient néanmoins plus faibles que ceux observés dans les poumons, ne dépassant pas la valeur seuil de significativité biologique de 1,5.

Dans le cerveau, l'expression génique de l'ensemble de ces enzymes était significativement augmentée de manière dose-dépendante quelle que soit la dose de PUF étudiée, à l'exception de *Mt2* pour lequel aucun effet significatif n'a été observé. Ainsi, dans cet organe, l'expression des *Mt1*, 3 et 4 a atteint des FC respectifs de 1,88 ; 1,65 et 3,63 à la dose de 10 µg de PUF/institution intranasale, et de 3,70 ; 2,18 et 6,50 à la dose 30 µg de PUF/institution intranasale.

Un profil tout à fait différent est observable dans le foie. En effet, contrairement à ce qui a pu être observé dans les autres organes jusqu'à présent, une diminution significative de l'ensemble des métallothionéines fut observée. Cette diminution, qui était d'autant plus importante que la dose de PUF étudiée était élevée, s'est faite de manière dose dépendante pour les *Mt1* et *Mt2*. Ainsi, dans cet organe, l'expression des *Mt1*, 2, 3 et 4 a atteint des FC respectifs de 0,15 ; 0,19 ; 0,47 et 0,44 à la dose de 10 µg de PUF/institution intranasale, et de 0,07 ; 0,11 ; 0,35 et 0,40 à la dose 30 µg de PUF/institution intranasale.

Enfin, dans les reins, seule une exposition sub-chronique à la dose de 30 µg a induit une augmentation significative de *Mt1* et *Mt2* atteignant des FC respectifs de 1,46 et 1,36, tandis qu'aucune significativité n'a été observée pour *Mt3* bien qu'il semble y avoir une tendance positive. *Mt4* n'était quant à elle pas du tout exprimé. À noter que les FC étaient néanmoins une nouvelle fois inférieurs au seuil de significativité biologique de 1,5.

D. Discussion

À l'heure actuelle, des incertitudes demeurent quant à la distribution des PUF dans l'organisme et les principaux organes-cibles les plus vascularisés (*i.e.*, poumons, cœur, cerveau, foie et reins) du fait des difficultés encore rencontrées pour détecter les PUF dans les différents tissus et matrices biologiques, y compris chez l'Homme. Ici, la stratégie appliquée, a consisté en l'association de différentes méthodes associant dans un premier temps des observations histologiques par microscopies photonique et électronique et des dosages de métaux. Ce dernier présente néanmoins l'inconvénient d'avoir un bruit de fond élevé, rendant difficile la détection des métaux endogènes naturellement présents dans l'organisme. À titre d'exemple, une souris ayant été exposée à une masse maximale totale de 720 µg de PUF (*i.e.*, 2 institutions intranasales par semaine x 12 semaines x 30 µg de PUF) pour un métal endogène tel que le Fe naturellement présent à hauteur de 1 mg dans le sang et dont l'analyse physico-chimique avait montré une concentration de 4,2 µg/mg de PUF, n'a donc un ajout théorique que de 2,88 µg de Fe, ce qui est donc difficilement détectable compte tenu de la concentration totale sanguine. Les éléments exogènes sont par conséquent plus facilement détectables, du fait d'un bruit de fond nettement moins important. Afin de pallier à cette lacune, des méthodes indirectes d'étude des profils d'expression génique des métallothionéines (*i.e.*, *Mt1*, 2, 3 et 4), du récepteur d'aryl hydrocarbure (*i.e.*, *Ahr*) et des cytochromes P450 (*i.e.*, *Cyp1a1*, *1b1*) généralement induits par les métaux, HAP, PCDD/F, et/ou DL-/M-PCB et impliqués dans leur séquestration et/ou leur métabolisme a été initiée au sein des organes-cibles. Le CYP1A1 présente un intérêt particulier car, en plus de pouvoir être directement induit par les xénobiotiques tels que les PM, son expression peut également être médiée par l'Ahr (406). Les résultats obtenus par la combinaison de ces différentes techniques ont suggéré l'exposition des différents organes-cibles aux PUF et/ou à des composés désorbés à partir de ces dernières, avec des distributions pulmonaires et

cérébrales plus marquées, celles du cœur, du foie, et des reins, plus faibles, ne semblant n'être liées qu'à un passage transitoire lors de leur distribution systémique voire de leur élimination. Ceci souligne l'importance de considérer non seulement les effets pulmonaires mais aussi les effets cardiovasculaires et cérébraux, voire hépatiques et rénaux, dans l'évaluation des risques sanitaires dans des situations d'exposition aux PUF.

III. Mesure de marqueurs biologiques du stress oxydant et de l'inflammation

1. Mesure des marqueurs biologiques du stress oxydant

A. Étude des défenses antioxydantes

i. Étude de la voie de signalisation Nrf2

➤ Mesure de l'activité de fixation à l'ADN du facteur de transcription Nrf2 :

La figure 61 présente les résultats obtenus pour l'étude de la liaison à l'ADN du facteur de transcription NRF2 dans 5 organes cibles (poumons, cœur, reins, foie et cerveau) par la méthode TransAM. Les valeurs brutes des témoins négatifs, c'est-à-dire des souris exposées au SP, étaient respectivement de 0,27 +/- 0,06 U Abs ; 0,19 +/- 0,01 U Abs ; 0,11 +/- 0,02 U Abs ; 0,13 +/- 0,02 U Abs et 0,14 +/- 0,03 U Abs dans les poumons, le cœur, les reins, le foie et le cerveau. Aucune différence significative n'a été observée quelle que soit la dose testée et l'organe étudié, à l'exception de la dose de 30 µg de PUF/instillation intranasale qui a induit une augmentation significative de la capacité de liaison à l'ADN de NRF2 dans les reins, atteignant un FC de 1,36.

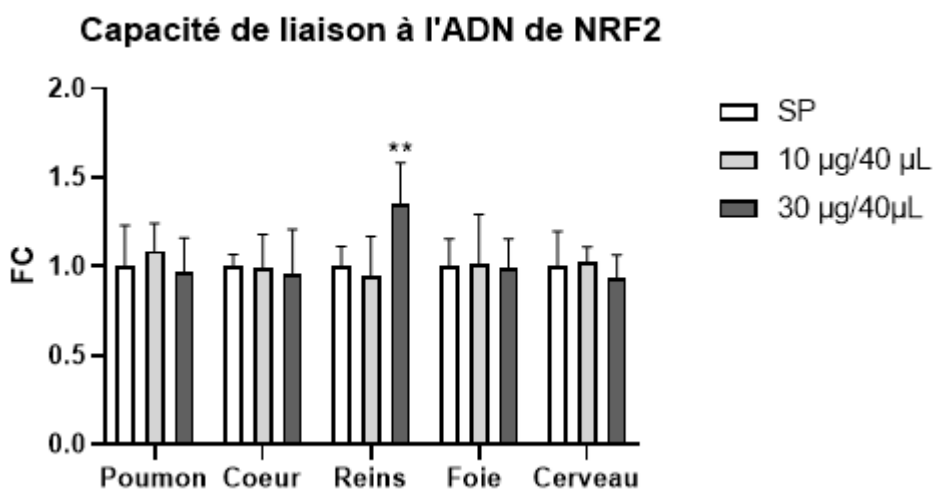


Figure 61 : Capacité de liaison à l'ADN du facteur de transcription NRF2 dans les organes-cibles (FC = Fold Change, $p < 0,05^$, $p < 0,01^{**}$ vs témoins, SP)*

➤ **Étude l'expression génique de *Nrf2* et de ses gènes cibles :**

Les niveaux d'expression du gène *Nrf2* et de certains de ses gènes cibles (*Keap1*, *Hmox1*, *Txn1*, *Sod1*, *Nqo1*, *Gpx1*, *Gsr*, *Gclc*, *Gclm*, *mGst1*) ont été mesurés par RT-qPCR dans 5 organes cibles, poumons, cœur, reins, foie et cerveau, des souris exposées ou non aux PUF (figure 62).

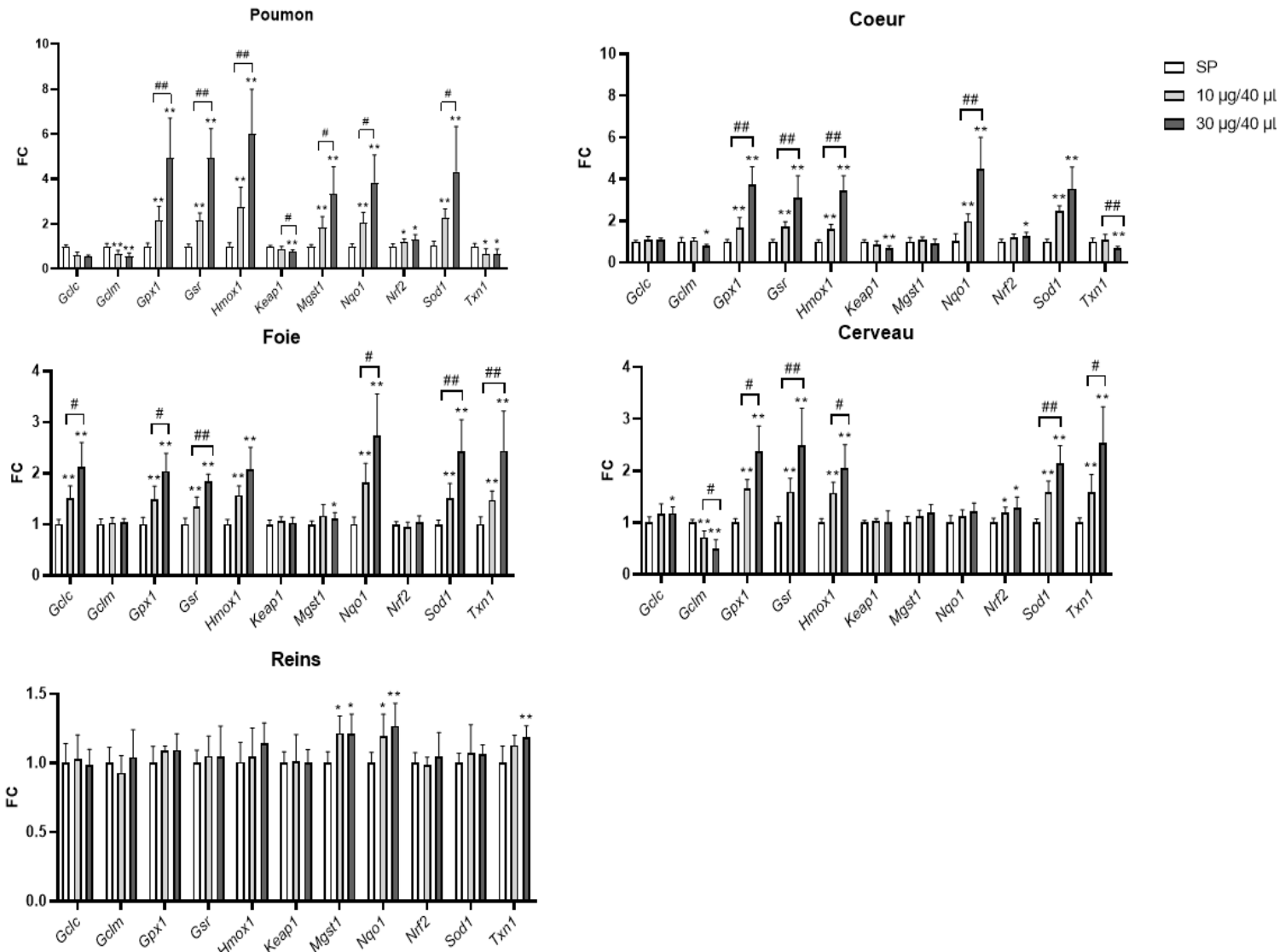


Figure 62 : Expression génique de *Nrf2* et des gènes sous sa dépendance (i.e., *Gclc*, *Gclm*, *Gpx1*, *Gsr*, *Hmox1*, *Keap1*, *Mgst1*, *Nqo1*, *Nrf2*, *Sod1*, *Txn1*) dans les organes-cibles 24h après l'exposition sub-chronique des souris aux PUF (FC = Fold Change, $p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$ vs témoins, SP ; $p < 0,05^{\#}$, $p < 0,01^{\#\#}$ vs 10 µg/instillation).

Les résultats obtenus pour l'étude de l'expression génique du gène *Nrf2* ont montré que son expression était statistiquement augmentée dans le cœur dans le cas d'une exposition sub-chronique à une dose de 30 µg de PUF/instillation intranasale, atteignant un FC de 1,28. Cet effet a été observé dès la dose de 10 µg dans les poumons et le cerveau avec des FC de 1,18 et 1,19. *A contrario*, aucun effet significatif n'a été observé dans les reins et le foie. Néanmoins, les FC observés n'étaient pas supérieurs à la valeur seuil de 1,5, ce qui suggère que ces observations n'auront aucune conséquence d'un point de vue biologique et que ce gène n'est pas différenciellement exprimé.

Concernant les gènes cibles de *Nrf2*, une augmentation significative de l'expression de *Gpx1*, *Gsr*, *Hmox1*, *mGst1*, *Nqo1* et *Sod1* ainsi qu'une diminution significative de l'expression de *Gclm*, *Keap1* et *Txn1* ont été observées dans le poumon. Cet effet se fait de manière dose-dépendante pour l'ensemble de ces gènes à l'exception de *Gclm* et *Txn1*. A titre d'exemple, dans cet organe, l'expression de l'*Hmox1* a atteint des FC

respectifs de 2,77 et 6,02 aux doses de 10 µg et de 30 µg de PUF /instillation intranasale. *A contrario*, aucune différence significative n'a été observée pour *Gclc*.

Dans le cœur, des effets similaires ont été observés, à l'exception de *mGst1* pour lequel aucun effet significatif n'a été observé. Ainsi, une augmentation dose-dépendante de l'expression des gènes *Gpx1*, *Gsr*, *Hmox1* et *Nqo1* a été observée. A titre d'exemple, dans cet organe, l'expression de *Nqo1* a atteint des FC respectifs de 1,99 et 4,50 aux doses de 10 µg et de 30 µg de PUF /instillation intranasale. Une augmentation significative de l'expression de *Sod1* a également été observée, bien que celle-ci n'étaient pas statistiquement dose-dépendante. En parallèle, une diminution significative de l'expression de *Gclm*, *Keap1* et *Txn1* a été observée à la dose de 30 µg de PUF/instillation intranasale atteignant des FC respectifs de 0,78 ; 0,67 et 0,67.

Le foie et le cerveau ont globalement présenté les mêmes résultats que le cœur, à l'exception d'une augmentation significative de l'expression de *Gclc* et de *Txn1* dans ces derniers et d'une absence d'effet significatif sur l'expression de *Nqo1* dans le cerveau. Enfin, seuls les gènes *mGst1*, *Nqo1* et *Txn1* ont vu leur expression augmentée dans les reins, atteignant respectivement des FC de 1,22 et 1,19 et 1,13 pour la dose de 10 µg de PUF/instillation intranasale et de 1,21 ; 1,27 et 1,19 pour la dose de 30 µg de PUF/instillation intranasale.

➤ **Mesure de l'activité de la CAT, de la NQO1 et de la SOD**

Les résultats obtenus pour la mesure de l'activité enzymatique de la CAT, de la NQO1 et de la SOD sont présentés dans la figure 63. Les valeurs brutes de l'activité enzymatique de la CAT exprimée en nmol/min/mg de protéines chez les témoins négatifs, c'est-à-dire les souris exposées au sérum physiologiques, étaient respectivement de 39,89 +/- 6,39 ; 5,16 +/- 0,92 ; 126,69 +/- 14,52 ; 55,16 +/- 5,78 et 2,80 +/- 0,60 dans les poumons, le cœur, les reins, le foie et le cerveau. Les valeurs brutes de l'activité enzymatique de NQO1 exprimée en nmol/min/mg de protéines chez les témoins négatifs, c'est-à-dire les souris exposées au sérum physiologiques, étaient respectivement de 10,45 +/- 2,37 ; 14,86 +/- 2,45 ; 1,57 +/- 0,29 ; 5,46 +/- 0,88 et 5,12 +/- 1,05 dans les poumons, le cœur, les reins, le foie et le cerveau. Les valeurs brutes de l'activité enzymatique de la SOD exprimée en nmol/min/mg de protéines chez les témoins négatifs, c'est-à-dire les souris exposées au sérum physiologiques, étaient respectivement de 109,63 +/- 7,72 ; 5,88 +/- 1,08 ; 3,21 +/- 0,49 ; 972,75 +/- 113,95 et 2,64 +/- 0,55 dans les poumons, le cœur, les reins, le foie et le cerveau.

L'expression de la CAT n'a été significativement augmentée de manière dose-dépendante que dans le poumon et le cœur, son activité n'étant pas modifiée dans les reins, le foie et le cerveau. En effet, au niveau pulmonaire et cardiaque, cette activité augmente progressivement avec la dose testée jusqu'à atteindre des FC de 2,3 et de 3,8, respectivement. L'activité de la NQO1 a été, quant à elle, significativement augmentée de manière dose-dépendante dans l'ensemble des organes à l'exception du cerveau. Ainsi, au niveau pulmonaire, une exposition sub-chronique à une dose de 10 µg de PUF/instillation a induit une augmentation de l'activité de cette enzyme atteignant un FC de 2,3, jusqu'à parvenir à un FC de 5,4 avec la dose de 30 µg de PUF/instillation. Cela a également été observé au niveau cardiaque avec des FC de 1,8 et 4,8 pour les doses respectives de 10 et 30 µg de PUF/instillation et au niveau rénal avec FC de 3,3 et 7,6, respectivement. Enfin, l'activité de la SOD a été significativement augmentée quelle que soit la dosée administrée et l'organe étudié. Cette augmentation s'est faite de façon dose-dépendante dans l'ensemble des organes à l'exception des reins, avec un effet plus marqué dans le poumon et le cœur. Au niveau pulmonaire, une exposition sub-chronique de PUF a induit des FC de 1,9 et de 5,1 avec les doses de 10 et 30 µg de PUF/instillation, respectivement. Au niveau cardiaque, les résultats ont suivi une tendance similaire, avec des FC respectifs de 1,6 et 5,0.

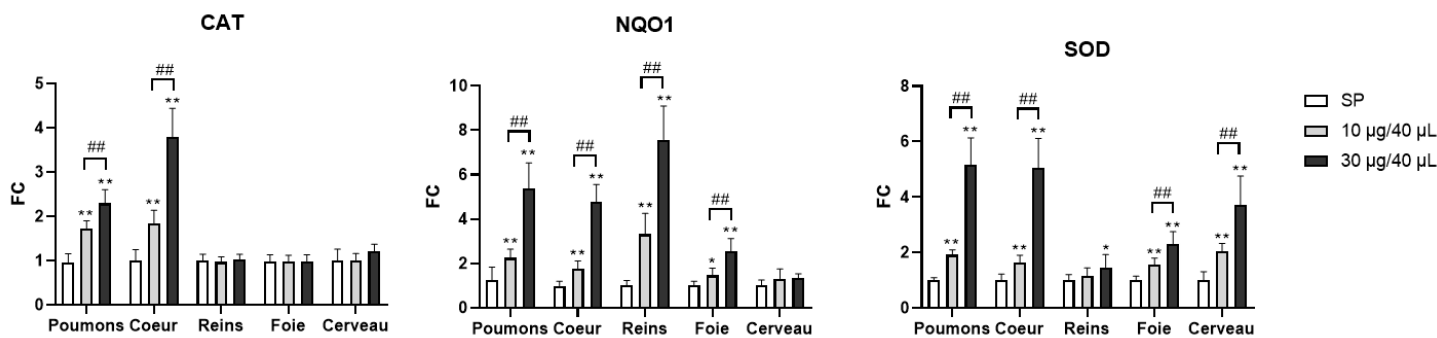


Figure 63 : Activité enzymatique de la catalase (CAT), de la NAD(P)H quinone déshydrogénase 1 (NQO1) et de la Superoxyde Dismutase (SOD) dans les organes-cibles 24h après l'exposition sub-chronique des souris aux PUF (FC = Fold Change, $p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$ vs témoins, SP ; $p < 0,05^{\#}$, $p < 0,01^{\#\#}$ vs 10 µg/instillation).

➤ Mesure de l'activité de la GPx, de la GR et de la GST

Les résultats obtenus pour la mesure des activités enzymatiques de la GPx, de la GR et de la GST sont présentés dans la figure 64. Les valeurs brutes de l'activité enzymatique de la GPx exprimée en nmol/min/mg de protéines chez les témoins négatifs, c'est-à-dire les souris exposées au sérum physiologiques, étaient respectivement de 19,83 +/- 1,32 ; 9,23 +/- 1,40 ; 18,19 +/- 1,89 ; 31,13 +/- 4,05 et 14,70 +/- 2,06 dans les poumons, le cœur, les reins, le foie et le cerveau. Les valeurs brutes de l'activité enzymatique de GR exprimée en nmol/min/mg de protéines chez les témoins négatifs, c'est-à-dire les souris exposées au sérum physiologiques, étaient respectivement de 18,59 +/- 3,10 ; 4,81 +/- 0,71 ; 17,18 +/- 3,33 ; 22,29 +/- 3,32 et 1,64 +/- 0,22 dans les poumons, le cœur, les reins, le foie et le cerveau. Les valeurs brutes de l'activité enzymatique de la GST exprimée en nmol/min/mg de protéines chez les témoins négatifs, c'est-à-dire les souris exposées au sérum physiologiques, étaient respectivement de 17,20 +/- 2,46 ; 5,59 +/- 7,60 ; 15,30 +/- 0,79 ; 311,80 +/- 4,89 et 63,48 +/- 20,93 dans les poumons, le cœur, les reins, le foie et le cerveau.

Quelle que soit la dose testée, l'activité de la GPx a été significativement augmentée dans l'ensemble des organes à l'exception des reins. En effet, au niveau pulmonaire, une exposition sub-chronique à une dose de 10 µg de PUF/instillation a induit une augmentation significative de son activité, atteignant un FC de 1,6 ; cette dernière atteignant un FC égal à 5,7 avec la dose de 30 µg/instillation. De la même manière, au niveau cardiaque les doses de 10 µg et 30 µg de PUF/instillation ont induit une augmentation de ce ratio à hauteur de 1,8 et 4,1, respectivement. Des résultats similaires ont été obtenus au niveau hépatique et cérébral avec des FC respectifs de 1,5 et 2,1 pour la dose de 10 µg de PUF/instillation et des FC de 2,0 et 4,2 pour la dose de 30 µg de PUF/instillation, respectivement. Des résultats identiques ont été rapportés pour l'activité de la GR. Un profil différent a été observé pour l'activité de la GST, celle-ci n'étant pas modifiée dans le cœur ni le cerveau à la suite d'une exposition sub-chronique aux PUF. En effet, à la dose de 10 µg de PUF/instillation, cette dernière n'a été significativement augmentée qu'au niveau pulmonaire et rénal, atteignant toutes les deux un FC de 1,4. La dose de 30 µg de PUF/instillation a induit, quant à elle, une augmentation significative de l'activité de la GST au niveau pulmonaire, rénal et hépatique, avec des FC respectifs de 2,6, 1,9 et 1,8.

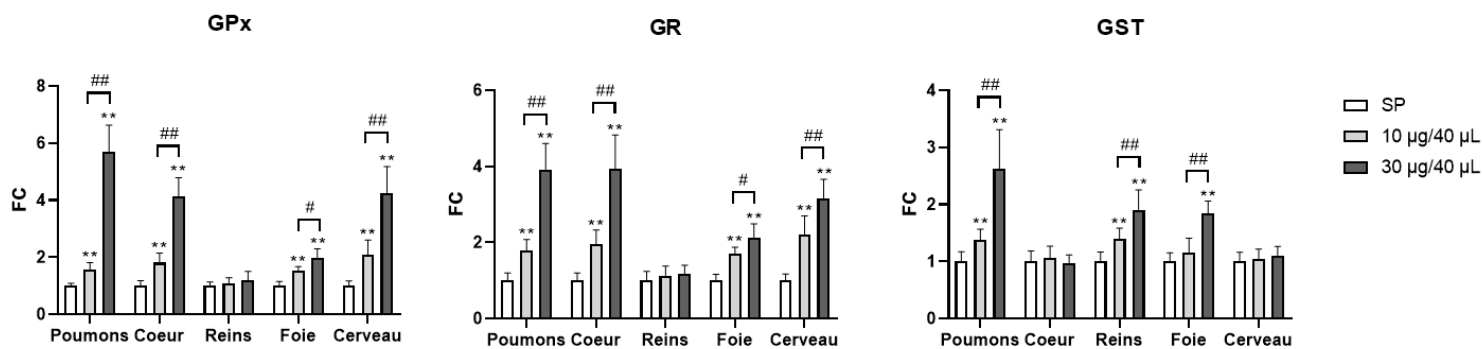


Figure 64 : Activité enzymatique de la Glutathion Peroxydase (GPx), de la Glutathion Réductase (GR) et de la Glutathion -S-Transférase (GST) dans les organes-cibles 24h après l'exposition sub-chronique des souris aux PUF (FC = Fold Change, $p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$ vs témoins, SP ; $p < 0,05^{\#}$, $p < 0,01^{\#\#}$ vs 10 µg/instillation).

ii. Étude de l'homéostasie du glutathion

➤ Mesure du ratio GSSG/GSH

La figure 65 présente les résultats obtenus pour la mesure du ratio GSSG/GSH dans l'ensemble des organes cibles chez les groupes de souris exposées ou non aux PUF. Les valeurs brutes du ratio GSSG/GSH exprimé en nmol/mg de protéines chez les témoins négatifs, c'est-à-dire les souris exposées au sérum physiologiques, étaient respectivement de 0,14 +/- 0,02 ; 0,17 +/- 0,02 ; 0,20 +/- 0,03 ; 0,09 +/- 0,01 et 0,11 +/- 0,01 dans les poumons, le cœur, les reins, le foie et le cerveau.

Pour l'ensemble de ces organes, une exposition sub-chronique aux PUF a induit une augmentation dose-dépendante de ce ratio, quelle que soit la dose étudiée. En effet, au niveau pulmonaire, une exposition sub-chronique à une dose de 10 µg de PUF/instillation a induit une augmentation significative de ce ratio, atteignant un FC de 5,3 ; un FC égal à 13,0 a été observé avec la dose de 30 µg de PUF/instillation. De la même manière, au niveau cardiaque les doses de 10 µg et 30 µg de PUF/instillation ont induit des augmentations de ce ratio avec des FC de 2,1 et 5,8, respectivement. Des résultats similaires ont été obtenus au niveau rénal, hépatique et cérébral avec des FC respectifs de 1,7, 2,6 et 2,5 pour la dose de 10 µg de PUF/instillation et des FC de 2,8, 7,5 et 7,2 pour la dose de 30 µg de PUF/instillation, respectivement.

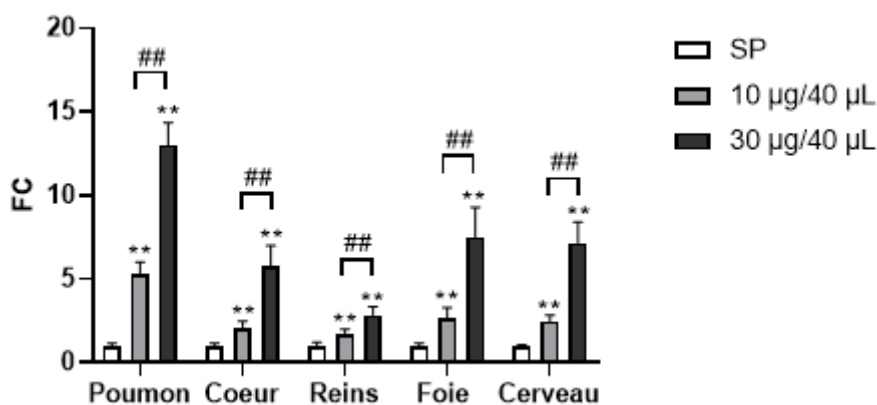


Figure 65 : Ratio GSSG/GSH dans les organes-cibles 24h après l'exposition sub-chronique des souris aux PUF (FC = Fold Change, $p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$ vs témoins, SP ; $p < 0,05^{\#}$, $p < 0,01^{\#\#}$ vs 10 µg/instillation).

B. Recherche de lésions oxydatives

La figure 66 présente les résultats obtenus pour la recherche de lésions oxydatives, et plus particulièrement pour les adduits à l'ADN (8-OHdG) et à l'ARN (8-OHG), les marqueurs de peroxydation lipidique (4-HNE), de carbonylation protéique (Prot-CO), d'oxydation protéique (AOPP), et de glycation (AGE). Les valeurs brutes de la concentration en 8-OHdG exprimée en pg/μg d'ADN chez les témoins négatifs, c'est-à-dire les souris exposées au sérum physiologiques, étaient respectivement de 155,52 +/- 8,17 ; 124,13 +/- 13,83 ; 75,63 +/- 34,59 ; 100,14 +/- 25,92 et 74,14 +/- 32,50 dans les poumons, le cœur, les reins, le foie et le cerveau. Les valeurs brutes de la concentration en 8-OHG exprimée en pg/μg d'ARN chez les témoins négatifs, c'est-à-dire les souris exposées au sérum physiologiques, étaient respectivement de 26,77 +/- 12,63 ; 50,72 +/- 24,54 ; 13,48 +/- 2,82 ; 26,32 +/- 20,31 et 76,98 +/- 60,57 et dans les poumons, le cœur, les reins, le foie et le cerveau. Les valeurs brutes de la concentration en 4-HNE exprimée en ng/mg de protéines chez les témoins négatifs, c'est-à-dire les souris exposées au sérum physiologiques, étaient respectivement de 620,90 +/- 116,97 ; 240,27 +/- 118,95 ; 248,84 +/- 118,75 ; 388,73 +/- 244,04 et 192,60 +/- 45,51 et dans les poumons, le cœur, les reins, le foie et le cerveau. Les valeurs brutes de la concentration en PROT-CO exprimée en pmol/mg de protéines chez les témoins négatifs, c'est-à-dire les souris exposées au sérum physiologiques, étaient respectivement de 1,67 +/- 0,31 ; 1,29 +/- 0,28 ; 0,36 +/- 0,27 ; 0,63 +/- 0,27 et 0,40 +/- 0,15 dans les poumons, le cœur, les reins, le foie et le cerveau. Les valeurs brutes de la concentration en AOPP exprimée en nmol/mg de protéines chez les témoins négatifs, c'est-à-dire les souris exposées au sérum physiologiques, étaient respectivement de 475,09 +/- 79,15 ; 322,87 +/- 50,35 ; 455,89 +/- 140,67 ; 212,38 +/- 106,72 et 162,48 +/- 67,05 dans les poumons, le cœur, les reins, le foie et le cerveau. Les valeurs brutes de la concentration en AGE exprimée en nmol/mg de protéines chez les témoins négatifs, c'est-à-dire les souris exposées au sérum physiologiques, étaient respectivement de 12,51 +/- 0,79 ; 3,59 +/- 0,88 ; 1,39 +/- 0,77 ; 0,128 +/- 0,07 et 1,25 +/- 0,69 dans les poumons, le cœur, les reins, le foie et le cerveau. Les tests statistiques non paramétriques réalisés n'ont pas permis de mettre en évidence d'augmentation significative de ces marqueurs dans tous les organes analysés, quelle que soit la dose testée. Une diminution significative de leur expression a parfois même été observée, comme par exemple pour le 4-HNE au niveau cérébral pour lequel un FC de 0,4 est atteint quelle que soit la dose de PUF administrée.

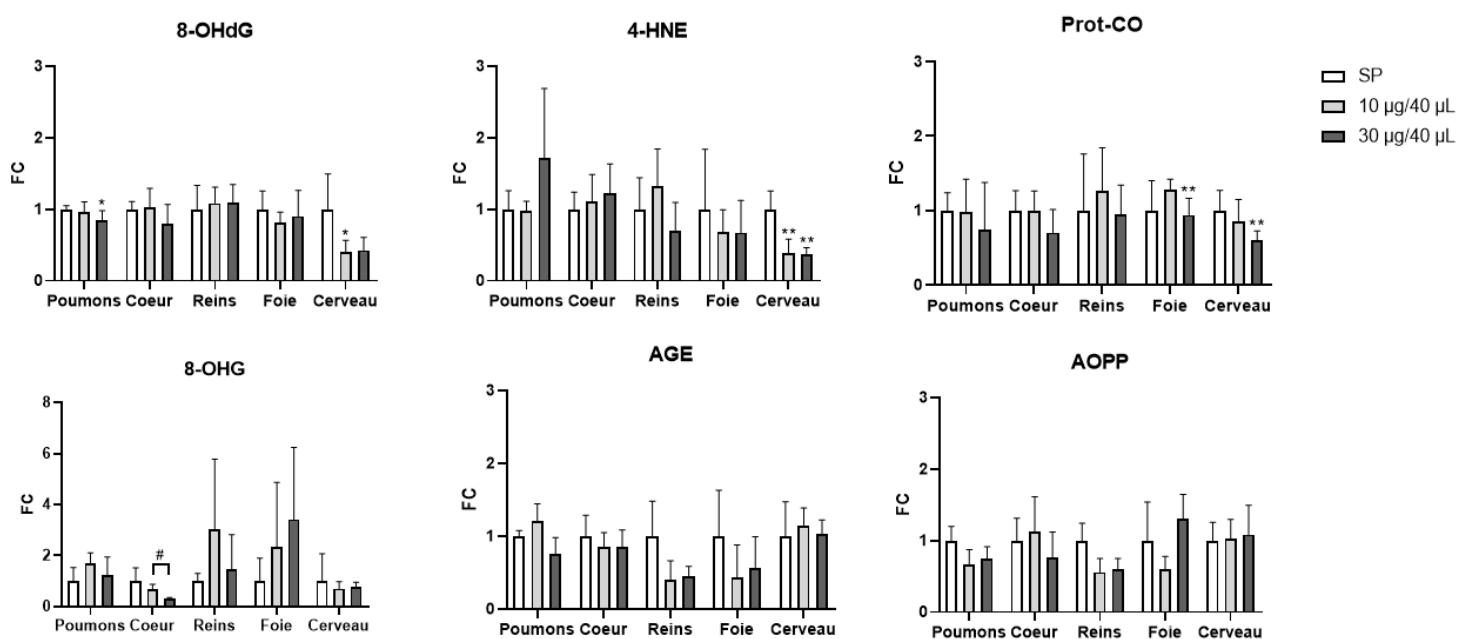


Figure 66 : Concentrations en 8-OHdG, 4-HNE, Prot-CO, 8-OHG, AGE, AOPP dans les organes-cibles 24 h après l'exposition sub-chronique des souris aux PUF.

(FC = Fold Change, $p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$ vs témoins SP, $p < 0,05^{\#}$ vs 10 μg/institution).

C. Discussion

La distribution des PUF et/ou de composés désorbés à partir de dernières vers les différents organes cibles, couplée à l'apparition de manifestations biologiques systémiques de type modifications comportementales ont, dans un premier temps, orienté nos recherches vers une approche multi-organes. Dans la partie précédente, il a été démontré que les PUF avaient un POTOX intrinsèque important, à l'origine d'une génération d'ERO accrue en milieu acellulaire. En partant de ce constat, la question de la contribution de ce POTOX au développement d'un stress oxydant *in vivo* s'est posée. Ce dernier, conséquence d'un déséquilibre de l'homéostasie redox résultant de l'épuisement des défenses antioxydantes, enzymatiques et/ou non enzymatiques, combiné à une surproduction d'ERO, est un mécanisme clé de nombreuses pathologies, notamment pulmonaires (153,155). La production d'espèces pro-oxydantes ayant d'ores et déjà été démontrée grâce à l'étude du POTOX, l'étude des défenses antioxydantes s'est avérée pertinente. Notre attention s'est tout d'abord portée sur le glutathion réduit qui constitue la première ligne de défenses antioxydantes de par son rôle majeur de piègeur de radicaux libres et d'ERO. Bien que les données concernant les PUF soient encore très parcellaires, quelques études suggèrent leur capacité à altérer le métabolisme du glutathion. À titre d'exemple, il a été démontré qu'une exposition aiguë ou répétée de cellules BEAS-2B à des PUF de fumées de soudage induisait des altérations du ratio GSSG/GSH (407). De la même manière, d'autres auteurs ont montré que l'exposition aiguë de cellules BEAS-2B à des PUF induisait une diminution de l'expression génique de la GPx (408). Par ailleurs, la présence d'un déséquilibre redox du glutathion dans l'hippocampe de souris exposées durant 3 semaines à des PUF a également été observée (409). Ce glutathion est synthétisé par deux enzymes ATP dépendante : la glutamate cystéine ligase (GCL) et la GSH synthétase qui permettant respectivement l'ajout de cystéine au glutamate, puis l'ajout d'une glycine à la γ -glutamylcystéine pour former l' γ -glutamyl-cystéinyl-glycine ou GSH. Dans ce projet, la synthèse du glutathion a été analysée par mesure de l'expression génique des gènes *Gclc* et *Gclm* qui correspondent respectivement aux sous-unités catalytique et modificatrice de la GCL. Au niveau pulmonaire et cardiaque, des profils similaires ont été observés à la suite de l'exposition sub-chronique aux PUF, avec une diminution de l'expression de *Gclm* et une absence d'effet sur *Gclc*. Ces résultats sont en concordance avec des études ayant montré que *Gclc* était le plus souvent inactif *in vivo*, au profit de *Gclm* (410,411). À l'inverse, une augmentation de l'expression de *Gclc* est observée au niveau hépatique et cérébral. Kiyosawa et son équipe (2004) ont obtenu des résultats similaires dans le foie de rats à la suite d'une déplétion en GSH (412). Par ailleurs, une autre étude a montré que les endotoxines présentes dans les membranes des bactéries à Gram négatif étaient capables d'inhiber l'expression génique et protéique de GCLC et GCLM dans le foie de souris (413). Les concentrations élevées en endotoxines au sein des PUF prélevées dans le cadre de notre projet seraient donc susceptibles d'influer sur la synthèse hépatique du glutathion. En parallèle, l'absence de dérégulation au niveau rénal n'est pas surprenante, les reins n'étant que des cibles transitoires des PUF. De par leur rôle de filtration, les reins ne sont pas des organes propices à la rétention des PUF et il n'est donc pas étonnant que les mécanismes de défenses à leur égard ne soient activés que de façon partielle. Globalement, dans notre étude, ceci est à l'origine une diminution de la concentration en GSH au sein de l'ensemble des organes. En parallèle, la concentration en GSSG est quant à elle très importante, laissant penser que la concentration en GSH initialement synthétisée en réponse aux PUF a été importante et suffisante pour exercer un rétrocontrôle négatif sur l'activité de la GCL (414,415). À cela s'ajoutent une activité dose-dépendante accrue des enzymes GST et GPx qui participent activement à l'oxydation des groupements thiols du GSH, donnant du GSSG qui pourra de nouveau être réduit sous l'action de la glutathion réductase (GR) qui a, elle aussi, son activité augmentée dans l'ensemble des organes à l'exception des reins. En dépit de l'activation de ces différents systèmes de recyclage du GSSG, les stocks de GSH se trouvent largement réduits, empêchant ce processus d'oxydation du GSH en GSSG de jouer son rôle

protecteur et bénéfique de neutralisation des ERO et notamment de détoxification de l'H₂O₂ en H₂O. C'est pourquoi, nous avons cherché à déterminer si un autre mécanisme compensateur antioxydant était initié.

Notre attention s'est ainsi portée sur l'activation de la voie de signalisation NRF2, celle-ci étant étroitement impliquée dans la régulation de la synthèse et de la régénération du GSH en contrôlant l'expression des gènes *Gclc* et *Gclm*. De plus, elle participe activement à l'élimination des ERO médiée par le GSH en régulant l'expression des gènes codant pour la GST et la GPX, respectivement impliquées dans la détoxification des époxydes et de l'H₂O₂ (416). L'activation de la voie de signalisation NRF2 est donc responsable d'une réduction du GSSG associée à une synthèse accrue de GSH (417). Par ailleurs, cette activation a déjà été rapportée dans des études *in vitro* réalisées sur des cellules BEAS-2B exposées à des PUF de façon répétée (381,407,418). L'induction de cette voie de signalisation a également été démontré dans plusieurs études *in vivo* dans lesquelles une activité accrue des enzymes antioxydantes étant sous la dépendance du facteur de transcription NRF2 a été constatée (165,167,171). Ainsi, dans un premier temps, la capacité de liaison à l'ADN de ce facteur de transcription a été mesurée, ne montrant aucune différence significative quel que soit l'organe étudié et la dose testée, à l'exception des reins. Parmi les hypothèses envisageables, celle d'une activation précoce de la voie NRF2 semble la plus plausible. Il est en effet tout à fait possible de supposer qu'après 3 mois d'exposition, cette dernière soit totalement dépassée et que d'autres voies antioxydantes aient déjà pris le relais, ce qui expliquerait qu'il n'y ait plus de fixation du facteur de transcription à sa séquence consensus. D'autre part, cette technique ne mesure que la capacité de la forme libre de NRF2 à se fixer à cette séquence. Or, si la fixation de ce facteur s'est d'ores et déjà produite avant d'effectuer la mesure, les résultats obtenus ne seront que peu élevés. Par ailleurs, il aurait été préférable d'effectuer ce test uniquement sur les extraits nucléaires et non sur des échantillons de protéines totales. Enfin, il est possible qu'à la suite d'une exposition sub-chronique aux PUF, la voie NRF2 soit totalement court-circuitée et que d'autres mécanismes compensatoires soient initiés. Afin d'affirmer ou d'infirmer cette hypothèse, des analyses complémentaires investiguant plus attentivement la voie NRF2 ont été entrepris, telles que la mesure de son expression génique et celle de ses gènes cibles. Ainsi, l'expression des gènes antioxydants *Nrf2*, *Nqo1*, *Hmox1*, *mGst1*, *Gpx1*, *Gsr*, *Txn1* et de l'inhibiteur *Keap1* a été mesurée. Au niveau pulmonaire, cardiaque, hépatique et cérébral, des profils quasiment similaires ont été observés avec une augmentation significative de l'expression des gènes codant pour des enzymes antioxydantes et une absence de dérégulation voire une diminution de *Keap1*, de manière dose-dépendante. Cet amenuisement n'est pas surprenant, KEAP1 se retrouvant sous forme cytosolique libre et inactive en cas de stress oxydant. Afin de compléter ces données obtenues au niveau génique, une validation protéique a été entrepris. Cette dernière a permis de montrer qu'en plus d'être induit au niveau génique, SOD et NQO1 l'étaient également, de manière tout à fait similaire, au niveau enzymatique dans le poumon, le cœur, le foie et les reins. Bien que l'expression génique rénale de *Sod1* et *Nqo1* soit nulle ou très faiblement augmentée, leur expression protéique est dérégulée positivement à la suite de l'exposition sub-chronique aux PUF. Ceci pourrait s'expliquer par le rôle de filtration des reins, qui ne constituent ainsi qu'une cible transitoire des PUF. Une activation précoce et transitoire des gènes antioxydants peut donc avoir lieu directement à la suite de l'exposition intranasale, avec production et accumulation des protéines résultantes qui pourront quant à elles être détectées. En outre, l'activité de la CAT a été elle-aussi-accrue au niveau pulmonaire et cardiaque. C'est l'action combinée de ces différentes enzymes qui permet à la réponse antioxydante d'être efficiente (419). En effet, NQO1 permet de cataboliser le métabolisme des quinones et de ses dérivés en hydroxyquinones qui pourront être ensuite être éliminées (420). Outre ce rôle majeur, NQO1 permet également le maintien de l'ubiquinone sous sa forme réduite et antioxydante au sein des membranes plasmiques, limitant les phénomènes de peroxydation lipidique (421). En parallèle, les SOD catalysent la dismutation du radical superoxyde O₂^{•-} en oxygène et peroxyde d'hydrogène H₂O₂ qui pourra ensuite être éliminé par la CAT qui permet sa conversion en eau et oxygène (422). En plus de travailler en tandem avec la

CAT, les SOD œuvrent en étroite collaboration avec la GPx qui permet, elle-aussi, la détoxification de l'H₂O₂ (423).

Quelques études *in vivo* ont cherché à étudier l'induction de cette voie de signalisation NRF2 suite à une exposition aux PUF. Chan et son équipe (2013) ont ainsi évalué l'impact d'une exposition unique de 400 µg de PUF de suie riches en composés organiques sur l'activation de cette voie de signalisation chez des rats nouveaux nés et adultes (167). Cette étude a démontré que cette exposition provoquait la génération pulmonaire d'ERO et l'activation de la voie de signalisation NRF2, caractérisée par l'induction des enzymes antioxydantes HMOX1, SOD1 et CAT quel que soit l'âge des rats, bien que cette induction soit plus importante chez les rats adultes, suggérant ainsi une immaturité des systèmes antioxydants à la naissance. Cette activation des défenses antioxydantes d'un point de vue génique puis protéique est en parfaite adéquation avec les résultats obtenus dans le cadre de notre projet. Par ailleurs, Zheng et ses collaborateurs (2019) ont cherché à étudier les effets, au cours du temps, de l'exposition aiguë de souris à des DEP sur les défenses antioxydantes pulmonaires. Il a ainsi été démontré qu'il existait une cinétique antioxydante, débutant tout d'abord par une génération intense d'ERO suivie d'une activation des enzymes antioxydantes, puis une fois le niveau d'ERO rétabli à la normale, l'activité de la CAT diminue tandis que les concentrations protéiques d'NRF2, HO-1, NQO1, GCLC et GCLM augmentent, avant de diminuer progressivement parallèlement à la concentration en ERO (165). Bien qu'utilisant un modèle murin différent et des doses de particules plus élevées, cette étude est intéressante de par son aspect chronologique, montrant que l'état redox n'est pas figé dans le temps mais bien évolutif vis-à-vis de l'environnement cellulaire. Dans notre projet, il est possible de supposer que les expositions répétées induisent une génération d'ERO qui se maintient à un niveau toujours très important après 3 mois d'exposition, conduisant à une transcription accrue des gènes codant pour les enzymes antioxydantes et cytoprotectrices, qui est maintenue durant l'ensemble de la durée du protocole d'exposition. La majorité des études étaye cette hypothèse en suggérant que seule l'inhibition des ERO entraîne une réduction de l'activité des enzymes antioxydantes (424). A l'inverse, Li et son équipe ont démontré (2020) que l'exposition de souris C57BL/6 pendant 28 jours à des PUF de carbone suie induisait une diminution pulmonaire de l'activité enzymatique de CAT, SOD et GPX, malgré la génération importante d'ERO, à l'origine de processus apoptotiques (171). À première vue, ces résultats diffèrent des nôtres, mais plusieurs raisons peuvent expliquer cela. En effet, en plus d'employer un modèle murin différent, cette étude utilise des PUF de carbone plus riches en composés nocifs, à des doses nettement plus élevées, de l'ordre de 270 et 540 µg/j pendant une durée plus courte. Comme étayé dans les études de cinétique précédentes, l'activation des enzymes antioxydantes a très certainement dû se faire de manière précoce à la suite des expositions aux PUF. Cependant, les doses employées étant élevées, celles-ci ne sont pas suffisantes pour faire face aux dommages générés, induisant par conséquent une diminution de leur expression et l'induction de processus apoptotiques néfastes. Une autre étude a par ailleurs supposé que les anomalies transcriptionnelles et traductionnelles induites par les PUF pouvaient être à l'origine d'une diminution de l'activité antioxydante de la SOD (425). Ceci témoigne bien du fait que l'activité antioxydante n'est pas uniquement régulée par la teneur en ERO mais également pas d'autres mécanismes qui mériteraient de plus amples investigations. Par ailleurs, dans une étude préalablement réalisée dans notre laboratoire, il a été démontré que si les enzymes antioxydantes n'étaient pas suffisantes pour contrôler la surproduction d'ERO, alors ces derniers agissaient sur ces enzymes en altérant leur activité (143). Dans notre projet, il a été démontré qu'à la suite d'une exposition sub-chronique de 3 mois aux PUF, divers mécanismes de défense antioxydante, qu'ils soient de nature enzymatique ou non, se mettent en place afin de rétablir un état d'équilibre redox. Ces défenses étant toujours vigoureusement actives à la suite des expositions amènent à s'interroger sur leur efficacité à atteindre leur objectif homéostatique. C'est pourquoi, d'éventuelles conséquences lésionnelles ont été recherchées au niveau de plusieurs composants cellulaires dont les lipides, les protéines et l'ADN.

Ces analyses ont démontré que l'activation de ces défenses étaient suffisantes pour protéger les différents constituants cellulaires puisqu'aucune lésion oxydative (*i.e.*, 8-OHdG, 8-OHG, 4-HNE, AGE, AOPP et Prot-CO) n'a été détectée à la suite de l'exposition sub-chronique aux PUF. En effet, aucune lésion à l'ADN ni à l'ARN n'a été observée, comme le montrent respectivement les dosages des biomarqueurs d'oxydation de l'ADN et de l'ARN, 8-OHdG et 8-OHG. Il en est de même au niveau des protéines comme le montre respectivement les dosages des biomarqueurs de carbonylation, d'oxydation et de glycation des protéines, Prot-CO, AOPP et AGE, ainsi qu'aux lipides comme le montrent les résultats du dosage du biomarqueur de peroxydation lipidique 4-HNE. L'absence de lésions macromoléculaires suggère ainsi que l'activation concomitante de défenses antioxydantes de nature variée permet à ces dernières de ne pas être débordées et de réussir à réguler l'homéostasie redox après une exposition sub-chronique à des doses relativement faibles de PUF. Une diminution significative de certains de ces paramètres est toutefois parfois observée, notamment au niveau cérébral où un aminuement de la concentration en 4-HNE, 8-OHdG et Prot-CO est constaté, de même qu'au niveau rénal avec un abaissement du niveau en AOPP. Cela conforte le caractère protecteur des enzymes antioxydantes, tel que la capacité de l'HO-1 à induire la génération de bilirubine qui, en se liant à PPAR α , inhibe l'accumulation des lipides ou celle de NQO1 à limiter les phénomènes de peroxydation lipidique en agissant sur l'ubiquinone (426,427). En plus de cataboliser le métabolisme des quinones, NQO1 intervient également dans le métabolisme des xénobiotiques au sens large, au même titre que les cytochromes P450. Burke et son équipe (2021) ont d'ailleurs montré que plus les expressions géniques d'*Nqo1* et *Cyp1a1* étaient élevées, plus la formation de l'adduit à l'ADN, 8-OHdG, était faible (428). Cette détoxification des xénobiotiques et notamment des HAP par les cytochromes P450 n'a cependant pas que des effets bénéfiques puisqu'elle est susceptible de conduire et d'entretenir la formation ERO qui pourront alors à leur tour agir sur les macromolécules cellulaires (429). La majorité des études ayant cherché à étudier l'induction d'un stress oxydant la suite d'exposition aux PUF ont montré la présence de lésions oxydatives. À titre d'exemple, dans une étude récente, Li et son équipe (2023) ont démontré que l'exposition d'hépatocytes murins à des PUF de suie pendant 6h induisait des dommages à l'ADN comme en témoigne la concentration accrue en 8-OHdG (425). Gasparotto et son équipe (2013) ont quant à eux montré l'induction d'une augmentation du récepteur aux AGE dans des cultures de macrophages exposées à 0,25 ; 0,5 ou 1 mg de PUF/mL issues de la combustion de charbon et de pneus pendant 12 ou 24 h (430). Cette différence de résultats peut s'expliquer par le fait qu'ici il s'agit de deux études *in vitro* dans laquelle les cellules sont directement exposées aux PUF, sans subir tous les mécanismes biologiques d'épuration qui se déroulent dans un organisme entier. De plus, il s'agit d'une exposition aiguë, ne laissant pas le temps à l'ensemble des mécanismes compensateurs antioxydants de se mettre en place afin de faire face aux ERO générées par les PUF. Cheng et ses collaborateurs (2016) ont quant à eux étudié l'induction d'un stress oxydant au niveau de l'épithélium olfactif et de différentes structures cérébrales chez des souris C57BL/6 exposées à 343 μg de PUF/m³ pendant un total de 5, 20 ou 45 heures cumulées sur 3 semaines (431). Il a ainsi été démontré que cette exposition induisait une augmentation du 4-HNE et d'un marqueur de nitration des résidus tyrosine des protéines, le 3-nitrotyrosine dans l'épithélium et les bulbes olfactifs, sans qu'une augmentation de ces biomarqueurs n'ait été constatée dans les autres régions du cerveau. Ces résultats montrent ainsi que le transport des PUF inhalées dans le cerveau se fait lentement, ce qui peut contribuer à retarder les réponses oxydatives au niveau cérébral et expliquer l'absence de lésions oxydatives cérébrales dans le cadre de notre projet. Alessandrini et son équipe (2009) a par ailleurs démontré que l'exposition corps entier à 504 μg de PUF/m³ induisait une peroxydation lipidique au niveau pulmonaire chez des souris Balb/c sensibilisées à l'ovalbumine, comme en témoigne les résultats du dosage du 8-isoprostane (76). Par rapport aux résultats obtenus dans notre projet, cette différence de résultats peut s'expliquer par le modèle murin employé qui est constitutivement plus sensible aux allergènes et xénobiotiques de par sa sensibilisation préalable à l'ovalbumine. En outre, du fait de leur petite taille, les PUF sont susceptibles d'être rapidement distribuées au niveau systémique, puis éliminées contrairement aux PM_{2,5} qui

subissent un phénomène de rétention plus important au niveau pulmonaire, comme ont pu le démontrer les résultats du projet « PARTICLES » réalisé au sein du laboratoire (367).

2. Mesure de la réponse inflammatoire

A. Numération cellulaire du LBA

Le tableau 40 présente les résultats obtenus pour la numération cellulaire des LBA des souris exposées à 10 µg ou 30 µg de PUF/instillation et des souris témoins, exprimée en %. Les LBA des souris du groupe témoin ont présenté une majorité de macrophages non chargés en PUF, à hauteur de 84,3 %, tandis que les autres types cellulaires étaient faiblement représentés. Des augmentations significatives des nombres de macrophages chargés en PUF et de polynucléaires, et, au contraire, des diminutions des nombres de macrophages non chargés en PUF, ont été observés dans les LBA des souris exposées aux PUF. En effet, à la dose la plus faible de PUF, 27,5 % de macrophages ayant internalisés des particules et 38,2 % de polynucléaires ont été observés. De la même manière, à la dose de 30 µg de PUF/instillation, ceux-ci ont représenté 33,3 % et 29,3 % des cellules totales des LBA, respectivement.

Tableau 40 : Numération cellulaire des LBA 24h après l'exposition sub-chronique des souris aux PUF (en %) (n = 6/groupe, p < 0,05, p < 0,01** vs témoins, SP).*

PUF (%)	Macrophages			Polynucléaires	Lymphocytes
	Absence	++	++++		
Témoins (SP)	84,3	4,6	0,8	5,4	4,9
10 µg/instillation	29,9**	23,3**	4,2**	38,2**	4,4
30 µg/instillation	31,8**	26,7**	6,6**	29,3*	5,6

B. Analyses histologiques des tissus pulmonaires

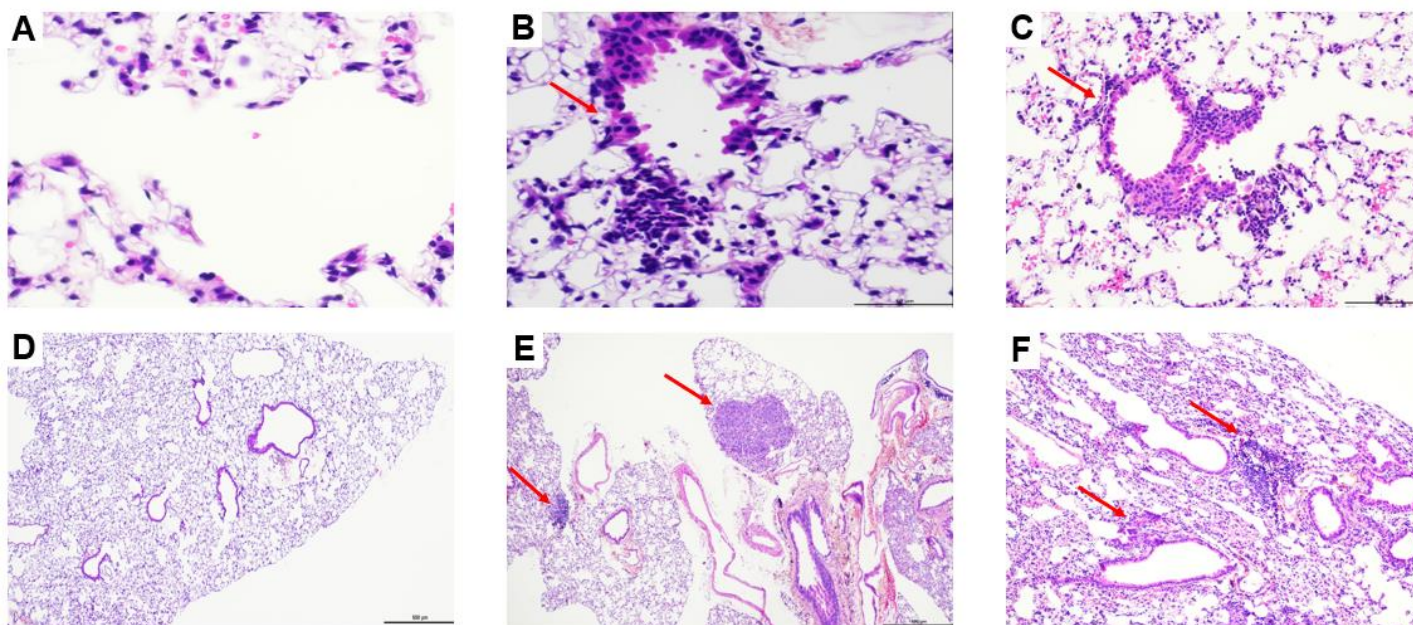


Figure 67 : Observations histologiques de coupes de poumons de souris exposées au sérum physiologique (A,D), à la dose de 10 µg de PUF/instillation (B,E) et à la dose de 30 µg de PUF/instillation (C,F), 24 h après le protocole d'exposition sub-chronique (A,B,C ; x200) ou à la suite de la période de recouvrement (D,E,F) (x40). Présence de foyers inflammatoires polymorphes indiquée par les flèches rouges.

Les analyses histologiques réalisées dans les poumons des souris exposées de manière sub-chronique aux PUF ont indiqué la présence d'une alvéolite caractérisée par l'existence de foyers inflammatoires alvéolaires, avec présence d'amas lymphoïdes périvasculaires et péribronchiques, témoignant bien de la chronicité de l'exposition (figures 67 B et C). Ces foyers inflammatoires ont persisté jusqu'à 3 mois après cessation des expositions aux PUF (figures 67 E et F).

Au niveau hépatique, une stéatose modérée a été observée de manière ubiquitaire chez l'ensemble des souris, quel que soit leur groupe d'exposition. Celle-ci pourrait donc s'expliquer par la technique d'euthanasie des animaux ou par l'anesthésie répétée à l'isoflurane. Par ailleurs, une dilatation des structures tubulaires a été observée au niveau rénal. Au niveau cardiaque, aucune modification histologique n'a été identifiée entre les différents groupes d'exposition.

C. Étude de la voie de signalisation NFκB

i. Mesure de l'activité de fixation à l'ADN du facteur de transcription NFκB

La figure 68 présente les résultats obtenus pour l'étude de la liaison à l'ADN du facteur de transcription NFκB dans les 5 organes cibles (poumons, cœur, reins, foie et cerveau) par la méthode TransAM. Les valeurs brutes exprimées en U Abs chez les témoins négatifs, c'est-à-dire les souris exposées au sérum physiologiques, étaient respectivement de 0,30 +/- 0,08 ; 0,23 +/- 0,05 ; 0,31 +/- 0,06 ; 0,30 +/- 0,08 et 0,26 +/- 0,12 dans les poumons, le cœur, les reins, le foie et le cerveau. Aucune différence significative n'a été observée quelle que soit la dose testée et l'organe étudié, à l'exception de la dose de 10 µg de PUF/instillation qui a induit une augmentation significative de la capacité de liaison à l'ADN de NFκB dans le cœur avec un FC de 4,7, et celle de 30 µg dans le cerveau avec un FC de 3,0.

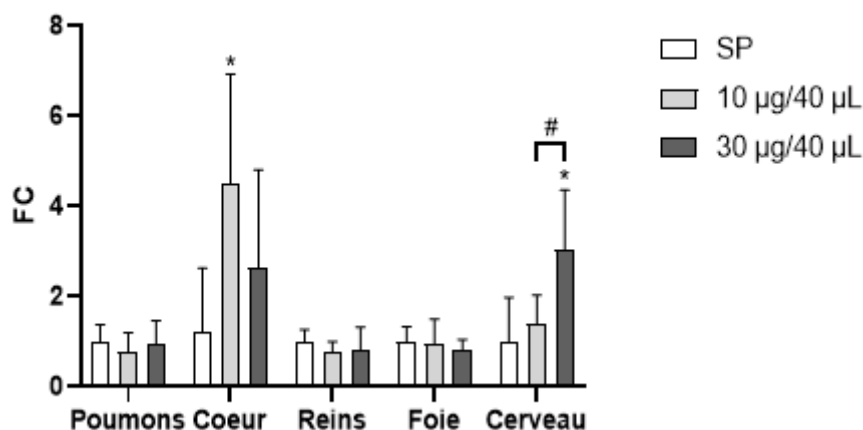


Figure 68 : Capacité de liaison à l'ADN du facteur de transcription NFκB dans les organes-cibles, (FC = Fold Change, $p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$ vs témoins, SP ; $p < 0,05^{\#}$ vs 10 µg/instillation)

ii. Dosage de cytokines

La figure 69 présente les résultats obtenus pour le dosage d'un panel de 19 cytokines (*i.e.*, IFN-γ, IL-1β, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12p70, IL-15, IL-17 A/F, IL-27p28/IL-30, IL-33, IP-10, KC/GRO-α, MCP-1, MIP-1α, MIP-2 et TNF-α) dans les 5 organes cibles étudiés et le sang des souris exposées ou non aux PUF.

Dans les poumons, les valeurs brutes des concentrations en cytokines, exprimées en pg/mg de protéines, étaient les suivantes : 0,013 +/- 0,03 pour l'IFN-γ, 15,23 +/- 4,28 pour l'IL-1β, 0,32 +/- 0,12 pour

l'IL-2, 0,28 +/- 0,13 pour l'IL-4, 0,77 +/- 0,18 pour l'IL-5, 14,37 +/- 3,80 pour l'IL-6, 13,14 +/- 8,43 pour l'IL-9, 0,50 +/- 0,19 pour l'IL-10, 2,03 +/- 0,85 pour l'IL-12p70, 39,48 +/- 15,71 pour l'IL-15, 5,18 +/- 2,41 pour l'IL-17 A/F, 5,32 +/- 2,40 pour l'IL-27p28/IL-30, 111,92 +/- 29,84 pour l'IL-33, 17,76 +/- 3,50 pour l'IP-10, 12,52 +/- 6,08 pour KC/GRO- α , 38,30 +/- 16,60 pour MCP-1, 6,71 +/- 1,34 pour MIP- 1 α , 4,49 +/- 0,56 pour MIP-2 et 2,11 +/- 0,61 pour le TNF- α .

Dans le coeur, les valeurs brutes des concentrations en cytokines, exprimées en pg/mg de protéines, étaient les suivantes : 0,03 +/- 0,02 pour l'IFN- γ , 1,00 +/- 0,43 pour l'IL-1 β , 0,09 +/- 0,02 pour l'IL-2, 0,17 +/- 0,16 pour l'IL-4, 0,22 +/- 0,12 pour l'IL-5, 3,60 +/- 0,43 pour l'IL-6, 6,54 +/- 3,17 pour l'IL-9, 0,20 +/- 0,22 pour l'IL-10, 1,36 +/- 0,56 pour l'IL-12p70, 23,51 +/- 5,90 pour l'IL-15, 1,26 +/- 0,44 pour l'IL-17 A/F, 1,70 +/- 0,67 pour l'IL-27p28/IL-30, 12,40 +/- 7,44 pour l'IL-33, 0,45 +/- 0,17 pour l'IP-10, 1,03 +/- 0,59 pour KC/GRO- α , 2,00 +/- 1,58 pour MCP-1, 0,45 +/- 0,20 pour MIP- 1 α , 0,35 +/- 0,10 pour MIP-2 et 0,29 +/- 0,09 pour le TNF- α .

Dans les reins, les valeurs brutes des concentrations en cytokines, exprimées en pg/mg de protéines, étaient les suivantes : 0,01 +/- 0,00 pour l'IFN- γ , 1,07 +/- 0,34 pour l'IL-1 β , 0,04 +/- 0,02 pour l'IL-2, 0,03 +/- 0,01 pour l'IL-4, 0,06 +/- 0,02 pour l'IL-5, 1,13 +/- 0,49 pour l'IL-6, 0,71 +/- 0,46 pour l'IL-9, 0,00 +/- 0,00 pour l'IL-10, 0,20 +/- 0,16 pour l'IL-12p70, 0,22 +/- 0,13 pour l'IL-15, 0,29 +/- 0,12 pour l'IL-17 A/F, 0,83 +/- 0,20 pour l'IL-27p28/IL-30, 2,46 +/- 0,56 pour l'IL-33, 0,98 +/- 0,21 pour l'IP-10, 2,09 +/- 1,46 pour KC/GRO- α , 1,02 +/- 0,35 pour MCP-1, 0,32 +/- 0,07 pour MIP- 1 α , 0,25 +/- 0,06 pour MIP-2 et 0,09 +/- 0,03 pour le TNF- α .

Dans le foie, les valeurs brutes des concentrations en cytokines, exprimées en pg/mg de protéines, étaient les suivantes : 0,01 +/- 0,01 pour l'IFN- γ , 1,91 +/- 0,69 pour l'IL-1 β , 0,03 +/- 0,06 pour l'IL-2, 0,06 +/- 0,07 pour l'IL-5, 2,34 +/- 3,04 pour l'IL-6, 0,05 +/- 0,11 pour l'IL-10, 0,23 +/- 0,44 pour l'IL-17 A/F, 0,48 +/- 0,31 pour l'IL-27p28/IL-30, 0,44 +/- 0,27 pour l'IL-33, 0,54 +/- 0,34 pour l'IP-10, 6,33 +/- 9,00 pour KC/GRO- α , 0,25 +/- 0,11 pour MCP-1, 0,11 +/- 0,05 pour MIP- 1 α , 0,16 +/- 0,12 pour MIP-2 et 0,07 +/- 0,05 pour le TNF- α .

Dans le cerveau, les valeurs brutes des concentrations en cytokines, exprimées en pg/mg de protéines, étaient les suivantes : 0,01 +/- 0,00 pour l'IFN- γ , 0,09 +/- 0,04 pour l'IL-1 β , 0,02 +/- 0,01 pour l'IL-2, 0,24 +/- 0,07 pour l'IL-5, 3,92 +/- 1,15 pour l'IL-6, 0,04 +/- 0,3 pour l'IL-10, 0,17 +/- 0,12 pour l'IL-17 A/F, 0,40 +/- 0,32 pour l'IL-27p28/IL-30, 1,20 +/- 0,67 pour l'IL-33, 0,16 +/- 0,07 pour l'IP-10, 0,30 +/- 0,07 pour KC/GRO- α , 0,21 +/- 0,17 pour MCP-1, 0,17 +/- 0,10 pour MIP- 1 α , 0,07 +/- 0,04 pour MIP-2 et 0,03 +/- 0,01 pour le TNF- α .

Dans le sang, les valeurs brutes des concentrations en cytokines, exprimées en pg/mg de protéines, étaient les suivantes : 0,12 +/- 0,07 pour l'IFN- γ , 0,64 +/- 0,27 pour l'IL-1 β , 0,18 +/- 0,15 pour l'IL-5, 5,17 +/- 2,60 pour l'IL-6, 0,19 +/- 0,17 pour l'IL-27p28/IL-30, 0,07 +/- 0,7 pour l'IL-33, 0,81 +/- 0,21 pour l'IP-10, 15,54 +/- 10,24 pour KC/GRO- α , 0,24 +/- 0,08 pour MCP-1, 0,01 +/- 0,01 pour MIP- 1 α , 0,09 +/- 0,03 pour MIP-2 et 1,73 +/- 0,47 pour le TNF- α .

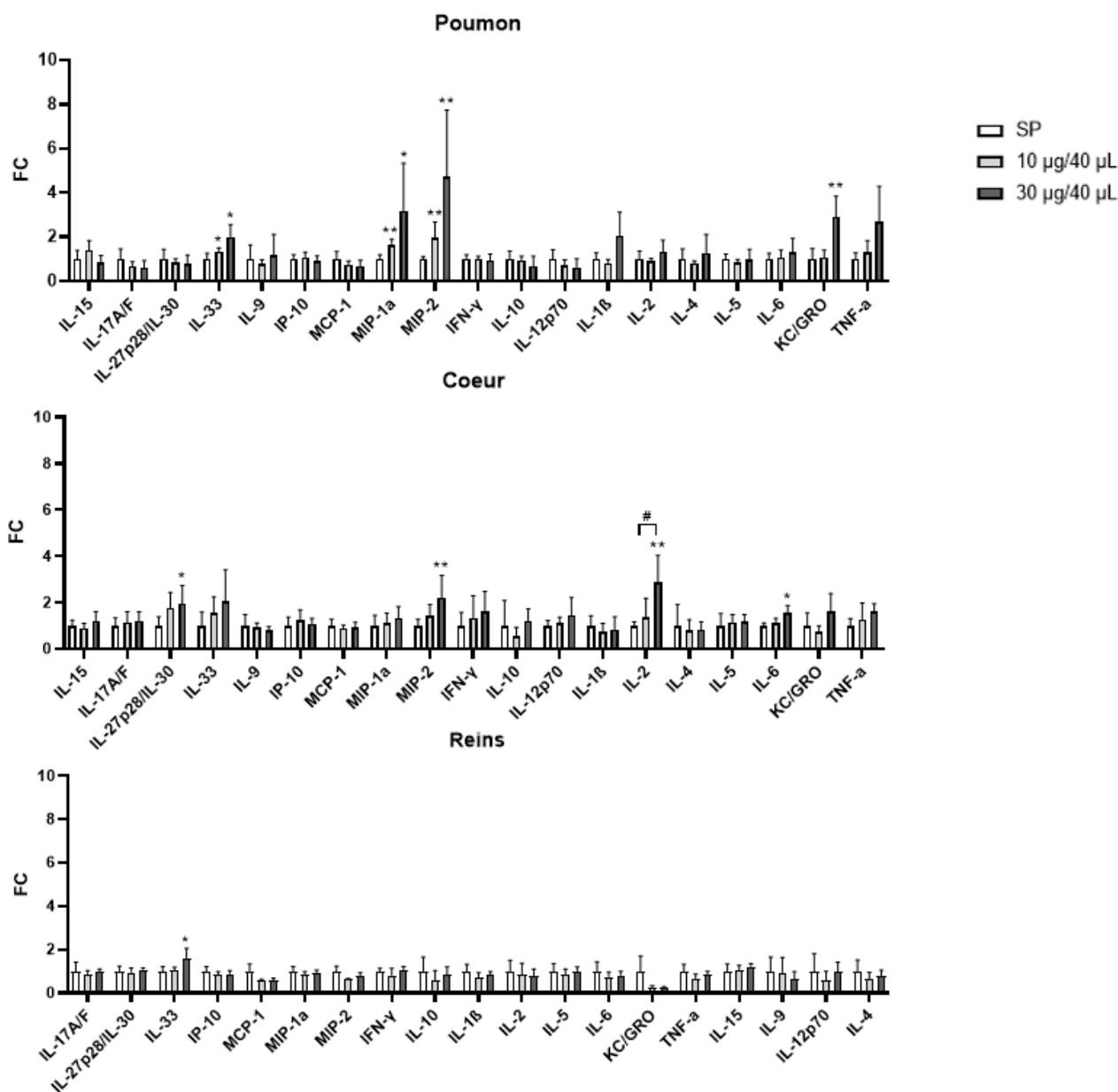
Dans les poumons, une augmentation significative de l'expression de l'IL-33 a été observée quelle que soit la dose de PUF employée, atteignant des FC respectifs de 1,34 et 2,01 pour les doses de 10 μ g et 30 μ g de PUF/instillation. Il en est de même pour MIP-1 α et de MIP-2 qui ont atteint des FC respectifs de 1,65 et 1,98 avec la dose la plus faible de PUF, et de 3,20 et 4,72 pour la dose la plus élevée. Enfin, une augmentation de l'expression de KC/GRO a également été observée mais celle-ci n'était significative qu'avec la dose de 30 μ g de PUF/instillation, atteignant un FC de 2,91.

Au niveau cardiaque, les expressions de l'IL-30, de MIP-2 et de l'IL-6 ont significativement été augmentées à la suite d'une exposition sub-chronique à la dose la plus élevée de 30 µg de PUF/instillation, atteignant des FC respectifs de 1,96 ; 2,21 et 1,55. Une augmentation dose-dépendante de l'IL-2 a également été constatée, atteignant des FC respectifs de 1,38 et 2,87 pour les doses de 10 µg et 30 µg de PUF/instillation.

Une augmentation significative de l'expression de l'IL-33 a également été constatée dans les organes de filtration (*i.e.*, reins, foie) chez les souris exposées à la dose la plus élevée de PUF, atteignant des PC respectifs de 1,61 et 3,42.

Au niveau cérébral, une exposition sub-chronique à une faible dose de 10 µg de PUF/instillation a induit des augmentations significatives de l'expression de l'IL-33, du MCP-1 et de l'IL-5 tandis qu'il faut administrer la dose de 30 µg de PUF/instillation pour obtenir une élévation de KC/GRO. Seule l'augmentation de l'expression de MCP-1 s'est faite de manière dose-dépendante, atteignant des FC de 1,67 et 2,58 aux doses respectives de 10 µg et 30 µg de PUF/instillation. En parallèle, une diminution significative de l'IL-9 a été observée avec un FC égal à 0,30.

Enfin, au niveau circulant, seule une augmentation significative de l'IL-15 a été observée à la suite d'une exposition sub-chronique à la dose de 30 µg de PUF/instillation, avec un FC de 3,17.



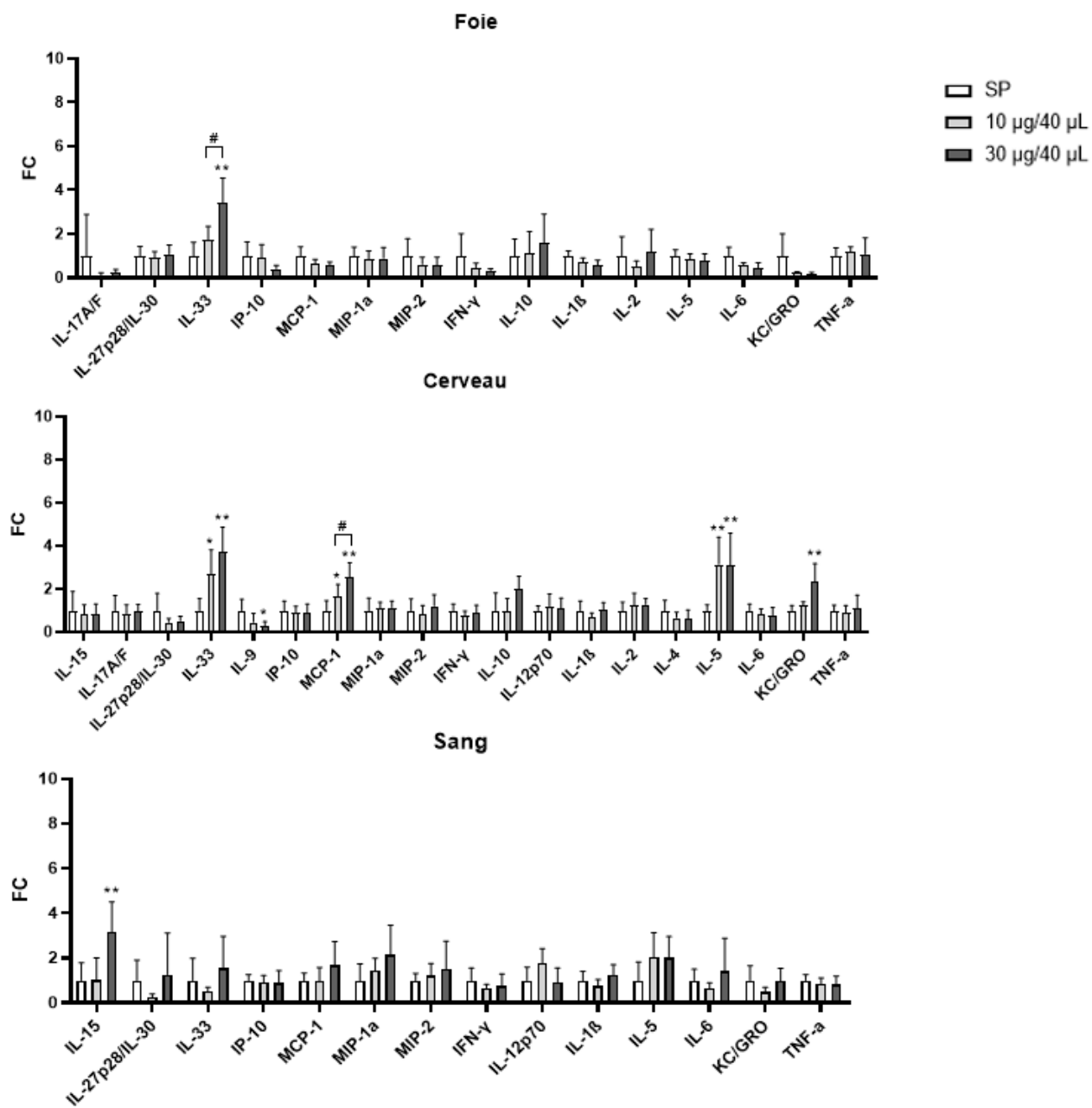


Figure 69 : Profils des cytokines dans les organes-cibles 24 h après l'exposition sub-chronique des souris aux PUF (FC = Fold Change, $p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$ vs témoins, SP ; $p < 0,05^{\#}$ vs 10 µg/instillation).

D. Discussion

Jusqu'à présent, les résultats de ce projet de recherche ont suggéré la capacité des PUF et/ou des composés désorbés à partir de ces dernières à atteindre l'ensemble des organes cibles, où ils induisent probablement une surproduction d'ERO, néanmoins contrôlée. En effet, en réponse, l'organisme active diverses défenses antioxydantes qui parviennent à rétablir un état d'homéostasie redox et limitent l'apparition de conséquences lésionnelles. Ainsi, afin de maintenir la coordination des réponses cellulaires essentielles au rétablissement d'un état d'équilibre cellulaire et/ou tissulaire, les voies de signalisation cellulaire NRF2 et NFκB, qui régulent respectivement les réponses cellulaires au stress oxydant et à l'inflammation, interagissent étroitement par le biais de multiples interactions moléculaires (185). De ce fait, cette interconnexion est au cœur de la régulation de l'homéostasie redox en réponse au stress et à l'inflammation. En plus d'avoir des propriétés antioxydantes, certaines de ces défenses possèdent également des propriétés anti-inflammatoires et immunomodulatrices. Ceci est particulièrement le cas de l'enzyme HO-1 pour laquelle code le gène *HMOX1* (432). Ce dernier, significativement augmenté de manière dose-dépendante dans l'ensemble des organes, est impliqué dans la dégradation de l'hème sous forme de fer ferreux Fe^{2+} , de monoxyde de carbone (CO) et de biliverdine. Ces deux derniers métabolites présentent des propriétés anti-inflammatoires largement décrites dans la littérature. En effet, le CO serait capable d'inhiber l'inflammasome NLRP3, entraînant une diminution de la sécrétion d'IL-1β et d'IL-18 (433). L'inhalation *in vivo* de CO induirait également une diminution de la production macrophagique de TNF, d'IL-1β et de CCL3 pro-inflammatoires couplée à une augmentation de la production d'IL-10 anti-inflammatoire (434). En outre, le CO serait capable d'interférer avec des voies de signalisation telles que ERK/MAPK, JNK/MAPK, NF-κB et AP-1, lui conférant des propriétés anti-inflammatoires (435,436). La biliverdine, quant à elle, est rapidement convertie en bilirubine par la biliverdine réductase. Chez des rats soumis à des endotoxines, l'injection de biliverdine induit une diminution de la sécrétion d'IL-6 et une augmentation d'IL-10 (437). À cela s'ajoute sa capacité à inhiber l'activation de la voie de signalisation NFκB et la production de cytokines pro-inflammatoires qui en découle (438). De la même manière, SOD1 serait elle-aussi capable d'inhiber l'activation de cette dernière (439). Par ailleurs, NQO1 serait capable d'inhiber la production des cytokines dépendantes du TLR (*i.e.*, IL-6, IL-12) et de VCAM-1 induite par le TNF-α (440,441). À partir de ce constat, nous nous sommes demandé si les propriétés anti-inflammatoires de ces enzymes antioxydantes étaient suffisantes pour empêcher le développement d'une réponse inflammatoire au sein des organes-cibles, d'autant plus que les pathologies d'origine environnementale sont le plus souvent caractérisées par une composante hautement inflammatoire en plus d'avoir un statut redox altéré.

Ce déséquilibre de la balance oxydants/antioxydants serait capable d'induire la voie de signalisation NFκB qui est au cœur de la réponse inflammatoire (442). Tout comme NRF2, le facteur de transcription NFκB est habituellement trouvé, en conditions physiologiques, sous forme cytosolique inactive, lié à son inhibiteur IKB. Cependant, en cas de stress cellulaire tel que la présence d'un xénobiotique, NFκB est transloqué dans le noyau de la cellule avant de se lier aux promoteurs de ses gènes cibles codant pour des médiateurs de la réponse inflammatoire. Des altérations du statut redox GSH/GSSG par les oxydants environnementaux telles que cela a pu être observé dans notre étude peuvent également moduler l'activation du facteur de transcription NFκB, conduisant à la transcription de gènes pro-inflammatoires, au recrutement de cellules immunitaires (*i.e.*, polynucléaires, macrophages, lymphocytes) et au relargage d'une grande diversité de cytokines (153). En plus d'augmenter la production de cytokines inflammatoires, de chimiokines et de molécules d'adhésion, NFκB intervient dans la régulation de la prolifération cellulaire, de l'apoptose, de la morphogenèse et de la différenciation, faisant d'NFκB le chef d'orchestre de la réponse inflammatoire (184). L'activation de cette voie de signalisation a par ailleurs déjà été démontré chez des lymphocytes humains isolées de volontaires sains exposés à une dose constante de 20 μg de PUF pendant 0 à 96h (188). Alessandrini et son équipe (2006

et 2009) ont également démontré son activation dans les poumons de souris Balb/c sensibilisées à l'ovalbumine et exposées de manière aiguë à 40 µg de PUF (76,77). C'est pourquoi, une investigation de cette voie de signalisation a été entreprise, avec dans un premier temps, une étude de la capacité de liaison à l'ADN de ce facteur de transcription qui a été mesurée, ne montrant aucune différence significative, pour les mêmes raisons que celles évoquées pour le facteur de transcription NRF2. Afin de poursuivre nos recherches, un panel d'une vingtaine de cytokines a été exploré. Cette analyse a notamment révélé une augmentation significative de l'IL-33 au sein de la plupart des organes cibles étudiés. Il s'agit d'une cytokine jouant le rôle de signal d'alarme, exprimée par les cellules endothéliales et épithéliales des tissus en contact avec l'environnement et pouvant être libérée de façon passive par les cellules nécrotiques ou de manière active à la suite d'un stress oxydant (443). Dans une étude visant à étudier la capacité des DEP à booster l'allergie induite par un acarien, De Grove et son équipe (2018) ont, eux aussi, démontré qu'une exposition unique à des DEP combinées à un allergène sensibilisant induisait une augmentation conséquente de l'IL-33 dans les tissus pulmonaires de souris C57BL/6 (189). De nombreuses études ont démontré le rôle majeur joué par cette dernière dans l'initiation des réponses immunes de type 2 et les maladies allergiques en entraînant l'activation et l'expansion de cellules immunitaires innées cibles de l'IL-33, notamment les ILC2, les basophiles et les mastocytes (444). En conséquence, ces derniers activent la production de divers médiateurs de la réponse immunitaire tels que les interleukines 4, 5, 13 intervenant dans la polarisation des macrophages M2, ainsi que les chimiokines MCP-1 (*i.e.*, CCL2), KC (*i.e.*, CXCL1), MIP-1 α (*i.e.*, CCL3) et MIP-2 (*i.e.*, CCL4) (445–448). L'expression de plusieurs de ces composés a été significativement augmentée à la suite des expositions sub-chroniques particulières. Ceci est le cas de l'IL-5, du MCP-1 et du KC au niveau cérébral, de l'IL-5 au niveau circulant et des chimiokines KC, MIP-1 α et MIP-2 au niveau pulmonaire. Ces chimiokines sont notamment impliquées dans le recrutement des neutrophiles et des lymphocytes lors de la réponse immunitaire, ce qui est concordant avec les résultats obtenus lors de la numération cellulaire des LBA mais aussi lors des observations histologiques pulmonaires (449). L'IL-5 a quant à elle un rôle dans la prolifération et la différenciation des lymphocytes B et des granulocytes éosinophiles tandis que le MCP-1 est plutôt impliqué dans la régulation de la migration et de l'infiltration des monocytes et macrophages (450). L'IL-33 jouerait également un rôle dans la régulation de la transition épithélio-mésenchymateuse dans le contexte de l'inflammation chronique allergique, de la fibrose voire même du cancer au sein de divers organes dont les poumons, les reins, le foie et le cerveau (451–454). La polarisation des macrophages vers un profil M2 anti-inflammatoire et immunomodulateur étant finement régulée par ces cytokines de type Th2 (*i.e.*, IL-4, IL-5, IL-13), il a été décidé d'entreprendre des marquages immunohistochimiques couplés à des analyses par western blot afin de visualiser si cette polarisation avait eu lieu au niveau pulmonaire suite aux expositions particulières (449). Ces analyses complémentaires ont révélé une augmentation du nombre total de macrophages comme en témoignent les résultats obtenus pour les marqueurs F4/80, CD11C, CD68 et Iba1/AIF1, confortant ainsi les résultats précédemment obtenus lors de la numération cellulaire des LBA. Par ailleurs, ces analyses ont révélé une évolution du profil des macrophages caractérisée par une tendance à la diminution des macrophages M1 au profit des macrophages M2, suggérant une évolution de la réponse inflammatoire vers un remodelage tissulaire, comme en témoigne les résultats obtenus respectivement pour les biomarqueurs iNOS et CD86 d'une part, et les marqueurs CD163 et CD206 d'autre part. Bien que semblant surprenante aux premiers abords, l'élévation de l'expression du marqueur CD86 n'est pas en contradiction avec les résultats précédents. En effet, souvent employé pour identifier les macrophages M1, CD86 est pourtant également exprimé par la sous-population de macrophages M2b dont l'expression est stimulée en présence d'endotoxines, suggérant bien l'implication des PUF dans l'orientation de cette polarisation (455). L'expression de certaines de ces cytokines pro-inflammatoires a également été identifiée comme étant significativement augmentée à la suite d'expositions aux PUF dans quelques études *in vivo*. Ainsi, Alessandrini et son équipe (2006, 2009) ont démontré que l'exposition à 40 µg de PUF induisait une augmentation de l'expression des interleukines 4, 5 et 13 au niveau pulmonaire chez des souris Balb/c

sensibilisées à l'ovalbumine (76,77). De la même manière, Liu et son équipe (2018) ont démontré qu'une exposition subaiguë d'une durée de 7 jours à des DEP augmentait les niveaux d'expression de l'IL-6 et de l'IL-13 chez des souris hypertendues (190). Bien que ces deux dernières études aient été réalisées chez des souris présentant déjà une sensibilité accrue aux xénobiotiques par nature, elles présentent des résultats en concordance avec ceux observés dans notre projet chez des souris exposées pendant un temps nettement plus court. Cela suggère donc une sécrétion précoce de ces cytokines pro-inflammatoires en réponse aux polluants environnementaux, qui perdure avec la répétition des expositions. Dans une autre étude réalisée au sein de notre laboratoire sur des souris Balb/c, une exposition sub-chronique de 3 mois à 10 µg de PUF avait elle aussi induit la sécrétion accrue d'IL-6, sans augmentation de l'IL-1β au niveau pulmonaire (192). Par ailleurs, dans cette même étude, une sécrétion accrue d'IL-10 fut visible à la suite de 3 mois d'exposition alors qu'elle ne l'était pas après seulement un mois d'exposition. Dans notre projet, aucune variation de la sécrétion d'IL-10 anti-inflammatoire ne fut constatée après 3 mois d'exposition quelle que soit la dose employée. Cette discordance au niveau des résultats pourrait s'expliquer par le nombre d'instillation hebdomadaire réalisée, ce dernier étant plus faible dans le cadre de notre projet. Au niveau cardiaque, ce sont les interleukines 2, 6 et 30 (*i.e.*, IL-27p28/IL-30) qui ont pu être mises en évidence à la suite des expositions particulières, en plus du MIP-2. Plusieurs études ont démontré que l'IL-6 avait des propriétés similaires à celles de l'IL-5 et qu'elle était capable d'induire un risque accru de développer une insuffisance cardiaque en cas de forte concentration (456,457). L'IL-2 est, quant à elle, essentielle au recrutement et à la prolifération des lymphocytes T ainsi qu'à la génération de cellules mémoires. Enfin, l'IL-30 forme l'IL-27 hétérodimérique en s'associant avec le gène 3 induit par le virus d'Epstein-Barr. Cette dernière jouerait un rôle dans l'activation des cellules tueuses naturelles et la stimulation de la différenciation des plasmocytes (458). Ainsi, l'exposition aux particules induit la production d'un important panel de cytokines, favorisant le développement d'un environnement inflammatoire au sein des différents organes cibles, susceptible de conduire à l'apparition et/ou à l'exacerbation de pathologies diverses (153). Afin d'objectiver cet effet multi-organe au niveau sanguin, il a été jugé pertinent d'effectuer une analyse des miARN circulants, ces derniers pouvant constituer de bons marqueurs d'exposition et/ou d'effets des PUF du fait de leur stabilité et accessibilité.

VI. Évaluation des altérations transcriptomiques

1. Étude du miRnome

A. Analyses des miARN circulants

Une étude des profils d'expression des miARN circulants a été effectuée, avant d'en extraire une liste de miARN d'intérêt à rechercher spécifiquement au sein des différents organes cibles afin d'en évaluer la contribution spécifique.

La figure 70 présente les résultats obtenus pour l'étude des profils d'expression des miARN circulants réalisée par miRNA-seq, dont le FC était inférieur à 0,5 (sous-exprimé) ou supérieur à 1,5 (sur-exprimé) par rapport au groupe témoin. À la suite d'une exposition sub-chronique à la dose de 10 µg de PUF/instillation, 4 miARN (*i.e.*, 4 sous-exprimés) ont été retrouvés comme étant significativement dérégulés par rapport au groupe témoin. Ce nombre était d'autant plus important à la suite d'une exposition sub-chronique à la dose de 30 µg de PUF/instillation, atteignant un total de 55 miARN différentiellement exprimés (*i.e.*, 13 sur- et 42 sous-exprimés). Lorsque les deux groupes de souris exposées aux doses croissantes de PUF sont comparés, 93 miARN sont retrouvés comme étant significativement dérégulés (*i.e.*, 43 sur- et 47 sous-exprimés). Ce nombre plus important de miARN différentiellement exprimés dans la condition 30 µg vs 10 µg de PUF par rapport à la condition 30 µg de PUF vs SP et 10 µg de PUF vs SP s'explique par le fait que l'exposition aux PUF, de par son action spécifique sur la régulation des miARN, fait converger l'expression des échantillons de souris exposées aux doses de 10 µg et 30 µg de PUF/instillation intranasale, ayant pour conséquence une moins grande variabilité entre les échantillons d'un même groupe de souris exposées.

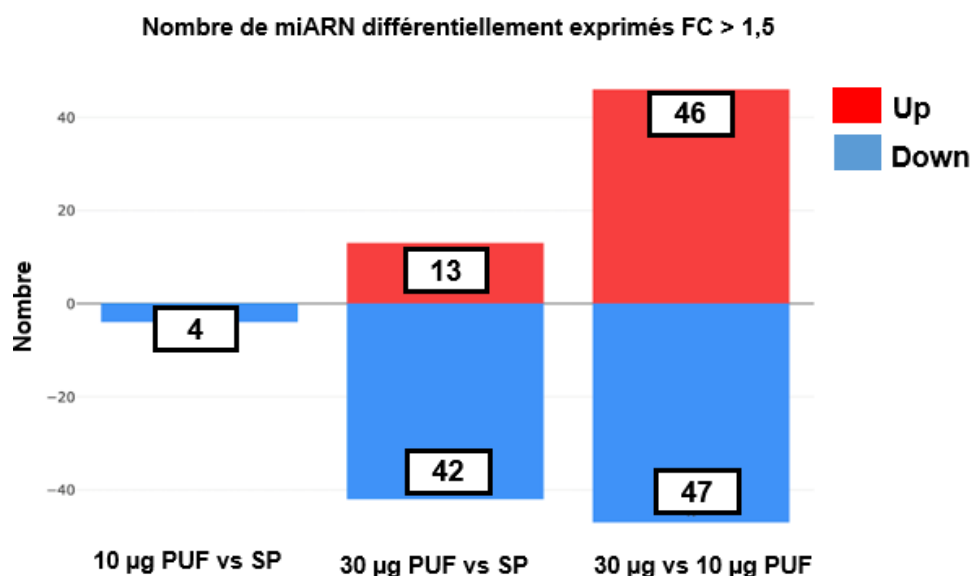


Figure 70 : Nombre de miARN circulants différentiellement exprimés 24 h après l'exposition sub-chronique des souris aux PUF (FC > 1,5, p < 0,05).

La figure 71 présente l'intersection des miARN circulants différemment exprimés chez les souris exposées ou non aux PUF, 24 heures après leur exposition sub-chronique. Trois conditions ont ainsi été testées : (1) 30 µg vs 10 µg de PUF, (2) 10 µg de PUF vs SP et (3) 30 µg de PUF vs SP. Il est ainsi possible de constater que parmi les 55 miARN circulants différemment exprimés dans la condition « 30 µg de PUF vs SP », un seul était en commun avec la condition « 10 µg de PUF vs SP » et 38 avec la condition « 30 µg vs 10 µg de PUF ». Parmi les 4 miARN circulants différemment exprimés dans la condition « 10 µg de PUF vs SP », aucun n'était commun avec la condition « 30 µg vs 10 µg de PUF ». Enfin, aucun miARN circulant n'a été différemment exprimé de manière commune entre les trois conditions étudiées.

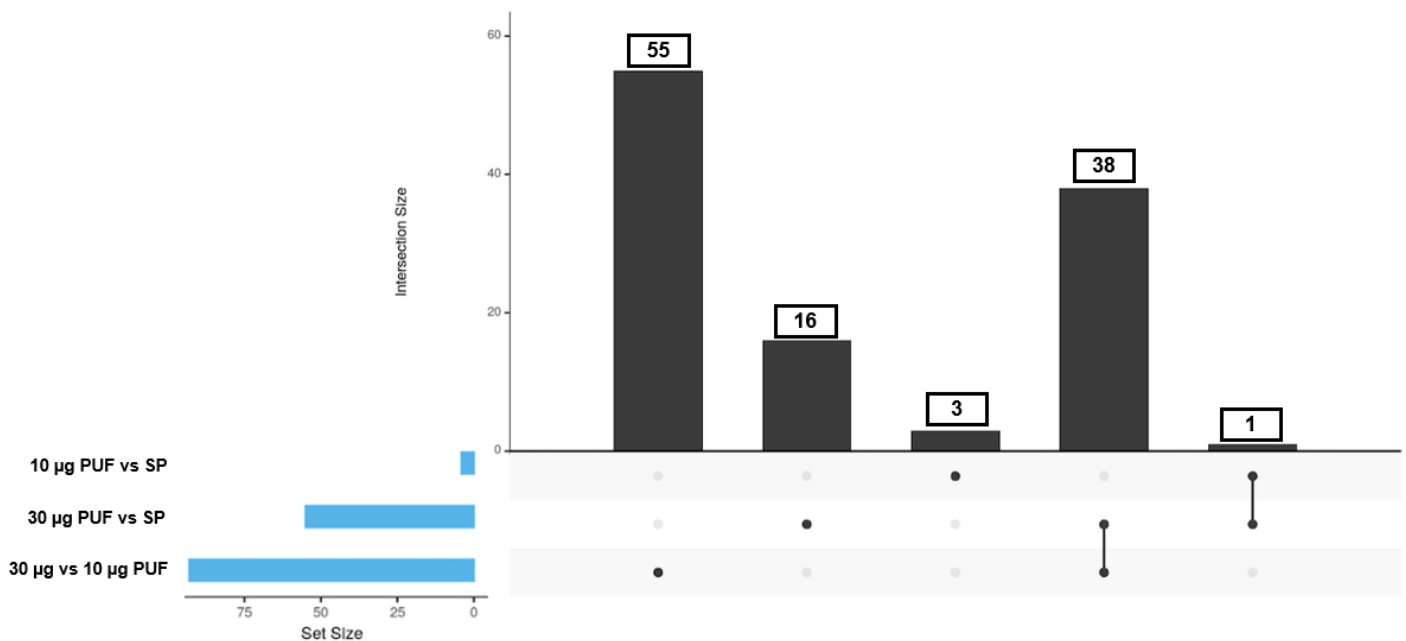


Figure 71 : Intersections des miARN différemment exprimés 24 h après l'exposition sub-chronique des souris aux PUF (FC > 1,5, p < 0,05).

B. Recherche de miARN candidats dans les organes cibles

Comme le montre la figure 72, le nombre de miARN significativement dérégulés par rapport au groupe témoin était nettement plus important dans le groupe de souris exposées à la dose la plus élevée de particules (*i.e.*, 30 μg de PUF/instillation) par rapport aux souris exposées à la dose la plus faible (*i.e.*, 10 μg de PUF/instillation). Il a ainsi été décidé de se focaliser uniquement sur les miARN les plus significativement dérégulés chez les souris exposées à la dose de 30 μg de PUF/instillation. Puis, à partir de ce panel de miARN, une étude approfondie de la littérature couplée à l'utilisation de banques de données de miARN (*i.e.*, miRDB, DIANA TarBase, miRSearch, miRTarBase) a permis d'extraire une liste de 18 miARN d'intérêt (7 sur- et 11 sous-exprimés) dont le différentiel d'expression est présenté dans la figure 72. Les 7 miARN sur-exprimés retenus étaient les miR-214-3p, miR-133a-5p, miR-146b-3p, miR-193a-5p, miR-669c-3p, miR-615-3p et miR-485-3p tandis que les 11 miARN sous-exprimés retenus étaient miR-19a-3p, miR-142a-5p, miR-144-3p, miR-144-3p, miR-16-1-3p, miR-19b-3p, miR-32-5p, miR-106b-5p, miR-15a-3p, miR-425-5p, miR-148b-3p et miR-18a-5p.



Figure 72 : Visualisation des comptages des molécules en log2 par échantillon pour les 18 miARN les plus significatifs.

Ces derniers ont ensuite été recherchés au niveau de l'ensemble des organes cibles par RT-PCR quantitative en temps réel (TaqMan® MicroRNA Assays, Applied Biosystems) afin d'évaluer la contribution de chaque organe au pool de miARN circulants (figure 73).

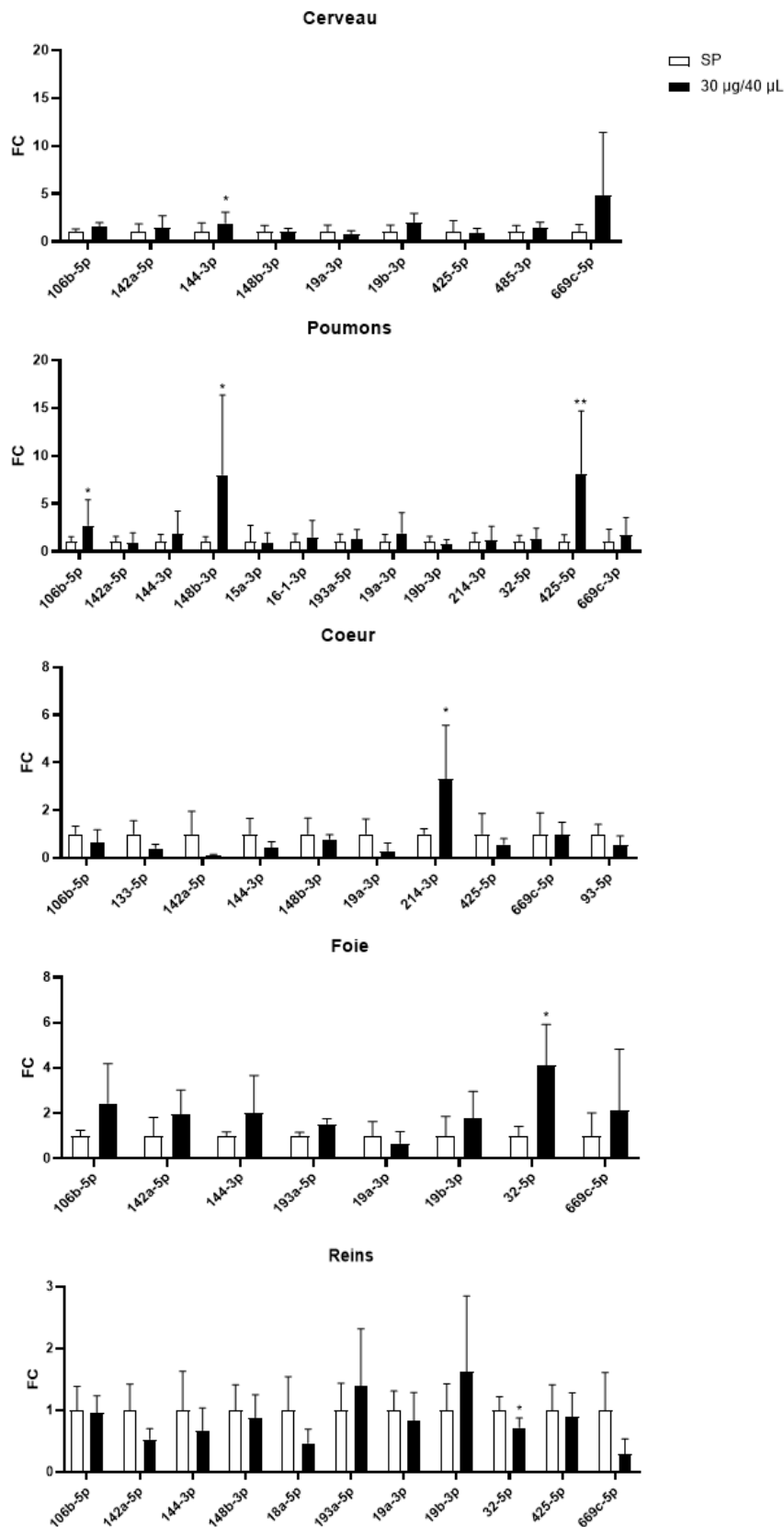


Figure 73 : Expression dans les organes-cibles des 18 miARN circulants d'intérêt identifiés comme différentiellement exprimés 24 h après l'exposition sub-chronique des souris aux PUF (FC = Fold Change, $p < 0,05^*$ vs témoins, SP)

Au niveau cérébral, seul l'expression du miR-144-3p a été significativement augmentée avec un FC de 1,93. Une tendance à l'augmentation a néanmoins été observée pour le miR-669c-5p. Au niveau pulmonaire, une exposition sub-chronique à une dose de 30 µg de PUF/instillation a induit une augmentation significative de l'expression des miR-106-5p, miR-148b-3p et miR-425-3p avec des FC respectifs de 2,70, 8,00 et 8,14. Aucune modification significative n'a été observée pour les autres miARN étudiés bien qu'une tendance à l'augmentation ait été observée pour les miR-144-3p, 19a-3p et 669c-5p. Au niveau cardiaque, seul l'expression du miR-214-3p a été significativement augmentée à la suite de l'exposition sub-chronique aux PUF, avec un FC de 3,31. Aucune modification significative n'a été constatée pour les autres miARN étudiés bien qu'une tendance à la diminution pour les miR-106b-5p, miR-133-5p, miR-142-a-5p, miR-144-3p, miR-148b-3p, miR-19a-3p et miR-425-5p ait été observée. Au niveau hépatique, seul l'expression du miR-32-5p a été significativement augmentée à la suite de l'exposition sub-chronique aux PUF, avec un FC de 4,12. Aucune modification significative n'a été constatée pour les autres miARN étudiés bien qu'une tendance à l'augmentation ait été observée pour les miR-106b-5p, miR-142a-5p, miR-193a-5p, miR-19b-3p et miR-669c-5p, de même qu'une tendance à la diminution pour le miR-19a-3p. Enfin, au niveau rénal, seule une diminution significative de l'expression du miR-32-5p fut constatée.

C. Discussion

Jusqu'à présent, l'approche multi-organe employée dans ce projet de recherche a permis de mettre en évidence des marqueurs de stress oxydant et d'inflammation dans l'ensemble des organes cibles, à des niveaux d'expression variable. Afin d'objectiver cet effet multi-organe au niveau sanguin, il a été jugé pertinent d'effectuer une analyse des miARN circulants, ces derniers pouvant constituer de bons marqueurs d'exposition et/ou d'effets des PUF du fait de leur stabilité et accessibilité ; d'autant plus que l'analyse de la dérégulation possible de ces derniers en réponse à l'exposition aux PUF est à l'heure actuelle très parcellaire (312).

Cette analyse a révélé la dérégulation d'un nombre important de miARN et a supporté, après normalisation, l'identification de 18 miARN-candidats, décrits pour leurs implications dans le développement de pathologies inflammatoires voire cancéreuses et pouvant potentiellement servir de biomarqueurs d'exposition aux PUF. Ces résultats prometteurs ont motivé la recherche de ces miARN sériques candidats dans les organes-cibles afin de rechercher si leur dérégulation était en lien avec des altérations organo-spécifiques et s'ils pouvaient servir, par conséquent, de biomarqueurs d'effets des PUF. Celle-ci a révélé que certains d'entre-deux étaient aussi très dérégulés dans certains de ces organes. Au niveau pulmonaire, 3 miARN dont l'expression est significativement augmentée par rapport au groupe témoin, ont pu être identifiés. Plusieurs études ont d'ores et déjà identifié l'implication de ces miARN dans le développement de pathologies pulmonaires notamment cancéreuses, bien que leurs rôles et leurs mécanismes d'action ne soient pas encore clairement identifiés. En effet, le miR-106b-5p jouerait un rôle d'oncogène dans le cancer du poumon non à petites cellules en diminuant l'expression du gène *BTG3* qui code pour une protéine ayant des propriétés antiprolifératives (459). En parallèle, d'autres études tendent à dire qu'il serait plutôt suppresseur de tumeur. À titre d'exemple, il inhiberait la croissance et la prolifération cellulaire d'adénocarcinome pulmonaire en diminuant l'expression de l'*IGSF10* qui a des propriétés de recrutement et de prolifération des cellules immunitaires (460). Le miR-148b-3p aurait quant à lui un rôle plutôt bénéfique en régulant l'invasion et la prolifération cellulaire, de même que l'apoptose dans le cas de l'adénocarcinome pulmonaire (461). Enfin, plusieurs études ont identifié le miR-425-5p comme étant un oncogène favorisant la croissance des cellules tumorales notamment dans le cas du cancer du poumon non à petites cellules (462,463). Une corrélation entre l'expression de ce dernier et l'exposition aux particules fines atmosphériques a, de plus, déjà été mise en évidence dans une étude épidémiologique (328). En outre, le miR-425 a été identifié en 2021 comme pouvant

potentiellement être utilisé comme biomarqueur afin de déterminer les populations exposées aux particules atmosphériques et ayant un risque significatif de développer un cancer pulmonaire (326). Au niveau cardiaque, seul le miR-214-3p présente une expression significativement diminuée chez les souris exposées aux PUF. Ce dernier a préalablement été identifié comme étant un bon marqueur de stress cardiaque dans des modèles d'hypertrophie et d'insuffisance cardiaque (464). Il aurait plutôt un rôle protecteur, répresseur de la fibrose cardiaque en inhibant la prolifération des fibroblastes et leur transition en myofibroblastes mais aussi un rôle bénéfique contre les lésions d'ischémie/reperfusion en atténuant les effets de la surcharge en calcium sur les cardiomyocytes (465,466). Au niveau hépatique et rénal, le seul miARN ayant été identifié comme étant significativement dérégulé chez les souris exposées est le miR-32-5p pour lequel une augmentation est observée au niveau hépatique et à l'inverse, une diminution au niveau rénal. Cette diminution aurait un effet suppresseur de tumeur puisqu'il a été déterminé que son inhibition freinait la transition épithélio-mésenchymateuse et la fibrose rénale en ciblant SMAD7 dans le cas de la néphropathie diabétique (467). Enfin, au niveau cérébral, seul le miR-144-3p a été retrouvé comme étant significativement augmenté chez les souris exposées aux PUF. Il semblerait que ce dernier soit suppresseur de tumeurs puisque plusieurs études ont en effet démontré qu'il atténuait la viabilité et l'invasion des cellules dans le cas du glioblastome en ayant diverses cibles telles que FZD7, c-Met ou encore BCL6 (468–470). Cette étude de la littérature a donc permis d'apporter des hypothèses quant aux rôles et aux mécanismes spécifiques de ces miARN au sein des différents organes cibles. Une évaluation de la contribution de ces miARN organo-spécifiques aux profils de miARN circulants a ensuite été entreprise. La première constatation qui a pu être établie est que plusieurs miARN significativement dérégulés au niveau organo-spécifique varient dans le sens opposé à ce qui a pu être observé dans le sang et ne contribuent donc pas de manière univoque à ce pool de miARN circulants. Ceci est par exemple le cas des miR-148b-3p et miR-425-5p pulmonaires. En ne s'intéressant qu'aux miARN significativement dérégulés chez les souris exposées aux PUF et variant dans le même sens au niveau sanguin, il est observé que seuls les miR-214-3p cardiaque et miR-32-5p rénal pourraient contribuer significativement au pool de miARN circulants et seraient donc susceptibles d'être utilisés comme biomarqueurs d'effet de la fraction particulaire ultrafine de la pollution atmosphérique. Il est donc encore difficile pour le moment d'établir une relation précise entre la dérégulation des miARN circulants et la contribution spécifique de chaque organes-cibles. Ainsi, bien que les miARN circulants les plus significativement dérégulés à la suite de l'exposition aux PUF puissent servir de biomarqueurs d'exposition, ils ne peuvent pas, à l'heure actuelle, servir de biomarqueurs d'effets de ces dernières.

2. Analyses de l'expression des ARN messagers pulmonaires

La figure 74 présente les résultats obtenus pour l'étude des profils d'expression des ARN messagers réalisée par 3'-RNA-seq, dont le FC était inférieur à 0,66 (sous-exprimé) ou supérieur à 1,5 (sur-exprimé) par rapport au groupe témoin. À la suite d'une exposition sub-chronique à la dose de 10 µg de PUF/instillation, 65 ARNm (*i.e.*, 22 sur- et 43 sous-exprimés) ont été retrouvés comme étant significativement dérégulés par rapport au groupe témoin. Ce nombre fut d'autant plus important à la suite d'une exposition sub-chronique à la dose de 30 µg de PUF/instillation, atteignant un total de 228 ARNm différemment exprimés (*i.e.*, 193 sur- et 35 sous-exprimés). Lorsque les deux groupes de souris exposées aux PUF ont été comparés, 32 ARNm ont été retrouvés comme étant significativement dérégulés (30 sur- et 2 sous-exprimés). Cette différence conséquente du nombre d'ARNm dérégulés entre les groupes de souris exposées à la dose la plus faible et la plus forte de PUF comparativement au groupe témoin (65 contre 228 ARNm) a orienté notre choix de n'effectuer la validation protéique des voies de signalisation dérégulées qui en découlent que chez le groupe de souris exposées à la dose de 30 µg de PUF/instillation comparativement au groupe témoin exposé au sérum physiologique.

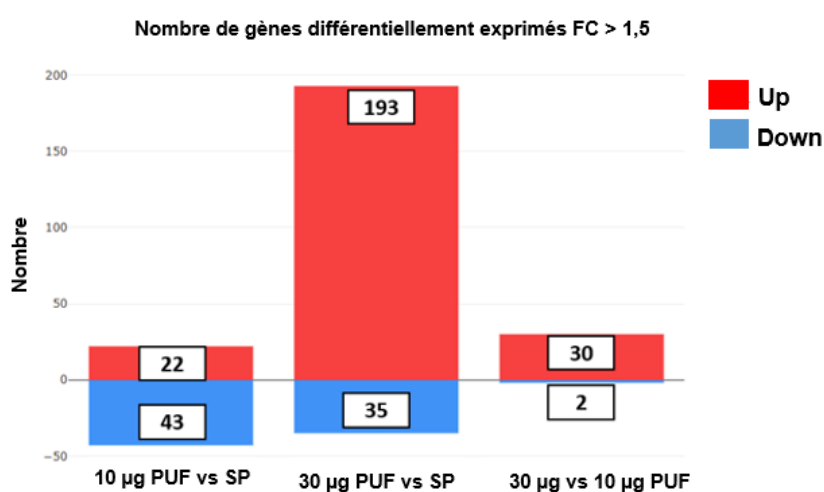


Figure 74 : Nombre de gènes différemment exprimés dans les poumons 24 h après l'exposition sub-chronique des souris aux PUF (FC > 1,5, p < 0,05).

La figure 75 présente l'intersection des gènes différemment exprimés dans les poumons des souris exposées ou non, aux PUF, 24 heures après leur exposition sub-chronique. Trois conditions ont ainsi été testées : (1) 30 µg vs 10 µg de PUF, (2) 10 µg de PUF vs SP et (3) 30 µg de PUF vs SP. Il est ainsi possible de constater que parmi les 228 gènes différemment exprimés dans la condition 30 µg de PUF vs SP, 29 étaient en commun avec la condition « 10 µg de PUF vs SP » et 16 avec la condition « 30 µg vs 10 µg de PUF ». Parmi les 65 gènes différemment exprimés dans la condition « 10 µg de PUF vs SP », 2 étaient en commun avec la condition « 30 µg vs 10 µg de PUF ». Enfin, un total de 6 gènes étaient différemment exprimés de manière commune dans les 3 conditions étudiées : Lipocalin-2 (LCN2), Chemokine Ligand 17 (CCL17), Tissue Inhibitor of Metallo Proteinases 1 (TIMP1), Matrix metalloproteinase 12 (MMP12), Serum amyloid A1 (SAA1) et Serum amyloid A3 (SAA3).

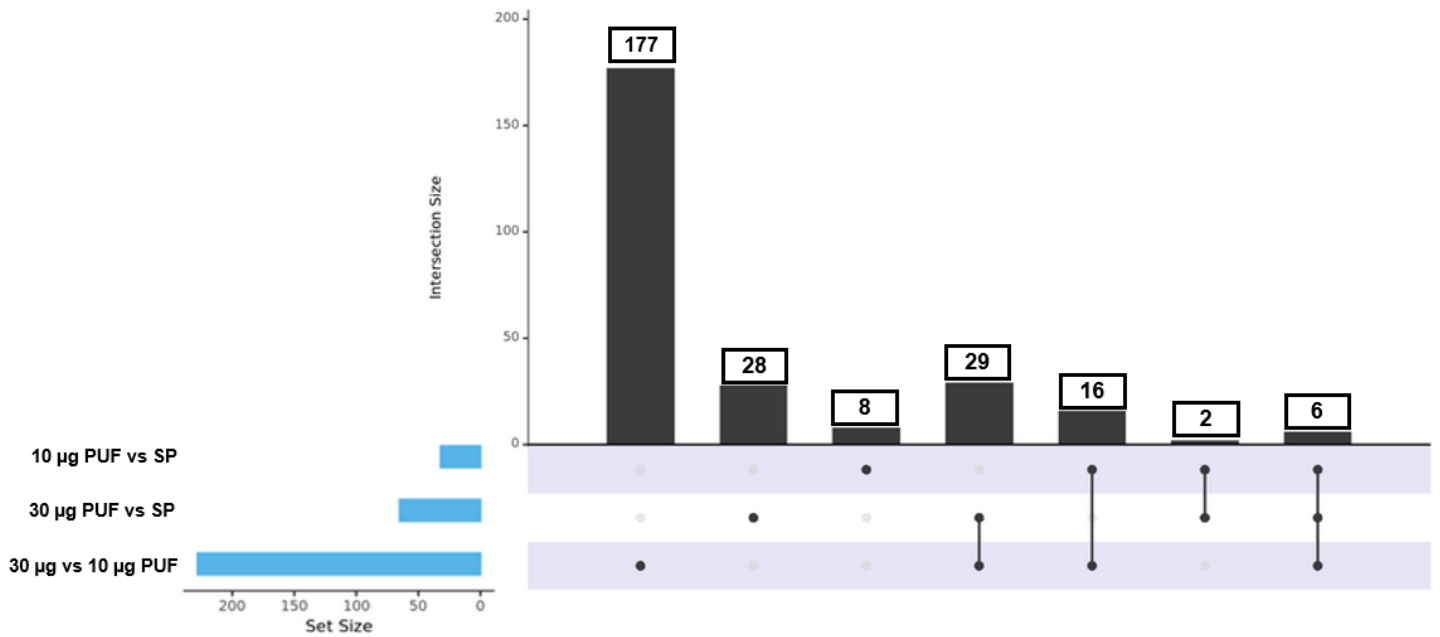


Figure 75 : Intersections des gènes différentiellement exprimés dans les poumons 24 h après l'exposition sub-chronique des souris aux PUF ($FC > 1,5$, $p < 0,05$).

3. Analyse des voies de signalisation dérégulées par les PUF

La figure 76 présente les voies biologiques dérégulées à la suite de l'exposition sub-chronique aux PUF, obtenues par utilisation de la base de données Gene Ontology. Il apparaît que 5 voies ont été dérégulées de manière commune entre les 3 conditions étudiées « 10 µg de PUF vs SP », « 30 µg de PUF vs SP » et « 30 µg vs 10 µg de PUF ». Ces dernières sont impliquées dans la migration cellulaire et le chimiotactisme. Dans les conditions « 30 µg de PUF vs SP » et « 30 µg vs 10 µg de PUF », se sont ajoutés des voies impliquées dans la réponse inflammatoire et immunitaire.

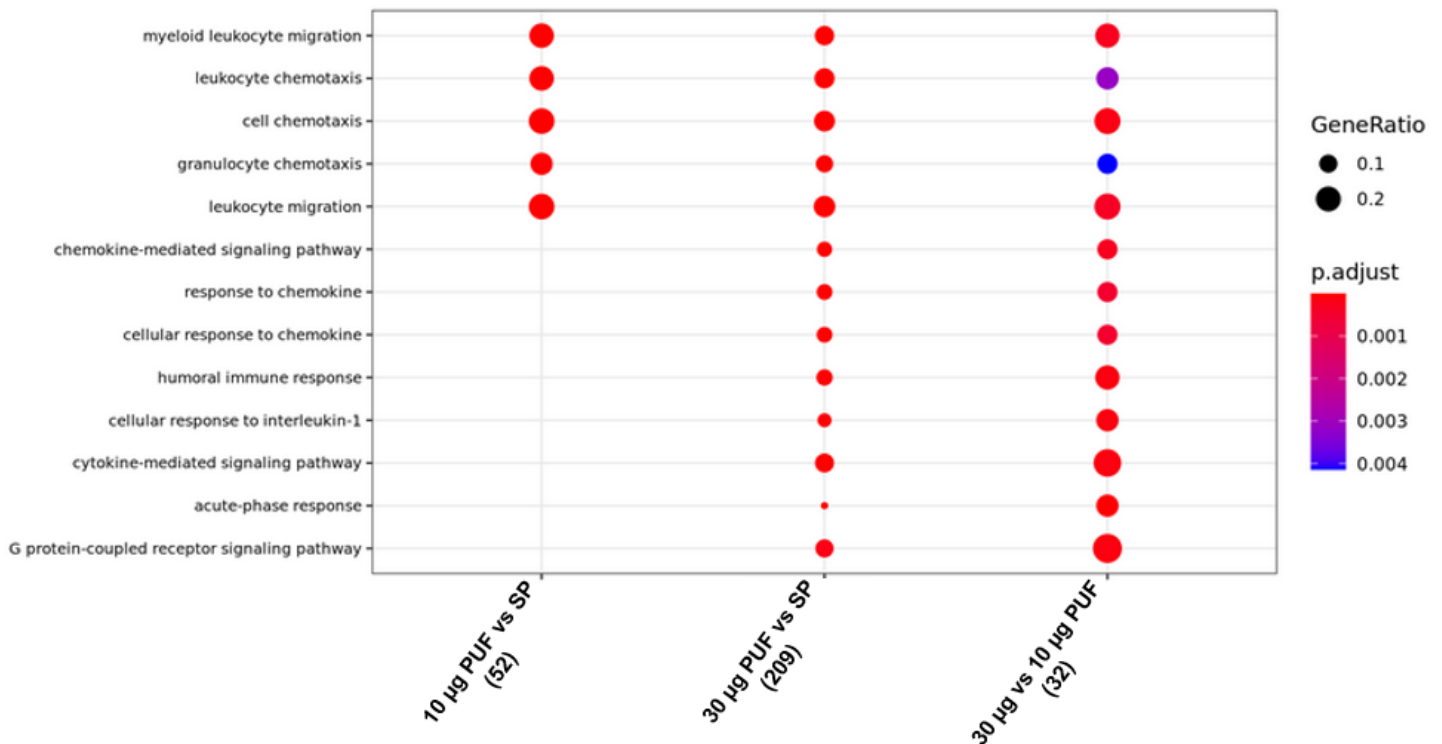


Figure 76 : Dotplot d'enrichissement avec la base de données Gene Ontology sur les processus biologiques des gènes différentiellement exprimés dans les poumons 24 h après l'exposition sub-chronique des souris aux PUF.

La figure 77 présente les fonctions moléculaires dérégulées à la suite de l'exposition sub-chronique aux PUF, obtenues par utilisation de la base de données Gene Ontology. Il apparaît que 4 voies ont été dérégulées de manière commune entre les 3 conditions étudiées « 10 µg de PUF vs SP », « 30 µg de PUF vs SP » et « 30 µg vs 10 µg de PUF ». Ces dernières sont impliquées dans la signalisation cellulaire. Dans les conditions « 30 µg de PUF vs SP » et « 10 µg de PUF vs SP », se sont ajoutés des voies impliquées dans le remodelage tissulaire tandis que des voies liées à l'inflammation étaient également retrouvées dans la condition « 30 µg vs 10 µg de PUF ».

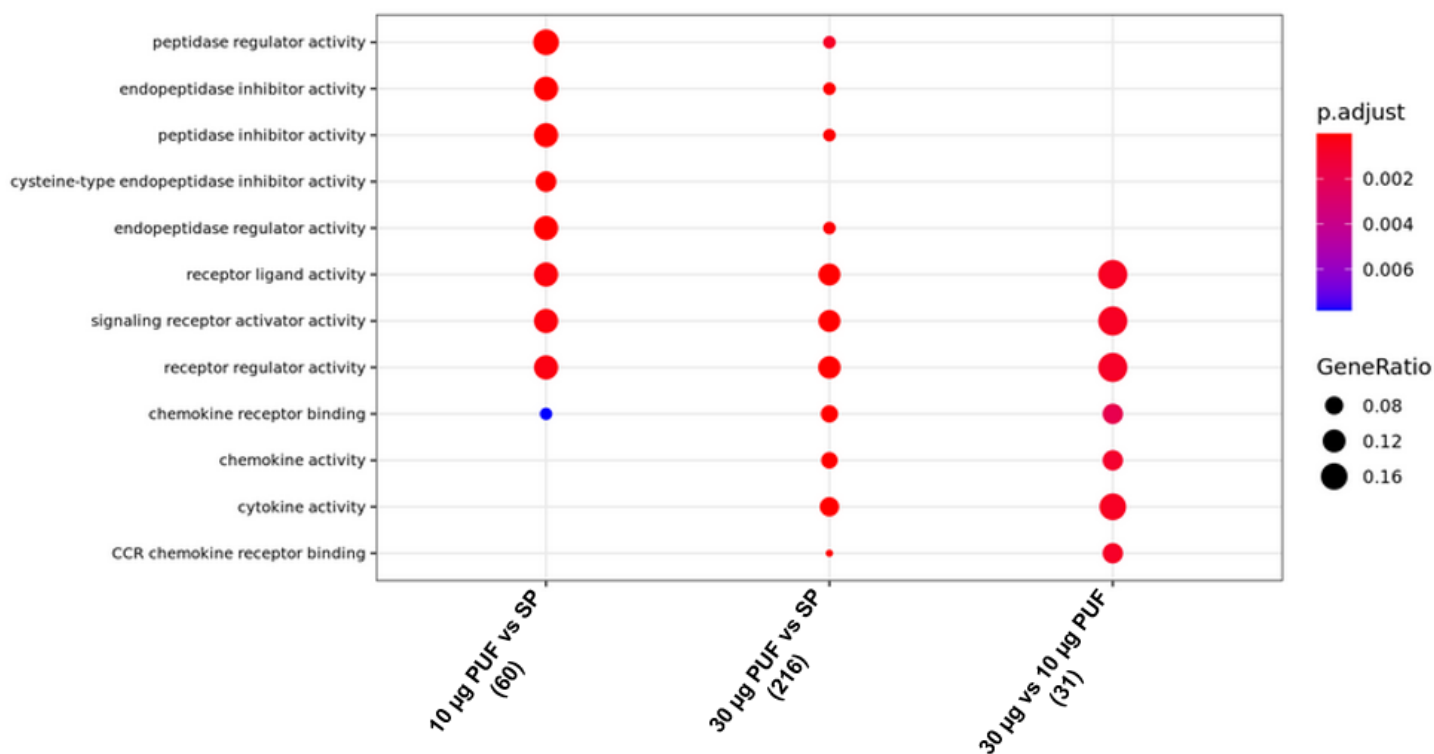


Figure 77 : Dotplot d'enrichissement avec la base de données Gene Ontology sur les fonctions moléculaires des gènes différentiellement exprimés dans les poumons 24 h après l'exposition sub-chronique des souris aux PUF.

Comme mentionné précédemment, pour la suite du projet, la validation protéique des voies de signalisation dérégulées à la suite des expositions particulières n'a été réalisée que chez le groupe de souris exposées à la dose la plus élevée de PUF (*i.e.*, 30 µg de PUF/instillation) comparativement au groupe de souris témoins exposées au sérum physiologique.

4. Validation fonctionnelle des voies dérégulées par les PUF

A. Étude des réponses oxydative et inflammatoire

i. Recherche de signatures spécifiques liées au stress oxydant

La figure 78 présente les résultats obtenus par utilisation de la base de données de signatures moléculaires « MSigDB » du logiciel GSEA à partir des données transcriptomiques obtenus chez le groupe de souris exposées à la dose la plus élevée de PUF (*i.e.*, 30 µg de PUF/instillation), comparativement au groupe de souris témoins exposées au sérum physiologique. Ces analyses ont permis d'identifier 3 voies de signalisation impliquées dans la génération d'ERO, « superoxide anion generation » (13 ARNm up-régulés), « superoxide metabolic process » (14 ARNm up-régulés) et « ROS and RNS production in phagocytes » (14 ARNm up-régulés).

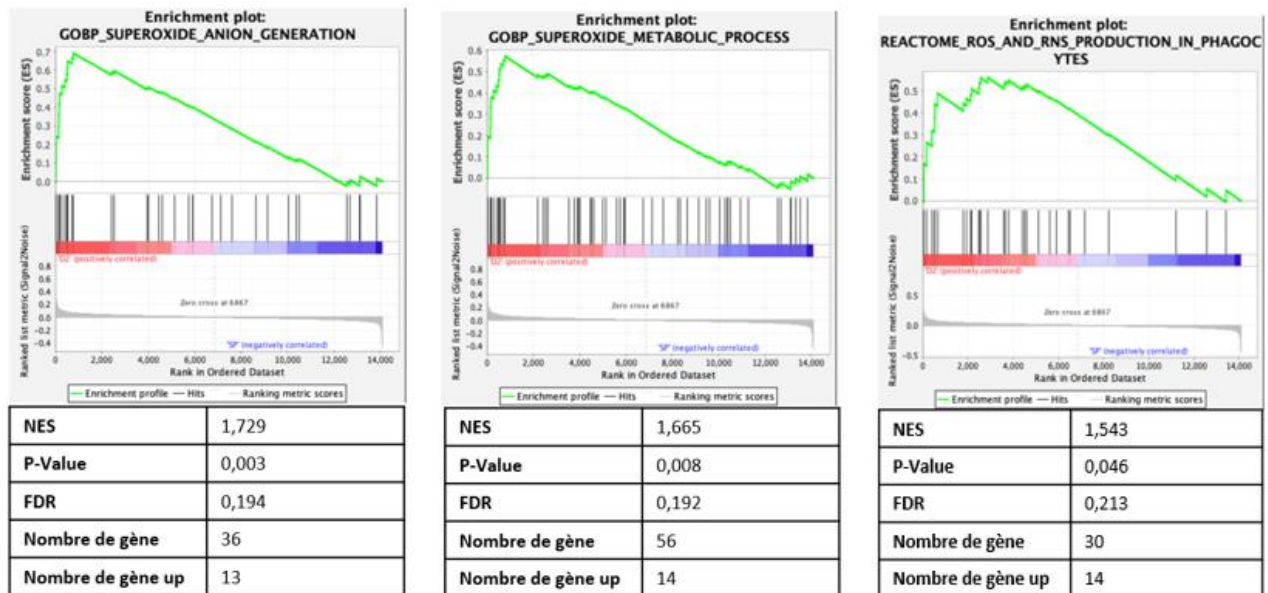


Figure 78 : Ensemble de gènes enrichis pour les signatures relatives au stress oxydant chez les souris exposées à la dose de 30 µg de PUF/instillation vs souris témoins exposées au sérum physiologique.

ii. Mesure de l'expression des protéines d'intérêt impliquées dans l'homéostasie redox et la voie de signalisation Nrf2

Les résultats obtenus lors de l'évaluation de l'expression pulmonaire des protéines impliquées dans la voie de signalisation NRF2 chez les souris témoins et exposées à la dose de 30 µg de PUF sont présentés dans la figure 79. L'exposition sub-chronique à une dose de 30 µg de PUF/instillation a induit une augmentation significative de l'expression des protéines KEAP1 et HO-1, atteignant des FC respectifs de 2,2 et 3,2. L'expression des protéines NRF2, SOD1 et SOD2 n'a pas, quant à elle, été significativement modifiée bien qu'une tendance à l'augmentation ait été observée pour NRF2 notamment.

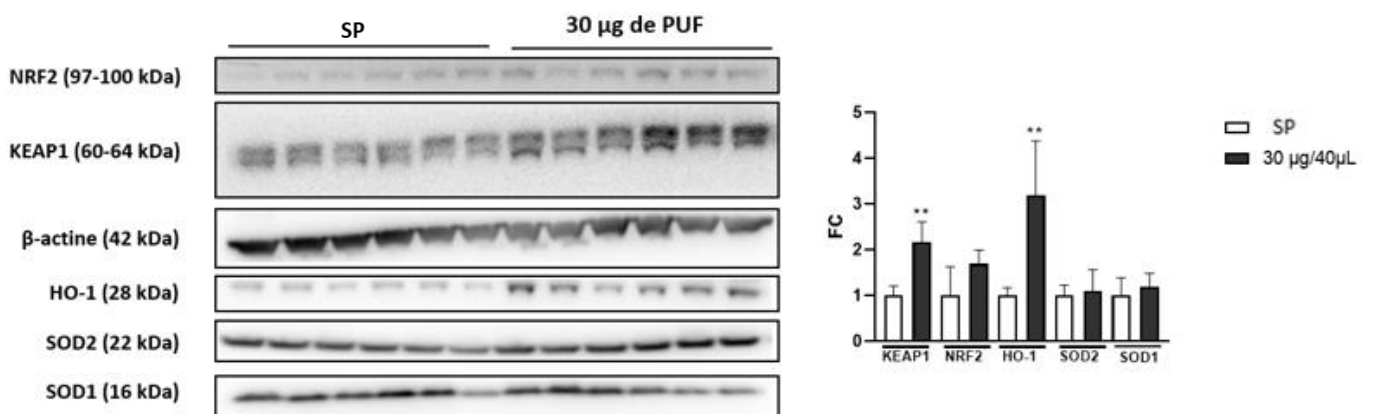


Figure 79 : Expression des protéines d'intérêt impliquées dans la voie de signalisation NRF2, 24h après l'exposition sub-chronique des souris au SP ou à 30 µg de PUF/instillation (FC = Fold Change, $p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$ vs témoins, SP).

Les résultats obtenus lors de l'évaluation de l'expression pulmonaire des protéines impliquées dans l'homéostasie redox chez les souris témoins et exposées à la dose de 30 µg de PUF/instillation sont présentés dans la figure 80. L'exposition sub-chronique à une dose de 30 µg de PUF/instillation a induit une augmentation significative de l'expression des protéines TRXR1 et TXN1, atteignant des FC respectifs de 1,5 et 2,5. L'expression des protéines TXNP, GPX4, PRDX1, TXN2 n'a pas, quant à elle, été significativement modifiée bien qu'une tendance à l'augmentation ait été observée pour TXNIP, GPX4 et TXN2.

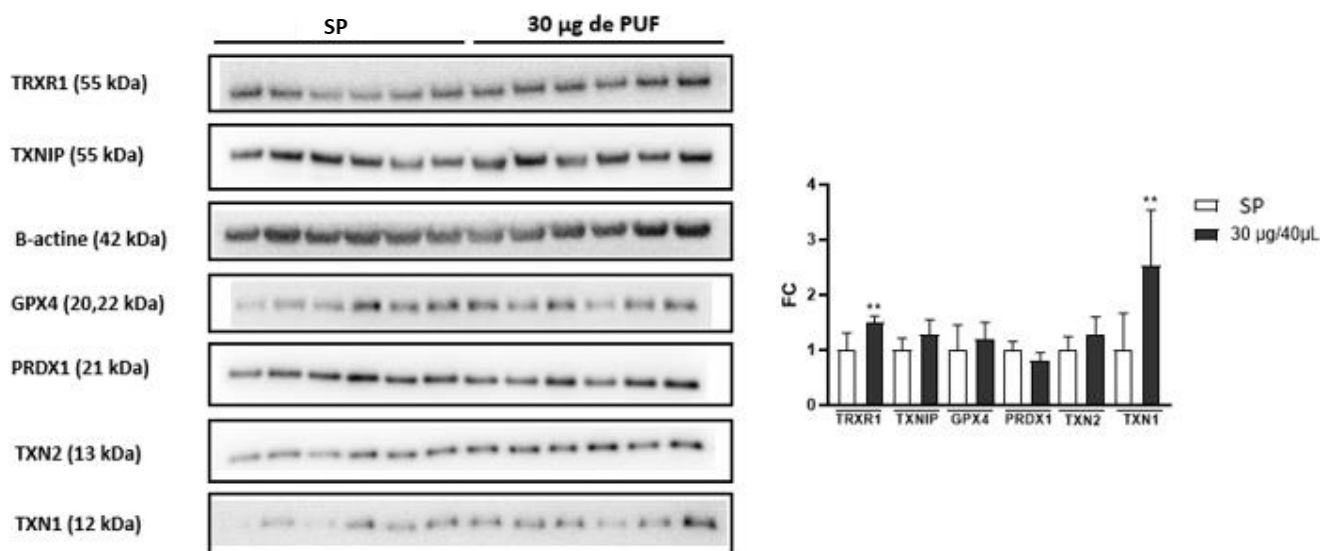


Figure 80 : Expression des protéines d'intérêt impliquées dans l'homéostasie redox, 24h après l'exposition sub-chronique des souris au SP ou à 30 µg de PUF/instillation (FC = Fold Change, $p < 0,05^$, $p < 0,01^{**}$ vs témoins, SP).*

iii. Recherche de signatures spécifiques liées à la réponse immunitaire et inflammatoire

La figure 81 présente les résultats obtenus par utilisation de la base de données de signatures moléculaires « MSigDB » du logiciel GSEA à partir des données transcriptomiques obtenus chez le groupe de souris exposées à la dose la plus élevée de PUF (*i.e.*, 30 µg de PUF/instillation), comparativement au groupe de souris témoins exposées au sérum physiologique. Ces analyses ont permis d'identifier 8 voies de signalisation impliquées dans la réponse immunitaire et inflammatoire, « TNFR2 non canonical NFκB pathways » (34 ARNm up-régulés), « Activation of NFκB in β cells » (29 ARNm up-régulés), « Dectin-1 mediated non canonical NFκB signaling » (32 ARNm up-régulés), « Trafficking and processing of endosomal TLR » (5 ARNm up-régulés), « Interleukin 1 family signaling » (45 ARNm up-régulés), « Antigen processing cross presentation » (38 ARNm up-régulés), « MHC class II antigen presentation » (33 ARNm up-régulés) et « Cross presentation of soluble exogenous antigens endosomes » (31 ARNm up-régulés).

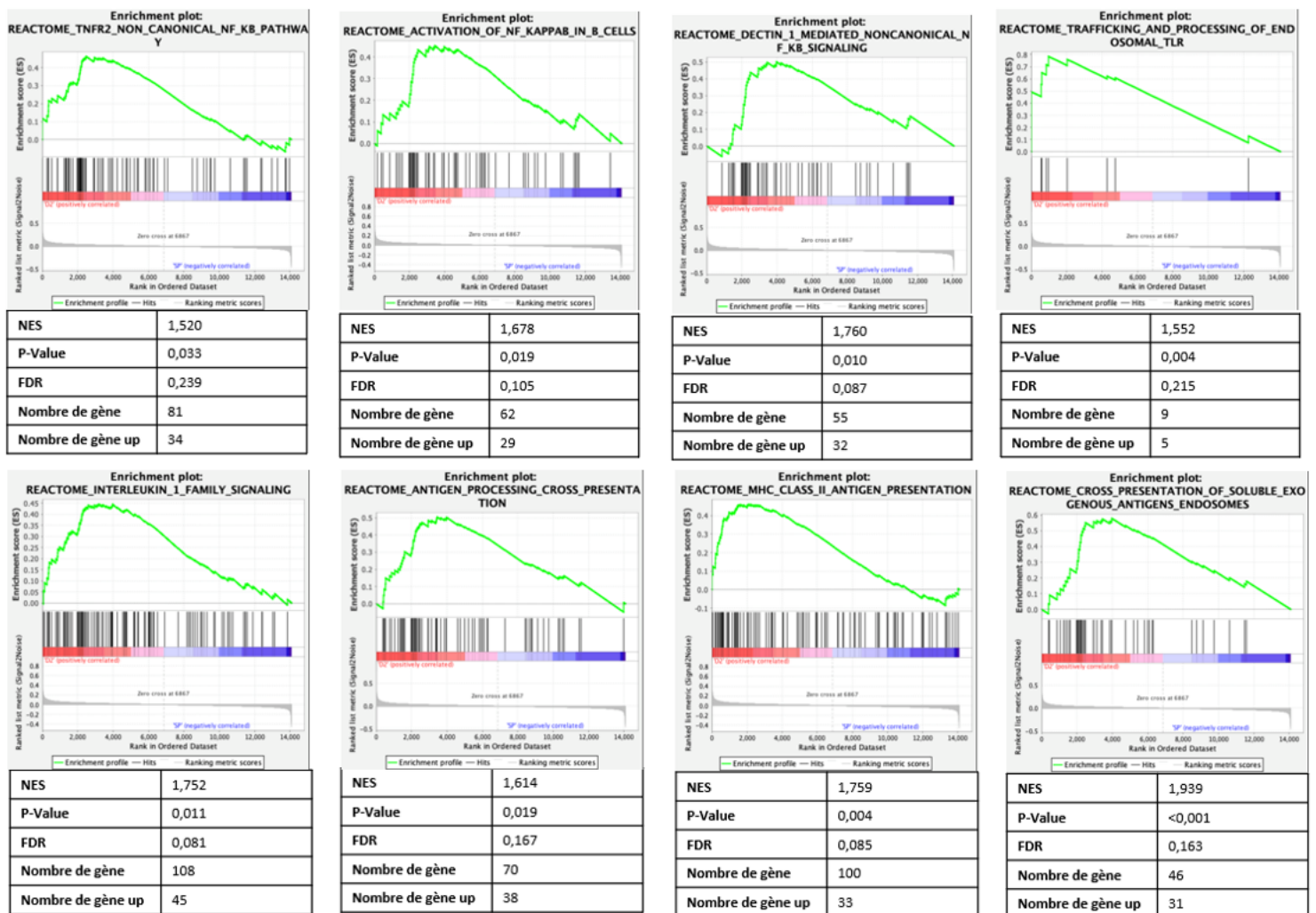


Figure 81 : Ensemble de gènes enrichis pour les signatures relatives à la réponse immunitaire et inflammatoire chez les souris exposées à la dose de 30 µg de PUF/instillation vs souris témoins exposées au sérum physiologique.

iv. Marquages immunohistochimiques de marqueurs de polarisation macrophagique

La figure 82 présente les résultats obtenus pour les marquages immunohistochimiques des marqueurs de polarisation macrophagique F4/80 (*i.e.*, macrophages totaux) (figure 82a), iNOS (*i.e.*, macrophages M1) (figure 82b) et CD163 (*i.e.*, macrophages M2) (figure 82c). Seule l'exposition sub-chronique à la dose de 30 µg de PUF/instillation a induit une augmentation significative de l'expression du marqueur F4/80 avec 59,7 % des cellules l'exprimant contre seulement 33,3 % des cellules dans le groupe témoin. Une tendance à l'augmentation a été observée au sein du groupe de souris exposées à la dose la plus faible de PUF bien que celle-ci n'ait pas été significative statistiquement. Une exposition sub-chronique aux PUF a induit une diminution significative de l'expression du biomarqueur des macrophages M1 iNOS, quelle que soit la dose employée. En effet, 5,2 % et 8,8 % des cellules ont exprimé ce biomarqueur à la suite d'une exposition sub-chronique aux doses respectives de 10 et 30 µg de PUF/instillation tandis que 17,8 % l'ont exprimé dans le groupe témoin exposé au SP. Enfin, aucune modification significative n'a été observée concernant le biomarqueur spécifique des macrophages M2 CD163 bien qu'une tendance à l'augmentation semblait se dégager.

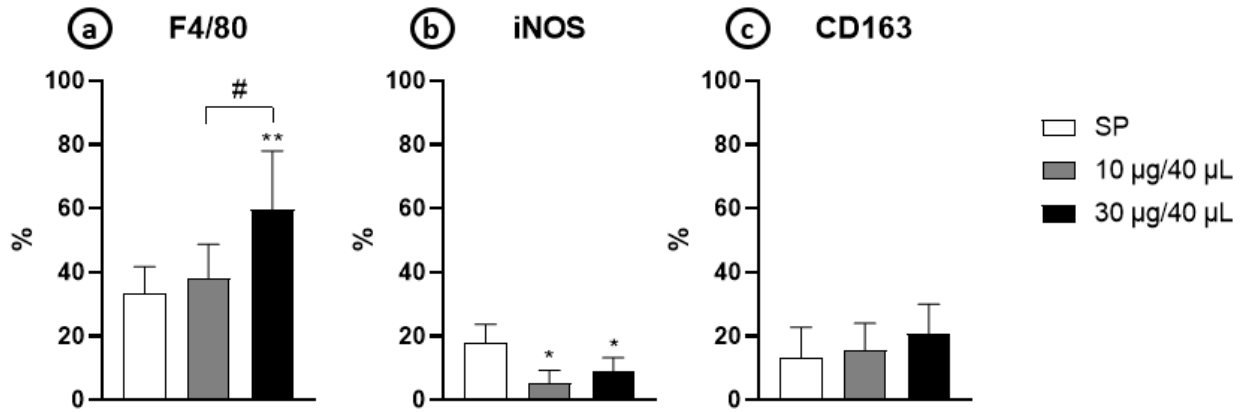


Figure 82 : Expression des protéines F4/80, iNOS et CD163 exprimée dans %, 24h après l'exposition sub-chronique des souris aux PUF (FC = Fold Change, $p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$ vs témoins, SP ; $p < 0,05^{\#}$ vs 10 µg/instillation)

i. Mesure de l'expression des protéines d'intérêt impliquées dans la polarisation macrophagique

La figure 83 présente les résultats obtenus lors de l'évaluation de l'expression pulmonaire des protéines impliquées dans la polarisation macrophagique chez les souris témoins et exposées à la dose de 30 µg de PUF : CD11c, CD68 et Iba1/AIF1 pour les macrophages totaux, CD86 pour les macrophages M1 et CD206 pour les macrophages M2. Une augmentation significative des protéines CD206, CD68, CD11c, CD86 et Iba1/AIF1 a été constatée chez les souris exposées pendant 3 mois à la dose de 30 µg de PUF/instillation par rapport au groupe témoin, atteignant des FC respectifs de 1,8, 1,7, 2,5, 1,8 et 1,6, respectivement. Cette même exposition n'a pas induit de modification significative de l'expression du marqueur F4/80 exprimé par les macrophages totaux bien qu'une tendance à l'augmentation ait été visible.

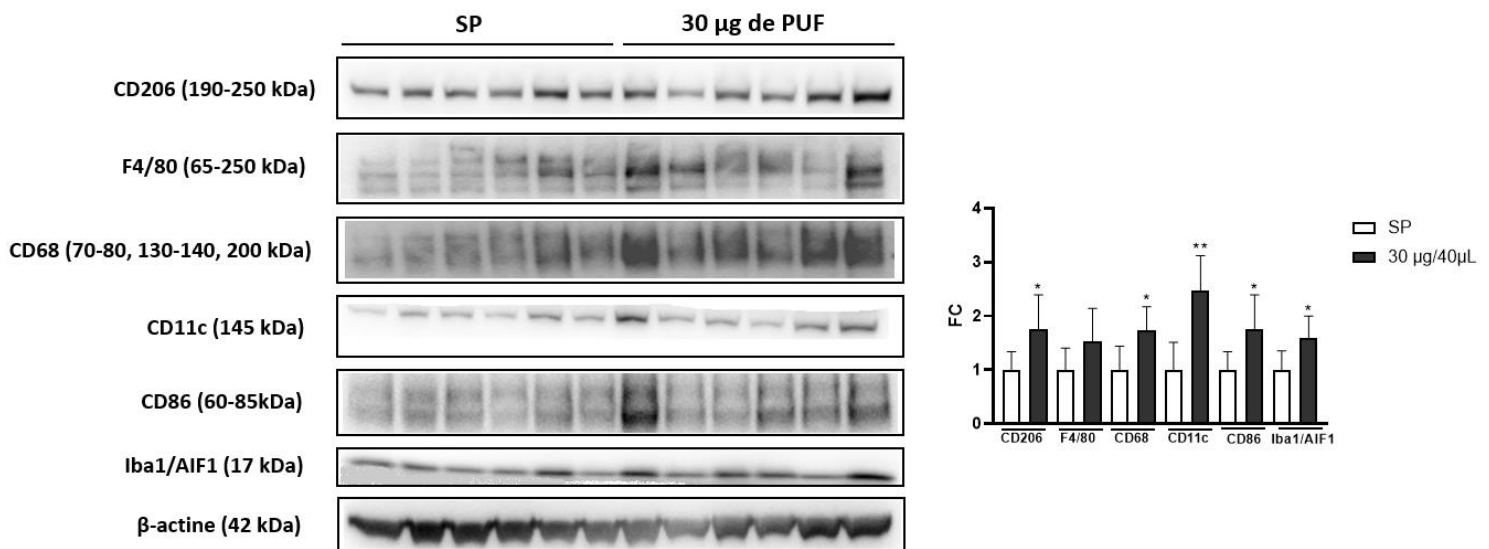


Figure 83 : Expression des protéines impliquées dans la polarisation macrophagique, 24h après l'exposition sub-chronique des souris au SP ou à 30 µg de PUF/instillation (FC = Fold Change, $p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$ vs témoins, SP)

v. Mesure de l'expression des protéines d'intérêt impliquées dans la voie de signalisation NFκB

La figure 84 présente les résultats obtenus lors de l'évaluation de l'expression pulmonaire des protéines impliquées dans la voie de signalisation NFκB chez les souris témoins et exposées à la dose de 30 µg de PUF/instillation. Une diminution significative de l'expression des protéines IKKα, NFκB p50 et IκBα a été constatée chez les souris exposées pendant 3 mois à la dose de 30 µg de PUF/instillation par rapport au groupe témoin, atteignant des FC d'environ 0,4. En parallèle, cette exposition a induit une augmentation significative de la protéine IKKβ avec un FC de 4,8. Aucune modification significative des protéines NFκB p65 et p105.

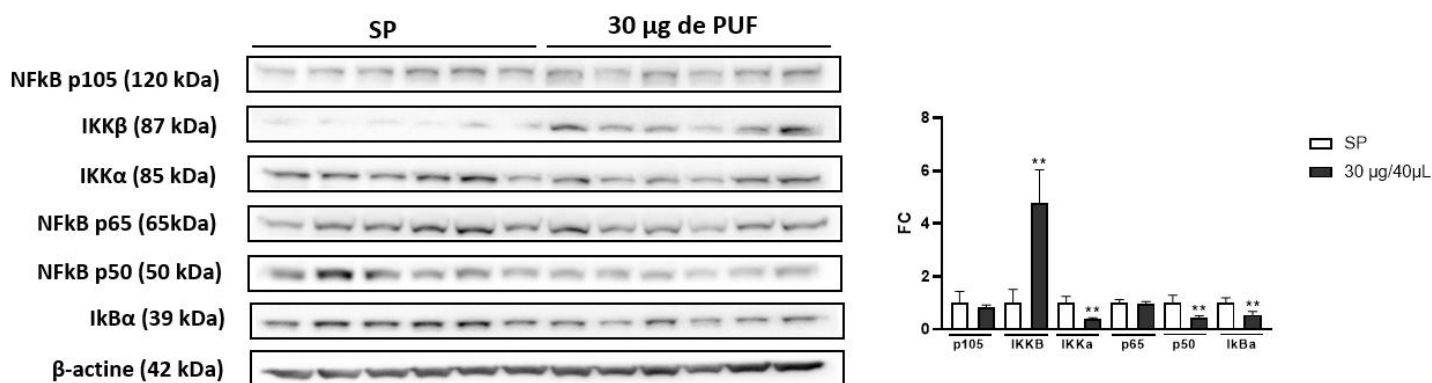


Figure 84 : Expression des protéines impliquées dans la voie de signalisation NFκB, 24h après l'exposition sub-chronique des souris au SP ou à 30 µg de PUF/instillation (FC = Fold Change, $p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$ vs témoins, SP)

vi. Discussion

Bien que des marqueurs de stress oxydant et d'inflammation aient été identifiés dans l'ensemble des organes cibles, seules les analyses histologiques réalisées sur les biopsies pulmonaires ont révélé la présence de conséquences lésionnelles. C'est pourquoi, dans la suite de ce projet de recherche, le choix a été fait de se focaliser uniquement sur cet organe. Les approches transcriptomiques pulmonaires ainsi initiées ont montré la présence d'un total de 65 et 228 ARNm significativement dérégulés chez les souris exposées respectivement aux doses de 10 et 30 µg de PUF, comparativement aux souris témoins. Par la suite, cette différence conséquente a motivé notre choix de ne valider les voies de signalisation modulées que chez les échantillons de souris exposées à la dose la plus importante de PUF (*i.e.*, 30 µg de PUF/instillation).

Les analyses transcriptomiques et celles d'enrichissement ont d'abord suggéré la dérégulation de nombreuses voies de signalisation en relation avec les réponses oxydante et inflammatoire, qui constituent les mécanismes centraux de toxicité des PUF. En effet, parmi les voies biologiques les plus impactées à la suite des expositions sub-chroniques à la dose la plus élevée de PUF, sont retrouvées celles impliquées dans le métabolisme des superoxydes et la génération des anions superoxydes (*e.g.*, *Hmox1*, *Nqo1*, *sod1*, *sod2*, *Tgf-β1*) la migration et le chimiotactisme cellulaires, la réponse aux chimiokines, la réponse immune humorale et celle liée au récepteur couplé à la protéine G (*e.g.*, *Cxcl1*, *Cxcl2*, *Ccl2*, *Ccl3*, *Ccl4*, *Ccl8*). Il est intéressant de constater que l'expression de *Cxcl1*, *Ccl3* et *Ccl4* qui est significativement augmentée au niveau génique l'était également au niveau protéique lors des dosages effectués sur les biopsies pulmonaires, appuyant ainsi ces résultats. Bien que nous ayons déjà étudié l'impact des PUF sur l'initiation et le développement de réponses oxydative et inflammatoire, ces résultats transcriptomiques complémentaires ont motivé notre souhait de

chercher à les valider par Western Blot. Ainsi, différents paramètres (*i.e.*, KEAP1, NRF2, HO-1, SOD1, SOD2, TRXR1, TXNIP, GPX4, PRDX1, TXN1 et TXN2) ont été testés pour valider la réponse oxydative. Seules les expressions de KEAP1, TRXR1 et HO-1 furent significativement augmentées. La thiorédoxine réductase 1 (TRXR1) est une enzyme dépendante du NADPH impliquée dans la réduction des thiorédoxines oxydées. Dans la partie précédente, nous avons pu constater que l'expression génique de *TXN1* était diminuée au niveau pulmonaire, suggérant qu'il y avait une inhibition de la synthèse de cet antioxydant. Cependant, la concentration protéique en TRXR1 étant accrue, il est possible que la concentration en TXN1 oxydée ait été tellement importante qu'une activation plus importante de cette enzyme aurait été nécessaire afin de rétablir les stocks en TXN1 réduit. De plus, le système des thiorédoxines travaille en étroite collaboration avec celui du glutathion ; la GR étant également une enzyme dépendante du NADPH. Il est ainsi possible de faire un parallèle entre ces deux systèmes qui présentent des résultats similaires avec une expression génique diminuée, qui laisse suggérer une diminution de la synthèse de ces molécules antioxydantes en réponse à une concentration cellulaire de ces molécules sous forme réduite en quantité suffisamment importante pour rétablir un état d'homéostasie redox. Cependant, ces dernières sont rapidement oxydées par les ERO générées par les PUF et/ou des composés désorbés à partir de ces dernières, ce qui active intensément les enzymes impliquées dans leur réduction (*i.e.*, GR et TRXR1) afin de rétablir les stocks en molécules antioxydantes sous forme réduite. En outre, Cebula et son équipe (2015) ont suggéré qu'en absence de stress oxydant, TRXR1 pouvait jouer un rôle d'inhibiteur vis-à-vis du facteur de transcription Nrf2 (471). Ainsi, l'augmentation simultanée de l'expression des inhibiteurs protéiques KEAP1 et TRXR1 suggère le début d'une inhibition de la voie de signalisation NRF2 bien qu'une augmentation très importante de l'expression de l'enzyme antioxydante HO-1 soit constatée. Comme mentionné dans la partie précédente, la protéine HO-1 a la particularité de posséder des propriétés anti-inflammatoires via la génération de biliverdine et de CO, ce qui explique son activation en cas de réponse inflammatoire (432). De par la diversité de ses propriétés, HO-1 permet donc de faire le lien entre la réponse oxydante et inflammatoire. Tout comme pour la réponse oxydative, divers paramètres liés à la réponse inflammatoire et plus particulièrement à l'activation de la voie de signalisation NFκB (*i.e.*, NFκB p50, NFκB p65, NFκB p105, IKKα, IKKβ, IκBα) ont été testés afin de valider l'initiation de cette réponse inflammatoire au sein des tissus pulmonaires. L'activation de cette dernière est dépendante du complexe IKK dont l'expression des deux sous-unités, IKKα et IKKβ, a été mesurée. Les résultats obtenus ont révélé une diminution d'IKKα et à l'inverse, une augmentation significative d'IKKβ. Cela peut sembler surprenant à première vue, mais il s'avère que ces deux sous-unités ont des fonctions bien distinctes, IKKβ étant la seule des sous-unités à être indispensable à l'activation du facteur de transcription NFκB en réponse à des stimuli pro-inflammatoires par destruction des inactivateurs d'NFκB dont l'IκBα (472). Une diminution significative de ce dernier a d'ailleurs été constatée, suggérant donc bien l'activation de la voie de signalisation NFκB. Enfin, une diminution de l'expression de NFκB p50 a été constatée, ce qui n'est pas en contradiction avec l'activation de la voie de signalisation NFκB puisqu'il existe 5 membres au sein de cette famille, fonctionnant le plus souvent sous forme d'hétérodimères (183). Ainsi, bien que l'un de ces membres puisse être inhibé, rien n'empêche la formation d'autres complexes transactivateurs de cette voie. L'ensemble de ces résultats conforte donc bien les données obtenues jusqu'à présent en suggérant qu'au bout de 3 mois d'expositions répétées, bien que les défenses antioxydantes générées soient suffisantes pour rétablir un état d'homéostasie redox et éviter l'apparition d'un stress oxydant, une réponse inflammatoire se met en place.

B. Altérations du métabolisme mitochondrial

i. Recherche de signatures spécifiques liées à la fonction mitochondriale

La figure 85 présente les résultats obtenus par utilisation de la base de données de signatures moléculaires « MSigDB » du logiciel GSEA à partir des données transcriptomiques obtenus chez le groupe de souris exposées à la dose la plus élevée de PUF, comparativement au groupe de souris témoins exposées au sérum physiologique. Ces analyses ont permis d'identifier 4 voies de signalisation dérégulées impliquées dans la fonction mitochondriale dont « mitochondrial RNA processing » (8 ARNm up-régulés), « Negative regulation of mitochondrion organization » (14 ARNm up-régulés), « Regulation of mitochondrial translation » (13 ARNm up-régulés) et « Positive regulation of mitochondrial translation » (8 ARNm up-régulés).

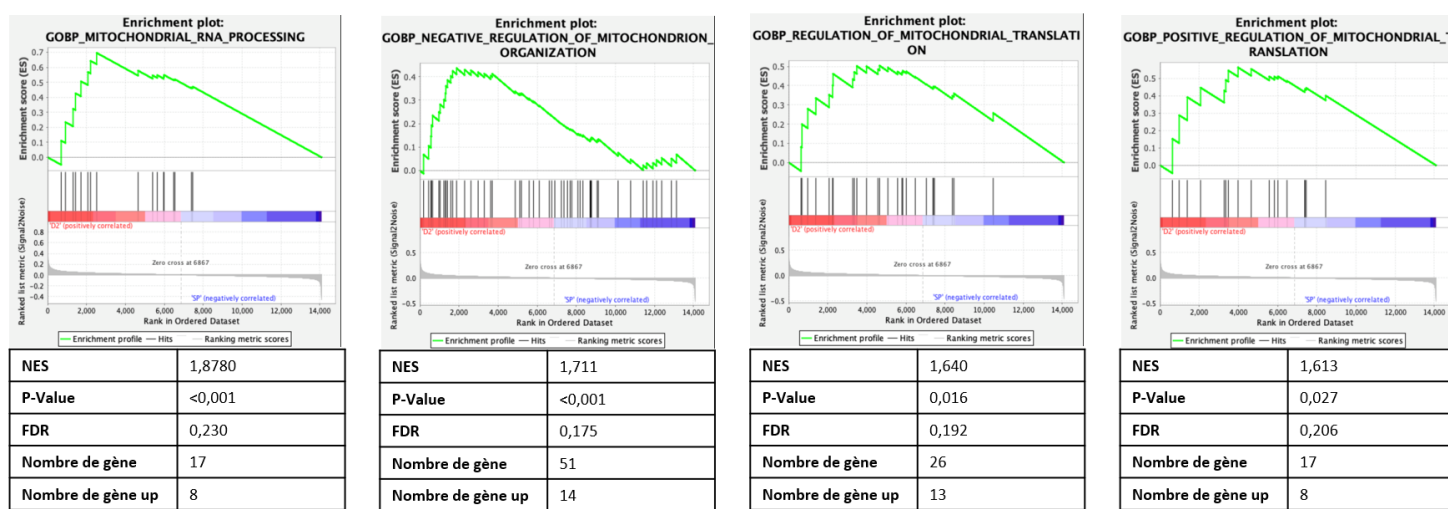


Figure 85 : Ensemble de gènes enrichis pour les signatures relatives à la fonction mitochondriale chez les souris exposées à la dose de 30 µg de PUF/institution vs souris témoins exposées au sérum physiologique.

ii. Observations microscopiques

La figure 86 présente les observations mitochondriales effectuées par microscopie électronique à transmission au niveau pulmonaire chez une souris témoin exposée au sérum physiologique (figure 80a) et chez une souris exposée à 30 µg de PUF/institution (figure 80b) pendant 3 mois. Il est possible de constater la présence d'altérations de la morphologie des mitochondries, caractérisée par une déformation voire une disparition des crêtes mitochondriales et une rupture de la membrane mitochondriale externe chez les souris exposées à 30 µg de PUF/institution tandis que les mitochondries des souris témoins ne présentaient aucune altération visible.

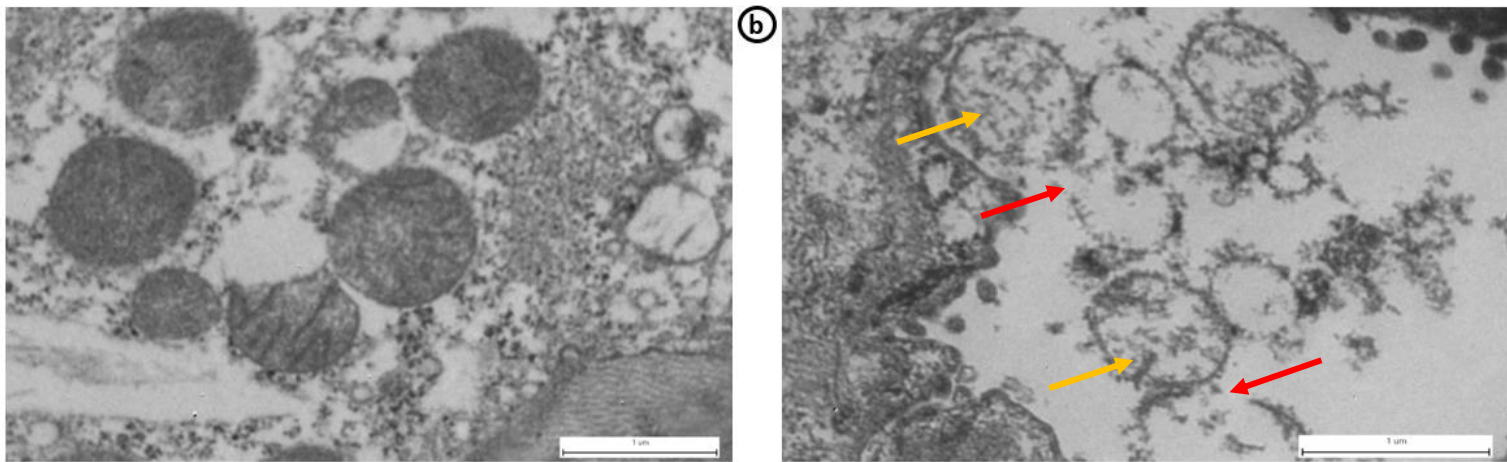


Figure 86 : Images de mitochondries pulmonaires chez une souris exposée au sérum physiologique (A, x10000) et exposée à une dose de 30 µg de PUF/instillation (B, x10000), obtenues par Microscopie Electronique à Transmission. Rupture de la membrane mitochondriale externe indiquée par les flèches rouges et présence de crêtes mitochondriales altérées indiquée par les flèches jaunes.

iii. Étude de la respiration mitochondriale

La figure 87 présente les résultats obtenus pour le taux de consommation d'oxygène (OCR) exprimé en pmol/min/µg de protéines, au sein des échantillons pulmonaires de souris exposées, ou non, aux PUF. À la suite d'une exposition sub-chronique à la dose de 30 µg de PUF/instillation, une diminution significative de la capacité respiratoire mitochondriale a été observée. La dispersion des individus au sein du groupe de souris exposées à la dose de 10 µg de PUF/instillation n'a pas permis d'obtenir un résultat statistiquement satisfaisant.

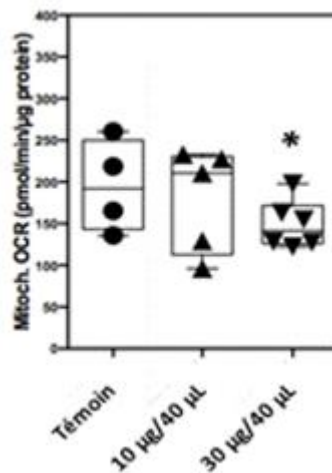


Figure 87 : Capacité respiratoire mitochondriale pulmonaire, exprimée en pmol/min/µg de protéines, 24 h après l'exposition sub-chronique des souris aux PUF. ($p < 0,05^$ vs témoins, SP)*

v. Mesure de l'expression des protéines d'intérêt impliquées dans le métabolisme mitochondrial

La figure 88 présente les résultats obtenus lors de l'évaluation de l'expression pulmonaire des différents complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale impliqués dans la phosphorylation oxydative chez les souris témoins et exposées à la dose de 30 µg de PUF/instillation. Cette exposition a induit une augmentation significative de l'expression des complexes II, III, IV et V, avec des FC respectifs de 2,8, 2,7,

1,9 et 2,0. Bien qu'elle n'ait pas été statistiquement significative, une tendance à l'augmentation a également été constatée pour le complexe I.

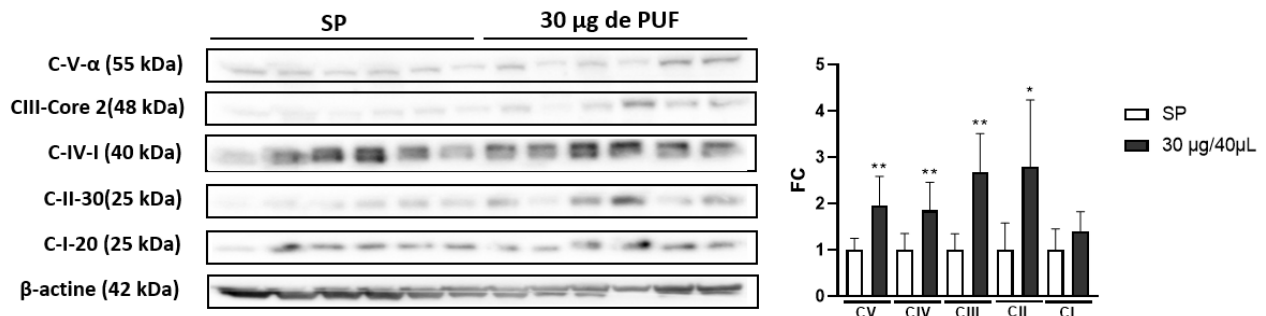


Figure 88 : Expression des protéines de la chaîne respiratoire mitochondriale (OXPHOS), 24h après l'exposition sub-chronique des souris au SP ou à 30 µg de PUF/instillation (FC = Fold Change, $p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$ vs témoins, SP)

La figure 89 présente les résultats obtenus lors de l'évaluation de l'expression pulmonaire des protéines VDAC et TOMM20 impliquées dans la masse mitochondriale chez les souris témoins et exposées à la dose de 30 µg de PUF/instillation. Cette exposition sub-chronique a induit une augmentation significative de l'expression de TOMM20, avec un FC de 2,1. À *contrario*, aucune modification significative n'a été constatée pour VDAC.

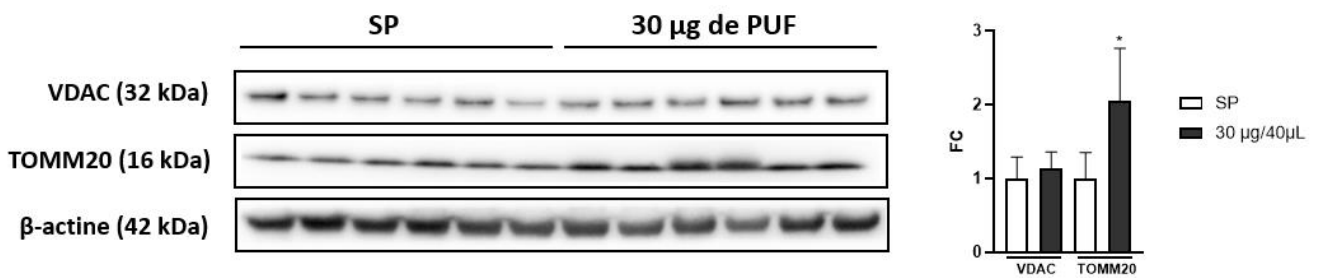


Figure 89 : Expression des protéines impliquées dans la masse mitochondriale, 24h après l'exposition sub-chronique des souris au SP ou à 30 µg de PUF/instillation (FC = Fold Change, $p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$ vs Témoins, SP)

La figure 90 présente les résultats obtenus lors de l'évaluation de l'expression pulmonaire des protéines impliquées dans la fission mitochondriale chez les souris témoins et exposées à la dose de 30 µg de PUF/instillation. Cette exposition particulière a induit une augmentation significative de FIS1 ainsi que de DRP1 phosphorylée que ce soit au niveau de la sérine 637 ou de la sérine 616, avec des FC respectifs de 1,7, 2,8 et 1,7.

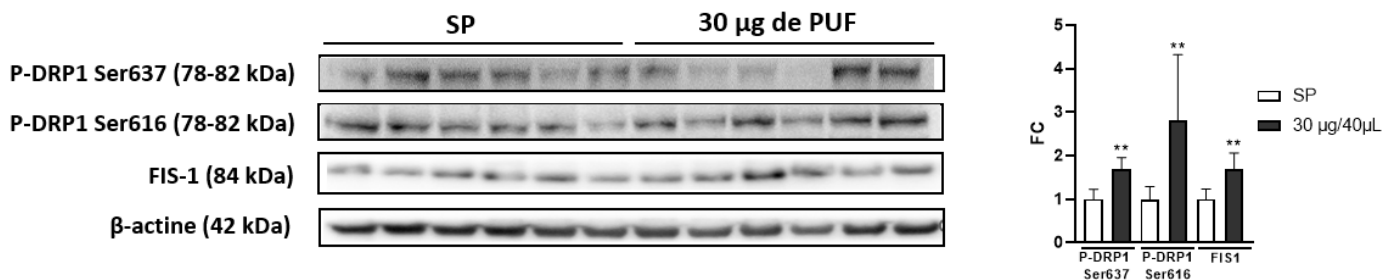


Figure 90 : Expression des protéines impliquées dans la fission mitochondriale, 24h après l'exposition sub-chronique des souris au SP ou à 30 µg de PUF/instillation (FC = Fold Change, $p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$ vs témoins, SP)

La figure 91 présente les résultats obtenus lors de l'évaluation de l'expression pulmonaire des protéines impliquées dans la fusion mitochondriale chez les souris témoins et exposées à la dose de 30 µg de PUF/instillation. Aucune modification significative n'a pu être constatée pour les protéines OPA-1, MFN 1 et MFN2.

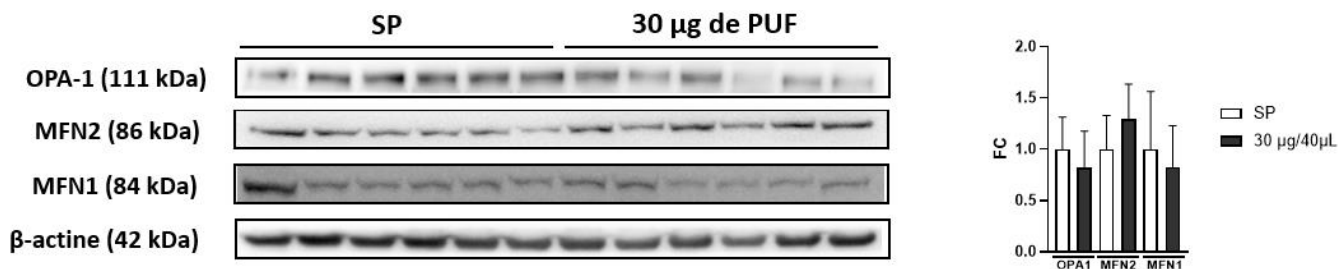


Figure 91 : Expression des protéines impliquées dans la fusion mitochondriale, 24h après l'exposition sub-chronique des souris au SP ou à 30 µg de PUF/instillation (FC = Fold Change, $p < 0,05^$, $p < 0,01^{**}$ vs témoins, SP)*

La figure 92 présente les résultats obtenus lors de l'évaluation de l'expression pulmonaire des protéines PINK1 et PARKIN impliquées dans la mitophagie chez les souris témoins et exposées à la dose de 30 µg de PUF/instillation. Cette exposition a induit une augmentation significative de l'expression de PINK1, avec un FC de 1,4. Une tendance à l'augmentation a également été constatée pour PARKIN avec un FC de 1,8, bien que celle-ci n'ait pas été statistiquement significative du fait de l'hétérogénéité des résultats.

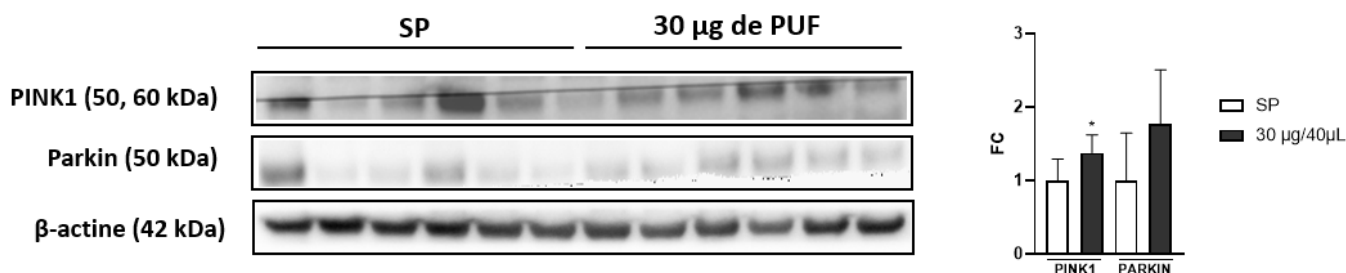


Figure 92 : Expression des protéines impliquées dans la mitophagie, 24h après l'exposition sub-chronique des souris au SP ou à 30 µg de PUF/instillation (FC = Fold Change, $p < 0,05^$, $p < 0,01^{**}$ vs Témoins, SP)*

v. Discussion

Le métabolisme mitochondrial étant décrit comme étroitement lié à l'apparition de pathologies à composante oxydative et/ou inflammatoire, et les poumons ayant été rapporté comme le principal organe-cible des PUF, une étude de la fonction mitochondriale s'est avérée être un axe de recherche prometteur, d'autant plus que la mitochondrie est également connue pour jouer un rôle dans l'induction de certaines formes de mort cellulaire. À partir de ce constat, il a été jugé pertinent d'utiliser la base de données de signatures moléculaires « MSigDB » du logiciel GSEA afin de rechercher des ensembles de gènes liés spécifiquement à la fonction mitochondriale à partir de nos données transcriptomiques. Ces analyses ont permis d'identifier des voies de signalisation dérégulées spécifiquement liées à des altérations de la fonction mitochondriale au niveau pulmonaire. A partir de ces données et en partant du fait que le stress oxydant est susceptible d'avoir des conséquences délétères sur le métabolisme énergétique des mitochondries, une analyse de la consommation en oxygène de ces dernières a été réalisée. Une diminution significative de la consommation en O₂ a ainsi été constatée à la suite des expositions à la dose la plus élevée de PUF. Bien qu'elle ne soit pas statistiquement

significative, une tendance à la diminution est également observée pour la dose la plus faible de PUF, suggérant une influence de la dose d'exposition. À ce jour, aucune étude portant sur la toxicité spécifique des PUF n'a montré de diminution de la consommation en oxygène mitochondriale. Cependant, des études portant sur l'impact plus général des PM_{2,5} ont montré la présence de cette altération, le plus souvent couplée à une réduction du potentiel de membrane mitochondriale $\Delta\phi_m$. Ainsi, Liu et ses collaborateurs (2023) ont montré l'induction de cette diminution *in vitro* sur des cellules épithéliales alvéolaires A549 exposées durant 48h à 32 $\mu\text{g/mL}$ de PM_{2,5}, puis *in vivo* chez des souris C57BL/6 exposées 2 jours consécutifs à 7,8 mg de PM_{2,5}/kg soit environ 250 μg de particules (473). Pardo et son équipe (2017) ont également montré cette diminution chez des macrophages alvéolaires de rats NR8383 exposés durant 24h à 12 μg d'extraits de poussières (474). Une autre étude menée par Wang et ses collaborateurs (2021), a également montré une diminution de la respiration mitochondriale chez des cellules BEAS-2B exposées à des faibles doses de 3 et 10 μg de PM_{2,5}/cm² pendant 24h (475). De la même manière, Gao et al (2022) a montré que cette diminution, accompagnée par une diminution du $\Delta\phi_m$ et de la production d'ATP chez des cellules épithéliales bronchiques 16HBE exposées durant 24h à des doses de 8 et 16 μg de PM_{2,5}/mL (476). À l'inverse, d'autres études montrent quant à elles, une diminution de la consommation en oxygène mitochondriale. À titre d'exemples, dans une étude antérieure réalisée au laboratoire, il a été démontré qu'une exposition aiguë ou répétée de cellules BEAS-2B à des PUF urbaines induisaient une augmentation de la consommation en oxygène mitochondriale (210). De la même manière, Park et son équipe (2021) ont obtenus des résultats similaires dans des cellules souches endométriales humaines (477). Dans ces études, l'augmentation de la consommation en oxygène s'expliquait par une augmentation de la masse mitochondriale. La combinaison de ces mécanismes pourrait constituer un mécanisme de compensation mitochondrial induit de manière très précoce pour faire face à l'afflux de PUF et/ou de composés désorbés à partir de ces dernières, qui, sur le long terme n'est cependant pas efficace, ce qui expliquerait que la consommation en oxygène finisse par diminuer dans le cadre de notre projet.

Afin de visualiser si, dans le cadre de notre projet de recherche, la diminution de la consommation en oxygène des mitochondries était corrélée à une diminution de la masse mitochondriale, l'expression de différents marqueurs spécifiques de celle-ci (*e.g.*, TOMM20, VDAC, OXPHOS) a été mesurée. De manière surprenante, la diminution de la consommation en oxygène des mitochondries était associée à une augmentation de la masse mitochondriale, comme en l'a montré l'expression des porines transmembranaires TOMM20 et dans une moindre mesure VDAC, couplée à une augmentation de l'expression des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale, et l'expression des différents complexes de la chaîne respiratoire, OXPHOS. Cette augmentation de la masse mitochondriale, qui n'est donc pas corrélée à une augmentation de la consommation en oxygène comme cela pouvait être attendu, a suggéré une diminution de l'activité des mitochondries. Les ERO générées par les PUF et/ou les composés désorbés à partir de ces dernières peuvent activement contribuer à cette altération fonctionnelle des mitochondries. À titre d'exemple, en réagissant avec l'oxyde d'azote, l'anion superoxyde forme l'anion peroxyde ONOO- qui inhibe irréversiblement la chaîne respiratoire mitochondriale en altérant les complexes II, IV et V (478). En outre, des études épidémiologiques ont montré une augmentation de l'expression des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale et/ou de la masse mitochondriale à la suite d'exposition aux PM₁₀ et PM_{2,5}, qui constituerait un mécanisme de compensation pour faire face aux dommages mitochondriaux induits par les PM (479,480). Par ailleurs, des observations réalisées par microscopie électronique à transmission ont permis de mettre en évidence la présence d'altérations morphologiques mitochondriales telles qu'une altération de l'organisation des crêtes mitochondriales associée à une rupture de la membrane mitochondriale externe, qui pourraient expliquer les altérations fonctionnelles de ces mitochondries. Ce type d'altérations morphologiques a déjà été observé dans d'autres études expérimentales visant à étudier la toxicité des nanoparticules. À titre d'exemple, Du et ses collaborateurs (2019) ont réalisé des observations similaires chez des rats Wistar exposés par instillations

intratrachéales durant 16 jours à 2, 5 ou 10 mg de nanoparticules de silice/kg/j (202). Ce dysfonctionnement mitochondrial semble être à la fois une cause et une conséquence des états oxydatifs et/ou inflammatoires (481,482). En effet, en générant des ERO et en libérant des motifs moléculaires associés aux dommages, les mitochondries sont impliquées dans de nombreux processus de signalisation cellulaire et participent activement à la régulation de l'inflammation (483). Néanmoins, l'activation de la voie de signalisation NRF2, en tant que principal régulateur de l'homéostasie redox cellulaire, est bien équipé pour contrecarrer la réponse redox mitochondriale et, par conséquent, maintenir ou rétablir l'équilibre redox de la cellule (484). Ici, dans ce projet, chez les souris exposées aux PUF de manière sub-chronique, l'induction de la voie de signalisation NRF2 couplée à la production de GSH semblent être suffisamment efficace pour contrôler le stress oxydant et maintenir la balance entre les processus pro- et anti-oxydants mais ne l'est pas suffisamment pour empêcher l'apparition d'altérations mitochondriales.

En raison du large spectre de fonctions cellulaires critiques dans lesquelles les mitochondries sont impliquées, le maintien d'une population saine de mitochondries est essentiel pour la survie des cellules (485). En effet, l'accumulation de mitochondries endommagées susceptibles de libérer d'avantage d'ERO et de produire moins d'ATP, peut entraîner l'apoptose et/ou la libération des composants mitochondriaux dans le cytosol, où leur reconnaissance par des récepteurs spécifiques active l'inflammation (486). L'élimination des mitochondries dysfonctionnelles par mitophagie, de même que le remplacement par l'expansion des mitochondries préexistantes s'avèrent donc indispensables (485). En effet, la dynamique mitochondriale participe activement au maintien de l'équilibre entre la biogénèse mitochondriale et l'élimination de ces dernières par mitophagie. En plus de participer à la genèse de nouvelles mitochondries, la fission mitochondriale permet la fragmentation du réseau mitochondriale, nécessaire à l'élimination sélective des mitochondries dysfonctionnelles. L'analyse des biomarqueurs de fission a montré une augmentation franche de la phosphorylation de la protéine Drp1 sur les résidus sérines 616 et 637, témoignant de l'activation de cette dernière, associée à une augmentation de l'expression de la protéine Fis1. Ainsi, l'ensemble de ces résultats suggère que l'augmentation de la biogénèse mitochondriale agit comme un mécanisme de compensation pour tenter de maintenir la production d'ATP nécessaire à la survie cellulaire. Plusieurs études *in vivo* ont obtenus des résultats similaires. En effet, Liu et son équipe (2023) ont montré qu'une exposition de souris C57BL/6 à 250 µg de PM_{2,5} pendant 2 jours consécutifs induisait une altération de la morphologie des mitochondries ainsi qu'une augmentation de leur élimination par mitophagie associée à un renforcement des processus de fission au niveau pulmonaire (473). Guo et ses collaborateurs (2017) ont montré des résultats similaires dans la muqueuse nasale de rats Sprague Dawley exposés à des PM_{2,5} pendant 30 jours consécutifs (487). Dans cette étude, les auteurs ont démontré qu'à des doses faibles et/ou des doses modérées, une intensification des processus de fusion se produisait afin de permettre aux mitochondries de partager leur contenu et de maintenir une production d'énergie suffisante pour faire face au stress environnemental. Lorsque ce stress est trop important, comme lorsque la dose est très élevée, les processus de fusion s'écroulent au profit des phénomènes de fission mitochondriale. Cela a également été démontré dans le cœur de souris Balb/c exposées pendant 4 semaines au même type de particules (488). Enfin, Wang et son équipe (2021) ont obtenu des résultats parfaitement similaires chez des souris Balb/c exposées pendant 6 semaines aux PM_{2,5} et ont, de plus, démontré que les altérations mitochondriales induites par les PM étaient transmissibles à la descendance (475). Bien qu'employant des PM_{2,5} et étant réalisées sur des durées d'exposition plus courtes, ces études confortent les résultats obtenus dans le cadre de notre projet, suggérant un réel impact des PUF sur le chef d'orchestre de la production énergétique qu'est la mitochondrie, et ce, même à faibles doses d'exposition. En plus du remplacement des mitochondries préexistantes par un mécanisme de fission, l'élimination des mitochondries dysfonctionnelles peut se faire par mitophagie. Pour cela, la cellule est capable d'accentuer son flux mitophagique en faisant intervenir diverses voies protéiques dont celle des protéines PINK1/PARKIN. En

effet, une fois phosphorylée par PINK1, PARKIN lie l'ubiquitine phosphorylée aux substrats protéiques de la membrane mitochondriale externe, formant un complexe qui sera reconnu par des protéines adaptatrices qui pourront alors elles-mêmes se lier au phagophore pour induire la dégradation de la mitochondrie (489). Dans notre projet, une augmentation significative de l'expression des protéines PINK1 et PARKIN fut constatée, suggérant un renforcement de l'activité mitophagique au sein des tissus pulmonaires à la suite des expositions particulières. À ce jour, la seule étude ayant cherché à étudier spécifiquement la mitophagie induite par des particules ultrafines a montré des résultats similaires aux nôtres chez des cellules neuronales exposées durant 24 heures à des nanoparticules de carbone (172).

Ainsi, dans ce projet, chez les souris exposées aux PUF pendant 3 mois, l'induction de la voie de signalisation NRF2 couplée à la production de GSH semblent être suffisants pour contrôler le stress oxydant et maintenir la balance entre les processus pro et anti-oxydants. Néanmoins, au niveau pulmonaire, des altérations mitochondriales sont observées, notamment d'un point de vue morphologique. En effet, en dépit d'un mécanisme mitochondrial de compensation incluant une augmentation de la phosphorylation oxydative et de la masse mitochondriale, une détérioration de la respiration mitochondriale couplée à une augmentation de la fission est observée. Ensemble, ces mécanismes contribuent activement à l'induction de la mitophagie.

C. Évaluation de l'induction de la mort cellulaire

i. Mesure de l'expression des protéines d'intérêt impliquées dans la mort cellulaire

La figure 93 présente les résultats obtenus lors de l'évaluation de l'expression pulmonaire des protéines impliquées dans l'autophagie chez les souris témoins et exposées à la dose de 30 µg de PUF/instillation. Seule une augmentation significative de l'expression des Atg7 et 12 a été observée, avec des FC respectifs de 1, 3 et 4,0. Aucune modification significative de l'expression des protéines FIP200, ULK1, Atg16, Beclin1, Atg5, Atg3, Atg101 et LC3A/B n'a été constatée.

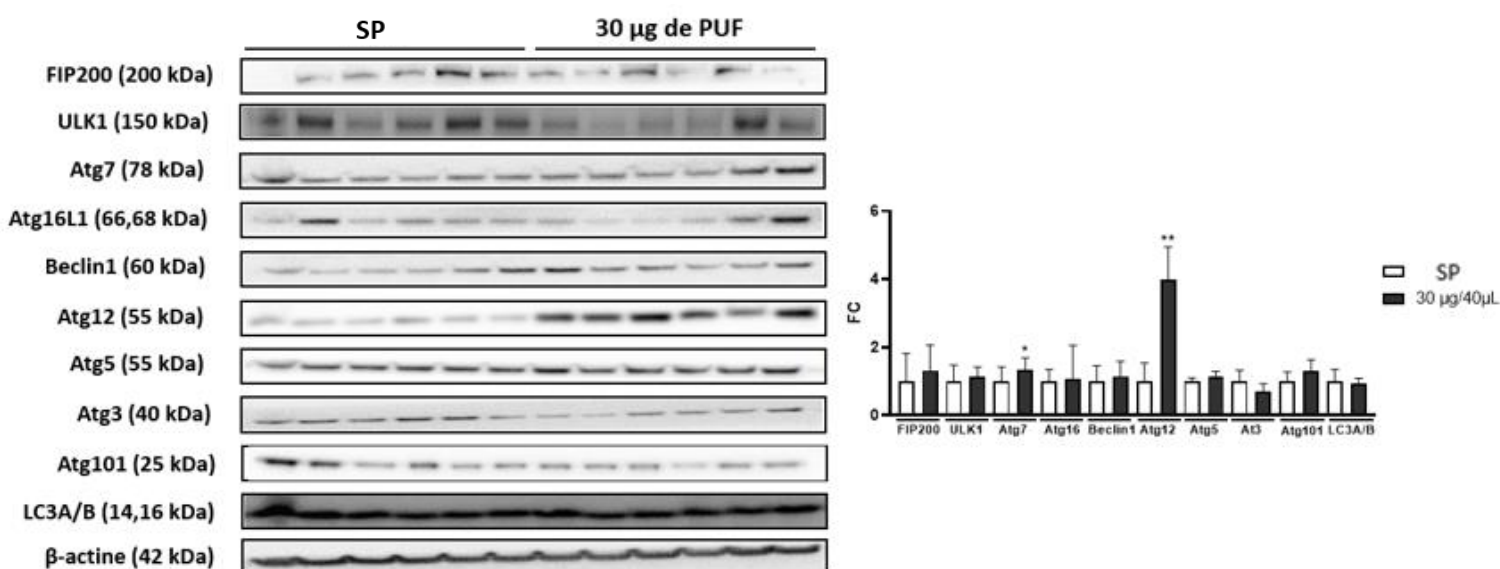


Figure 93 : Expression des protéines impliquées dans l'autophagie 24h après l'exposition sub-chronique des souris au SP ou à 30 µg de PUF/instillation (FC = Fold Change, p < 0,05, p < 0,01** vs Témoins, SP)*

La figure 94 présente les résultats obtenus lors de l'évaluation de l'expression pulmonaire des protéines impliquées dans la l'apoptose chez les souris témoins et exposées à la dose de 30 µg de PUF/instillation. Seule une diminution significative de l'expression de Bad phosphorylée a été observée, avec un FC de 0,7. Aucune modification significative n'a été observée pour l'expression des caspases 3, 3-clivée, 8, Bim et Bak.

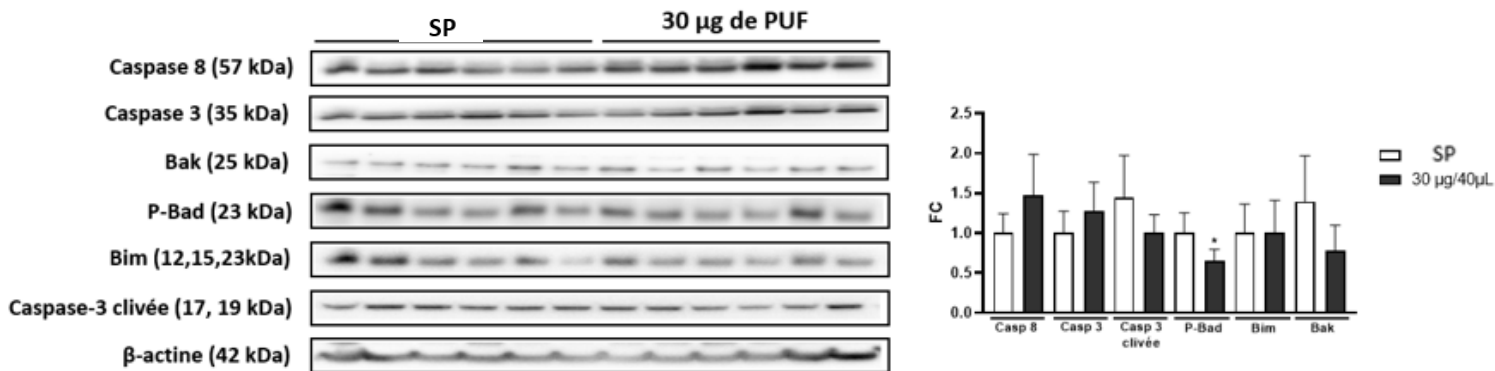


Figure 94 : Expression des protéines impliquées dans l'apoptose, 24h après l'exposition sub-chronique des souris au SP ou à 30 µg de PUF/instillation (FC = Fold Change, $p < 0,05^$, $p < 0,01^{**}$ vs Témoins, SP)*

La figure 95 présente les résultats obtenus lors de l'évaluation de l'expression pulmonaire des protéines impliquées dans la nécroptose chez les souris témoins et exposées à la dose de 30 µg de PUF/instillation. Aucune modification significative n'a été observée concernant l'expression des protéines RIP et RIP 3 phosphorylées.

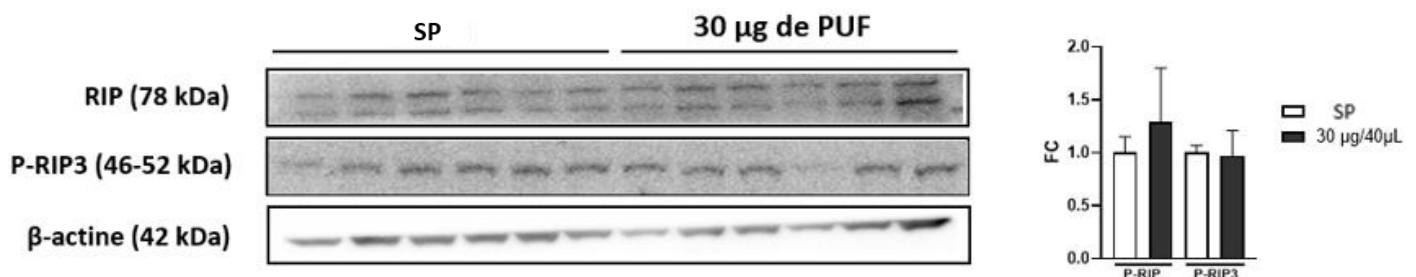


Figure 95 : Expression des protéines impliquées dans la nécroptose, 24h après l'exposition sub-chronique des souris au SP ou à 30 µg de PUF/instillation (FC = Fold Change, $p < 0,05^$, $p < 0,01^{**}$ vs Témoins, SP)*

La figure 96 présente les résultats obtenus lors de l'évaluation de l'expression pulmonaire de la protéine FTH1 impliquée dans la ferroptose chez les souris témoins et exposées à la dose de 30 µg de PUF/instillation. L'expression de la protéine FTH1 a été significativement augmentée à la suite de cette exposition avec un FC de 3,1.

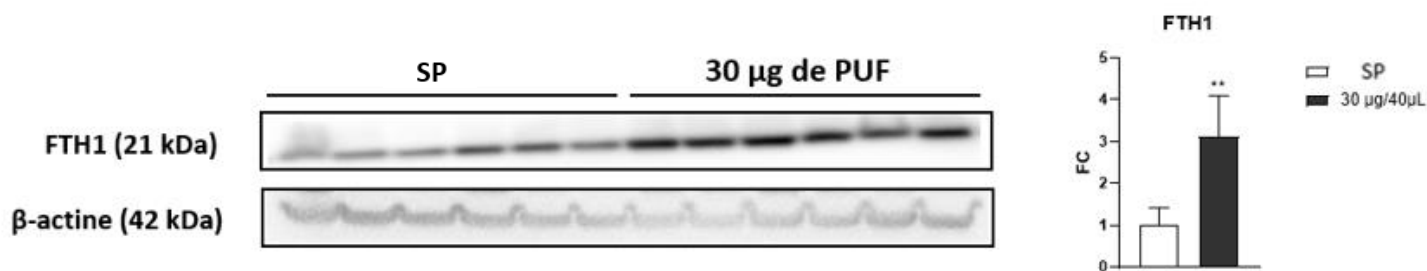


Figure 96 : Expression de la protéine FTH1 impliquée dans la ferroptose, 24h après l'exposition sub-chronique des souris au SP ou à 30 µg de PUF/institution
(FC = Fold Change, $p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$ vs Témoins, SP)

i. Discussion

La rupture de la membrane mitochondriale externe pouvant conduire au déversement de son contenu, susceptible de renfermer des protéines pro-apoptotiques, il a alors été jugé pertinent de s'intéresser à l'induction de l'apoptose au sein des tissus pulmonaires, d'autant plus que les données transcriptomiques ont révélé l'activation de voies de signalisation liées à ce processus telles que celles impliquées dans la régulation du processus apoptotique des cellules immunitaires (*e.g.*, *Slc7a11*, *Fcgr2b*, *Hcar2*, *Ccr5*, *Cxcr2*). Divers paramètres ont donc été analysés par Western blot (*i.e.*, Caspases 3 et 8, Bak, Bad, Bim), ne montrant aucune dérégulation spécifique, suggérant ainsi qu'aucun processus apoptotique n'est induit au niveau pulmonaire ou tout du moins, que les signaux pro- et anti-apoptotiques ont réussi à rétablir un état d'homéostasie cellulaire. Par ailleurs, Yamini et son équipe (2015) a montré chez des souris C57BL/6 qu'une diminution de l'expression de la sous-unité NFκB p50 induisait une diminution de l'apoptose cellulaire, suggérant que ceci ait également pu contribuer à l'absence d'apoptose dans notre projet (490). Afin de nous assurer qu'aucun autre processus de mort cellulaire n'était induit par les PUF, divers paramètres spécifiques de l'autophagie (*i.e.*, FIP200, ULK1, Atg7, Atg16L1, Beclin1, Atg12, Atg5, Atg3, Atg101, LC3A/B), de la nécroptose (*i.e.*, RIP, RIP3) et de la ferroptose (*i.e.*, GPX4, FTH1) ont été mesurés. Une augmentation de l'expression de la protéine FTH1 fut constatée. Cette dernière est exprimée dans les sous-unités lourdes constitutrices de la ferritine qui est une protéine impliquée dans le stockage du fer. Or, outre le fer directement apporté par les PUF, la dégradation des molécules d'hèmes par HO-1 produit du fer ferreux Fe^{2+} qu'il est indispensable de prendre en charge afin de limiter la génération d'espèces radicalaires supplémentaires catalysée par la réaction de Fenton. Ainsi, l'augmentation de ce paramètre n'est pas forcément le signe d'une ferroptose accrue. Sur l'ensemble des autres éléments analysés, seuls deux paramètres spécifiques de l'autophagie, Atg7 et Atg12, étaient significativement augmentés à la suite des expositions répétées aux PUF, suggérant l'absence de mort cellulaire massive au sein des tissus pulmonaires au terme des 3 mois d'exposition. Ces altérations de la voie de signalisation autophagique, bien que faiblement exprimées, amènent à s'interroger sur l'existence d'une mort cellulaire précoce et progressive qui ne serait alors plus visible après 3 mois d'exposition, ayant déjà laissée place à d'autres processus moléculaires et cellulaires tel que ceux impliqués dans le remodelage tissulaire.

D. Évaluation du remodelage tissulaire et de la transition épithélio-mésenchymateuse

i. Recherche de signatures spécifiques liées au remodelage tissulaire

La figure 97 présente les résultats obtenus par utilisation de la base de données de signatures moléculaires « MSigDB » du logiciel GSEA à partir des données transcriptomiques obtenus chez le groupe de souris exposées à la dose la plus élevée de PUF, comparativement au groupe de souris témoins exposées au sérum physiologique. Ces analyses ont permis d'identifier 3 voies de signalisation dérégulées impliquées dans le remodelage tissulaire dont « Collagen chain trimerization » (12 ARNm up-régulés), « Collagen dégradation » (17 ARNm up-régulés) et « Dégradation of the extracellular matrix » (25 ARNm up-régulés) (figure 81).

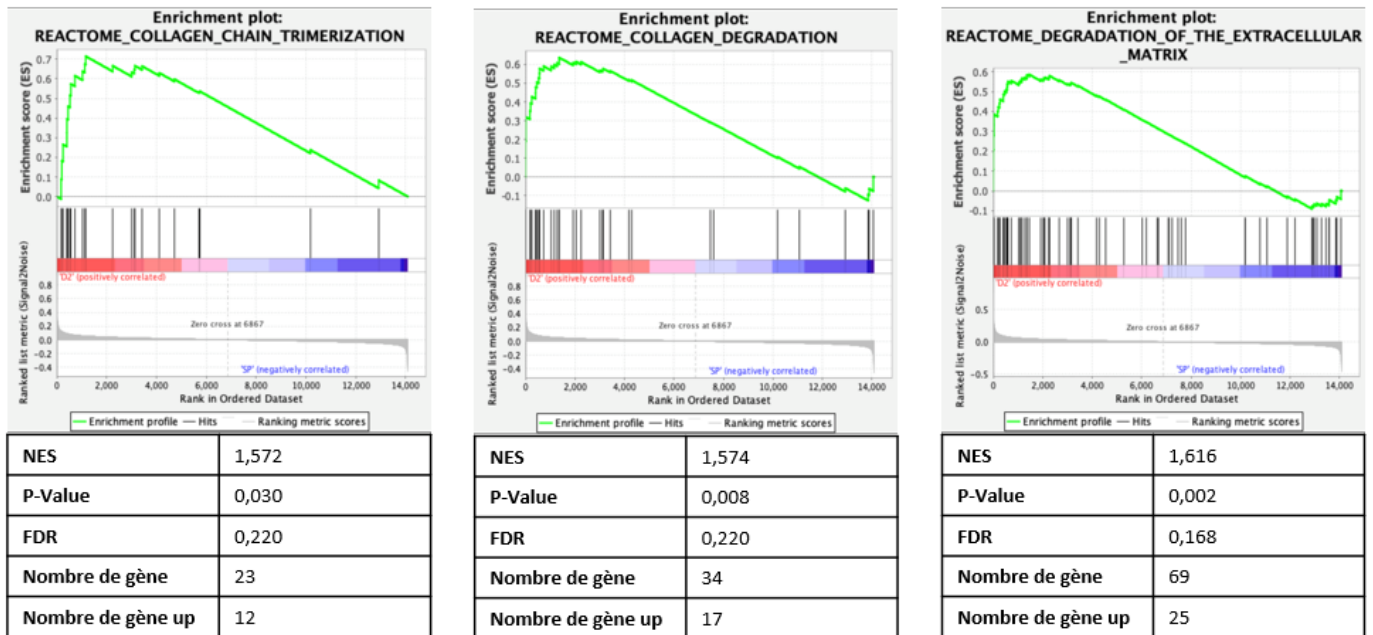


Figure 97 : Ensemble de gènes enrichis pour les signatures relatives au remodelage tissulaire chez les souris exposées à la dose de 30 µg de PUF/instillation vs souris témoins exposées au sérum physiologique.

ii. Mesure de l'expression des protéines d'intérêt impliquées dans le remodelage tissulaire et la TEM

La figure 98 présente les résultats obtenus lors de l'évaluation de l'expression pulmonaire des protéines impliquées dans le remodelage tissulaire et la transition épithélio-mésenchymateuse chez les souris témoins et exposées à la dose de 30 µg de PUF/instillation. Cette exposition a induit une augmentation significative de l'expression de la N-cadhérine, de Smad2, de la vimentine, d'α-SMA et de la cathepsine K, avec des FC respectifs de l'ordre de 1,5, 1,3, 1,4, 1,7 et 1,6. Par ailleurs, une diminution significative de l'expression de ZO1 et de la E-cadhérine a été observée, avec des FC de 0,5 et 0,7, respectivement.

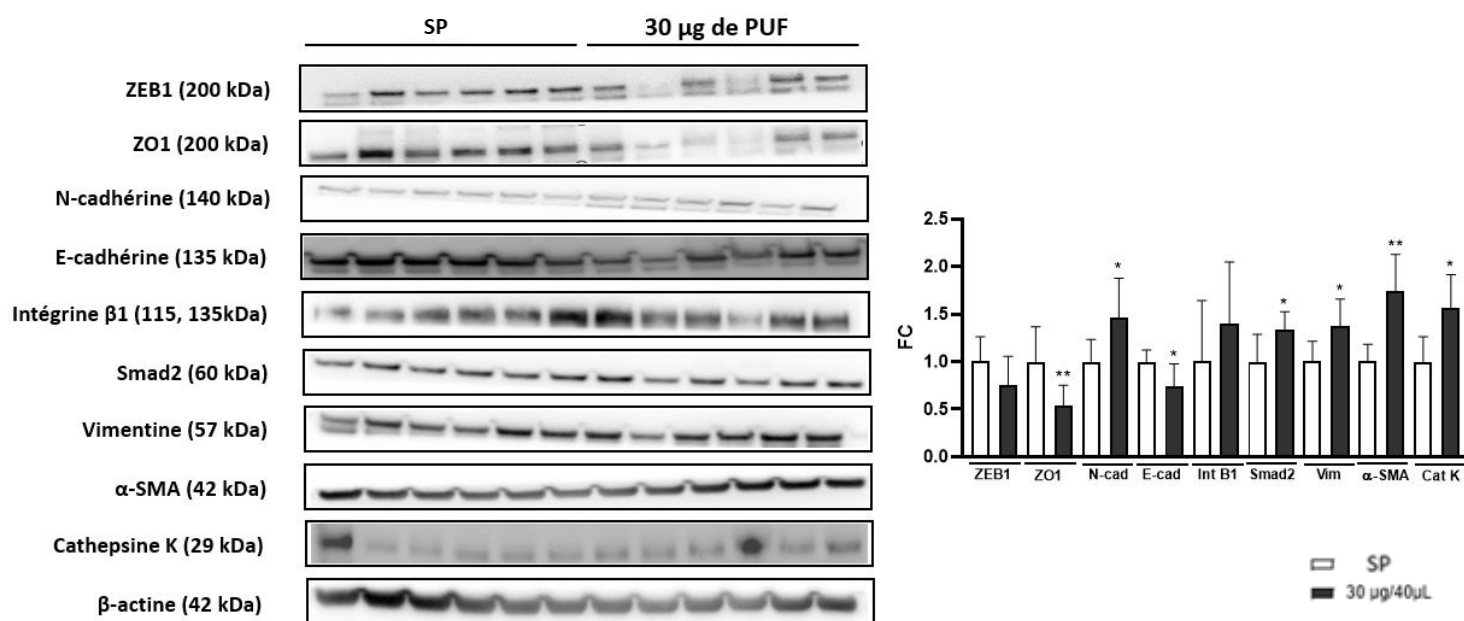


Figure 98 : Expression des protéines impliquées dans le remodelage tissulaire et la transition épithélio-mésenchymateuse, 24h après l'exposition sub-chronique des souris au SP ou à 30 µg de PUF/instillation. (FC = Fold Change, $p < 0,05^$, $p < 0,01^{**}$ vs Témoins, SP)*

iii. Discussion

Jusqu'à présent, l'approche multi-organe employée dans ce projet de recherche a permis de mettre en évidence des marqueurs de stress oxydant et d'inflammation dans l'ensemble des organes cibles, à des niveaux d'expression variable. Au niveau pulmonaire, cette réponse inflammatoire provoquée par les PUF et/ou les composés désorbés à partir de ces dernières induit la sécrétion de cytokines et conduit au recrutement massif de cellules immunitaires. Le dérèglement et/ou l'exacerbation des fonctions épithéliales est susceptible de léser l'épithélium de façon répétée et de conduire à une inflammation chronique couplée une altération du processus de réparation tissulaire et d'élimination/remplacement des cellules anormales, ayant pour conséquence un remodelage tissulaire progressif de l'épithélium bronchique. Dans notre projet de recherche, il semblerait que ce remodelage des tissus pulmonaires soit induit par l'existence d'un déséquilibre entre les mécanismes de mort cellulaire, et ceux de prolifération et de différenciation des cellules inflammatoires.

En effet, les données transcriptomiques ont révélé l'activation de voies de signalisation liées à ce processus telles que celles impliquées dans la régulation de l'activité des peptidases, des endopeptidases et de leurs inhibiteurs (*e.g.*, *Timp1*, *Mmp9*, *Mmp12*, *S100a4*, *Serpine1*). Ce mécanisme de pathogénicité pulmonaire étant le plus souvent observé dans le cadre de la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM), il nous a semblé pertinent d'étudier certains paramètres liés à cette dernière par Western Blot (*i.e.*, ZEB1, ZO1, N-cadhérine,

E-cadhérine, Intégrine $\beta 1$, Smad2, Vimentine, α -SMA, Cathepsine k). Pour pouvoir se faire, cette dernière nécessite une diminution de l'expression des protéines d'adhésion (e.g., N- et E-cadhérines) et des jonctions serrées (e.g., ZO1) qui assurent la formation d'une barrière sélective régulant le passage des ions et molécules entre les différentes cellules constitutives des épithéliums. Ici, une augmentation significative de l'expression de la N-cadhérine couplée à une réduction de celle de la E-cadhérine a été observée. Ces observations sont très intéressantes car, en plus d'être aujourd'hui considérée comme une protéine inhibitrice de la prolifération et de la croissance cellulaire, la E-cadhérine est drastiquement réduite dans les cellules cancéreuses de manière inverse à l'expression de la N-cadhérine qui est, quant à elle, nettement augmentée (491–493). En parallèle, une diminution significative de l'expression de ZO1 fut constatée. Cette protéine sous-membranaire cytoplasmique participe activement à la formation des jonctions serrées intercellulaires en liant les protéines transmembranaires (e.g., occludines, claudines) au cytosquelette d'actine des cellules (494). Rastaldi et son équipe (2002) ont par ailleurs démontré qu'une réduction de l'expression de ZO-1 était associée à un gain d'expression des protéines caractéristiques du profil mésenchymateux telles que l' α -SMA et la vimentine (495). Une augmentation significative de l'expression de ces deux protéines a été constatée dans notre projet. Lors de la TEM, la transformation des cellules épithéliales en cellules mésenchymateuses, et notamment en fibroblastes, contribue activement au développement d'une fibrose tissulaire. Le rôle de l' α -SMA, marqueur exprimé par les fibroblastes, dans la promotion de la TEM au sein des cellules cancéreuses et de la fibrose pulmonaire est aujourd'hui avéré (496). La vimentine, qui est quant à elle exprimée dans les filaments intermédiaires du cytosquelette, participe activement à la TEM réorganisant la structure de celui-ci. En effet, Liu et son équipe ont démontré qu'une surexpression de cette protéine induisait une augmentation de la rigidité et la mobilité cellulaires, réorientait la polarité des microtubules et induisait un phénotype mésenchymateux en augmentant l'expression de l'intégrine $\beta 1$ tout en réduisant celle de l'E-cadhérine, tout comme nous avons pu le constater dans notre projet (497). Ces intégrines sont des récepteurs présents à la surface des cellules interagissant avec la matrice extracellulaire, permettant ainsi l'adhérence des cellules. Ces propriétés leur confèrent un rôle dans la migration des cellules tumorales par l'intermédiaire de la TEM (498). Bien que l'expression de l'intégrine $\beta 1$ ne soit pas strictement nécessaire pour initier la TEM, celle-ci participe activement à son aggravation (499,500). En effet, en induisant la formation d'un complexe β -caténine/Smad2 lors de la TEM médiée par le TGF- β , elle contribue au développement de la fibrose idiopathique pulmonaire (501). L'expression des protéases à cystéine lysosomales telle que la cathepsine K serait, quant à elle, négativement médiée par TGF- β . De par son implication dans le renouvellement et la dégradation de la matrice extra-cellulaire, la cathepsine K jouerait un rôle protecteur en cherchant à contrôler le développement de la fibrose pulmonaire (502). L'expression de ces deux protéines, Smad2 et Cathepsin K, est augmentée dans le cadre de notre projet, ce qui conforte l'induction d'un remodelage des tissus pulmonaires à la suite des expositions particulières. Ce développement d'un remodelage, caractérisé par un phénomène de TEM, a également été identifié dans d'autres études cherchant à évaluer l'impact des PUF sur les poumons. Ainsi, Longhin et ses collaborateurs (2016) ont démontré la modulation de gènes impliqués dans la TEM (e.g., *SerpinB2*, *FOXA1/2*, *TGF β 1*, *CDH1/2*) dans des cellules épithéliales bronchiques humaines HBEC3 exposées pendant 2 semaines à des PUF diesel (299). Grili et son équipe (2018) ont par ailleurs démontré que la modulation de ces gènes (e.g., *GREM1*) était également visible à la suite d'une exposition unique à une faible dose de PUF diesel chez des cellules BEAS-2B (300). En plus de démontrer l'activation des phénomènes de TEM par une réduction de l'expression de l'E-cadhérine et une augmentation de l' α -SMA dans des modèles *in vitro* exposés pendant 24h à une faible dose de PUF contenant du dichlorobenzène (i.e., BEAS-2B et des cellules épithéliales pulmonaires néonatales murines), Thevenot et son équipe (2013) l'ont également validé *in vivo* chez des souris C57BL/6 exposées pendant 7 jours à cet aérosol (303). De la même manière, Lee et son équipe (2022) ont démontré que l'exposition sub-chronique de souris Balb/c préalablement sensibilisées par un acarien à des PUF diesel pendant 8 semaines induisait un épaissement du collagène sous épithélial, ainsi

qu'une diminution de l'expression des marqueurs épithéliaux (*e.g.*, E-cadhérine, ZO-1) couplée à une augmentation de l'expression des marqueurs mésenchymateux (*e.g.*, N-cadhérine, α -SMA) (304). Bien qu'utilisant des PUF diesel plus riches en composés nocifs, ces études confortent les résultats obtenus dans le cadre de notre projet en démontrant la capacité de ces particules à induire une TEM et un remodelage des tissus pulmonaires même à la suite d'une exposition aiguë ou subaiguë. Notre étude, réalisée sur le plus long terme, démontre par ailleurs que des PUF urbaines potentiellement moins nocives que des PUF diesel sont tout de même capables d'induire une TEM et un remodelage des voies respiratoires sur le plus long terme. Il aurait été intéressant d'effectuer des sacrifices à des temps plus courts afin de visualiser si ces processus étaient induits précocement ou si c'était la répétition des expositions qui contribuait activement à l'activation de ces derniers, qui à termes, sont susceptibles de participer au développement d'un cancer au niveau pulmonaire.

Partie IV : Discussion générale

Tableau 41 : Tableau récapitulatif des résultats obtenus

CARACTERISATION PHYSICO-CHIMIQUE ET BIOLOGIQUE DES PUF											
Granulométrie			180,07 +/- 28,35 nm								
Composition			Endotoxines		+						
			Métaux		Ca > Si > Fe > Na > Al > K > Mg						
			HAP		Benzo(b)fluoranthène > Benzo(e)pyrène > Chrysène > Benzo(ghi)perylène						
			PCB		PCB 118 > PCB 105						
			Dioxines		Ochtachlorodibenzodioxine > 1,2,3,4,6,7,8-HpCDD						
			Furannes		Ochtachlorodibenzofurane > 1,2,3,4,6,7,8-HpCDF						
POTENTIEL OXYDANT											
			10 µg				30 µg				
CM-H₂DCFDA			++				+++				
DTT			++				+++				
GSSG/GSH			++				+++				
AA			++				+++				
DISTRIBUTION DES PUF											
Comportement		Désinhibition et Hyperactivité des souris exposées à 10 µg de PUF									
		Poumon		Cœur		Reins		Foie		Cerveau	
Métaux		Cs, Mn, V, Cd, Co				Cr, Cs, Cu, Mn, Cd, Co		Cs, Cu, Mn, Cd, Co		Cu, Co	
		Poumon		Cœur		Reins		Foie		Cerveau	
		10 µg	30 µg	10 µg	30 µg	10 µg	30 µg	10 µg	30 µg	10 µg	30 µg
Gènes	<i>Ahr</i>	++	+++	+	++			+	+	+	++
	<i>CYP1A1</i>	++	++	++	+++			+	+	+	++
	<i>CYP1B1</i>	++	+++	+	++			+	+	++	++
	<i>Mt1</i>	++	+++	+	++		+	--	--	+	++
	<i>Mt2</i>	++	+++	+	++		+	--	--		
	<i>Mt3</i>	++	+++	+	+		+	--	--	+	+
	<i>Mt4</i>	++	+++		-			--	--	++	+++
EVALUATION DE LA TOXICITE DES PUF PAR UNE APPROCHE MULTI-ORGANE											
		Poumon		Cœur		Reins		Foie		Cerveau	
		10 µg	30 µg	10 µg	30 µg	10 µg	30 µg	10 µg	30 µg	10 µg	30 µg
		STRESS OXYDANT									
GSSG/GSH		++	+++	+	++	+	+	+	++	+	++
Liaison NRF2/ADN								+			
	<i>GCLC</i>							+	++		+
	<i>GCLM</i>	-	-		-					-	--

Gènes	<i>GPX1</i>	++	+++	+	++			+	++	+	++
	<i>GSR</i>	++	+++	+	++			+	++	+	++
	<i>HMOX1</i>	++	+++	+	++			+	++	+	++
	<i>KEAP1</i>		-		-						
	<i>MGST1</i>	+	++			+	+		+		
	<i>NQO1</i>	++	+++	++	+++	+	+	++	+++		
	<i>NRF2</i>	+	+		+					+	+
	<i>SOD1</i>	++	+++	++	+++			+	++	+	++
	<i>TXN1</i>	-	-		--		+	+	++	+	++
Activité des Enzymes	<i>CAT</i>	++	++	++	+++						
	<i>GPx</i>	+	+++	+	+++			+	++	++	+++
	<i>GR</i>	++	+++	++	+++			++	++	++	+++
	<i>GST</i>	+	+++			+	++		++		
	<i>NQO1</i>	+	+++	+	+++	++	+++	+	+		
	<i>SOD</i>	+	+++	+	+++		+	+	+		++
Lésions	4-HNE									-	-
	8-OHdG		-							-	
	8-OHG		+		-						
	AGE										
	AOPP	-				-	-				
	Prot-CO								-		-
INFLAMMATION											
Liaison NFκB/ADN				+							+
Cytokines	IFN-γ										
	IL-1β										
	IL-2				++						
	IL-4										
	IL-5										
	IL-6				+						
	IL-9										--
	IL-10										
	IL-12p70										
	IL-15		-							++	++
	IL-17A/F										
	IL-27/IL-30				++						
	IL-33	+	++				+		+++	++	+++
	IP-10										
	KC/GRO		++								+
	MCP-1									+	++
MIP-1α	++	+++									
MIP-2	++	+++		++							
TNF-α											

Polarisation M1/M2	F4/80		++							
	iNOS	--	-							
	CD163									
EVALUATION DE LA TOXICITE DES PUF PAR DES APPROCHES TRANSCRIPTOMIQUES										
miARN										
10 µg										
30 µg										
miARN circulants surexprimés					++	214-3p ; 133a-5p ; 146b-3p ; 193a-5p ; 669c-3p ; 615-3p ; 485-3p				
miARN circulants sous exprimés	+				+++	19a-3p ; 142a-5p ; 144-3p ; 16-1-3p ; 19b-3p ; 32-5p ; 106b-5p ; 15a-3p ; 425-5p ; 148b-3p ; 18a-5p				
	Poumon	Coeur	Reins	Foie	Cerveau					
miARN surexprimés	106b-5p 148b-3p 425-5p	214-3p		32-5p	144-3p					
miARN sous-exprimés			32-5p							
mRNA - POUMONS										
ARNm surexprimés	+				+++					
ARNm sous-exprimés	++				++					
VOIES DE SIGNALISATION DEREGULEES - POUMONS (DOSE 30 µg)										
STRESS OXYDANT										
Voie Nrf2 et Homéostasie Redox	HMOX-1, TXN1				++					
	KEAP1, TRXR1				+					
	GPX4, NRF2, PRDX1, SOD1, SOD2, TXN2, TXNIP									
INFLAMMATION										
Polarisation macrophagique	CD11c				++					
	CD206, CD68, CD86, Iba1/AIF1				+					
	F4/80									
Voie NFκB	IKKβ				+++					
	NFκB p65 et 105									
	IKKα, NFκB p50, IκBα				-					
ALTERATIONS MITOCHONDRIALES										
Respiration mitochondriale	--									
Chaîne respiratoire	Complexe I									
	Complexes II et III				+++					
	Complexes IV et V				++					
Masse mitochondriale	TOMM20				++					
	VDAC									

Fission	P-DRP1-Ser637, P-DRP-Ser616, FIS-1	+++
Fusion	OPA-1, MFN1, MFN2	
Mitophagie	PINK1	++
	Parkin	+
MORT CELLULAIRE		
Autophagie	Atg12	++
	Atg7	+
	FIP200, ULK1, Atg16, Beclin-1, Atg5, Atg3, LC3A/B	
Apoptose	Caspases 3, 3 clivée, 8, Bim, Bak	
	P-Bad	-
Nécroptose	P-RIP, P-RIP3	
Ferroptose	FTH1	++
REMODELAGE TISSULAIRE		
Transition épithélio-mésenchymateuse	α -SMA	++
	N-cadhérine, Smad2, Vimentine, Cathepsine-K	+
	Zeb1, Intégrine β 1	
	E-cadhérine	-
	Zo-1	--

Bien que les émissions atmosphériques soient aujourd'hui en baisse, la pollution atmosphérique demeure un problème de santé publique majeur, à l'origine de plus de 4,2 millions de décès prématurés par an dans le monde selon les estimations les plus récentes (OMS, 2021). Parmi les polluants incriminés, le rôle clé joué par la fraction particulaire et plus particulièrement par les $PM_{2,5}$ n'est plus à démontrer, faute de données à ce jour suffisantes vis-à-vis des PUF. En 2021, l'AEE estimait encore que 97 % de la population urbaine était exposée à des concentrations de $PM_{2,5}$ supérieures aux valeurs guides préconisées par l'OMS. La réactivité de surface et la solubilité plus importantes des PUF contenues dans cette fraction fine laissent augurer une activité biologique plus néfaste pour la santé humaine, attirant l'attention des autorités compétentes au cours de ces dernières années. Bien que des éléments de preuve suggèrent aujourd'hui la capacité des PUF à être distribuées dans l'ensemble de l'organisme après s'être déposées dans les alvéoles, les mécanismes par lesquels elles exercent leur toxicité demeurent à ce jour encore très peu élucidés. C'est pourquoi, des recherches sur les effets des PUF, en relation avec leurs caractéristiques physico-chimiques et leurs sources, s'avèrent à l'heure actuelle nécessaires à l'amélioration des connaissances scientifiques et à l'instauration des mesures de prévention. Ainsi, les objectifs principaux de ce projet de thèse ont consisté à apporter des éléments novateurs sur la toxicocinétique (*i.e.*, distribution/persistance) et la toxicodynamique (*i.e.*, mécanismes physiopathologiques, voies de signalisation associées) de PUF prélevées en milieu urbain, d'une part, et les effets organo-spécifiques des PUF et l'utilisation des miARN circulants comme indicateurs d'exposition chronique et/ou cumulées aux PUF chez un modèle murin, d'autre part.

Le premier enjeu majeur de ce travail a été de prélever des particules représentatives de l'exposition moyenne des personnes vivant en milieu urbain et d'en effectuer une caractérisation physico-chimique et biologique précise. Ainsi, dans ce travail, des particules quasi-ultrafines (*i.e.*, $PM_{0,18}$) ont été prélevées dans la zone urbaine de Lille, sous influence du trafic routier et ferroviaire, la rendant représentative de l'exposition moyenne des populations vivant en ville, en incluant des sources à la fois urbaines, industrielles et routières. La caractérisation physico-chimique de ces dernières a confirmé leur caractère principalement urbain caractérisé par une importante richesse en éléments traces métalliques, HAP, PCB et dioxines, en accord avec ce qui avait pu être mesuré dans d'autres grandes villes de la région Hauts-de-France (192,210). Cette composition chimique complexe et hétérogène des PUF, qui est évolutive d'un point de vue spatio-temporel et influencée par des facteurs à la fois physico-chimiques et environnementaux, constitue une difficulté majeure pour l'évaluation de leur niveau de toxicité. Pourtant, la réglementation actuellement en vigueur ne prend pas en compte la disparité de leurs compositions chimiques, n'intégrant que leur aspect massique. Afin de ne pas négliger cet aspect dans le cadre de notre projet et d'évaluer de manière précise le potentiel toxique de nos PUF, le POTOX de ces dernières a été mesuré en prenant soin d'utiliser un éventail de méthodes complémentaires permettant de n'omettre aucun constituant particulaire. En plus de révéler un POTOX intrinsèque important des PUF, généralement supérieur à ceux d'autres nanomatériaux testés et équivalent à celui d'autres PM urbaines, ces analyses ont souligné la capacité des éléments particulaires et solubles de ces PUF à générer la production significative d'ERO. Ce POTOX est à mettre en perspectives avec leur composition chimique riche en métaux et métalloïdes, HAP, PCDD, PCDF et PCB. En effet, il a été démontré qu'en fonction de la taille des particules, le POTOX pouvait avoir des déterminants chimiques variables. Zhang et ses collaborateurs (2016) ont ainsi démontré que les $PM_{0,18-2,5}$ riches en carbone organique et élémentaire avaient un POTOX nettement plus important que les $PM_{2,5-10}$ (386). En comparaison aux résultats précédemment obtenus dans le cadre du projet « PARTICLES » mené au sein de notre laboratoire (367), des $PM_{2,5}$ prélevées au centre de Lille présentaient un POTOX plus élevée par l'intermédiaire des tests du GSH et du CM- H_2 DCFDA mais moins important avec les tests de l'acide ascorbique et du DTT, témoignant bien de l'importance de la composition de ces dernières et des sources d'émission l'influençant. Par ailleurs, Liu et son équipe (2018) ont démontré l'importance de la bioaccessibilité de la fraction métallique des PUF dans

l'induction d'un stress oxydant par des réactions génératrices d'ERO impliquant trois acteurs : les quinones, les métaux et les réducteurs présent au niveau pulmonaire (387). Parmi les métaux impliqués, le Fe, le Cu et le Mn présents à la surface des PUF semblent jouer un rôle clé dans leur POTOX et dans leur capacité à induire un stress oxydant (159,388). Ici, les PUF prélevées à Lille présentaient des concentrations non négligeables en Fe, Cu et Mn correspondant respectivement à 2,0 ; 10,1 et 0,8 % de la composition totale en métaux et éléments traces métalliques (ETM) des PUF, et donc susceptibles de participer activement à leur POTOX. Une autre étude épidémiologique réalisée chez des volontaires sains a par ailleurs démontré qu'une exposition à des PM_{0,3} riches en Ag, Al, Ba, K, Li, Ni, Sn, V et possédant un POTOX élevé était associée à une augmentation des biomarqueurs systémiques de l'inflammation et du stress oxydant (387). Le stress oxydant étant l'un des mécanismes sous-jacents majoritairement impliqués dans la toxicité des particules en général, et des PUF en particulier, le POTOX de ces PUF a supporté leur capacité à générer des ERO dans des matrices acellulaires et par conséquent, très probablement, au sein des matrices biologiques, ce qui a été vérifié dans la suite de ce travail.

Le deuxième enjeu de ce projet de recherche a été d'évaluer la toxicocinétique des PUF une fois inhalées. Dans cette optique, une approche *in vivo* a été initiée sur des souris BALB/cJRj, mâles, alors âgées de 12 semaines et exposées par instillation intranasale à 0, 10 ou 30 µg de PUF suspendues dans 40 µL de sérum physiologique stérile, à raison de 2 instillations/semaine pendant 12 semaines (90 jours). Le choix de ce modèle murin s'est fait à la suite du projet « PARTICLES » (367) dans lequel nous avons opté pour des souris A/J qui présentaient l'inconvénient de posséder une sensibilité accrue aux tumeurs pulmonaires chimiquement induites par mutation de l'oncogène K-ras (503). Afin de pallier à ce biais, le modèle de souris Balb/cJRj a été choisi dans le cadre de ce nouveau projet, de par sa sensibilité moyenne au développement de pathologies et notamment de cancers en réponse à un stress chimique, le rendant représentatif de la sensibilité moyenne des individus (345). Ces souris ont été exposées à 10 ou 30 µg de PUF/instillation intranasale, ce qui correspond à des doses réalistes et représentatives du niveau d'exposition des personnes habitant dans des villes moyennement polluées en absence ou en présence d'un pic de pollution. Ces expositions par instillations intranasales présentent l'avantage d'induire une distribution pulmonaire homogène des particules qui parcourent ainsi l'arbre respiratoire dans son ensemble, depuis le nez jusqu'aux poumons, contrairement à l'exposition intratrachéale (140,141). Bien plus naturelle que le recours aux instillations intratrachéales, cette méthode indolore et non-invasive ne nécessite pas de contention de l'animal, permettant ainsi de limiter le stress de ce dernier. De plus, l'anesthésie légère et non invasive employée offre la possibilité d'utiliser cette technique de façon répétée, permettant une exposition à long terme des animaux. Comme dans tout projet impliquant des animaux, une surveillance quotidienne du bien-être animal et de l'apparition d'éventuels changements de comportement s'est avérée indispensable.

L'apparition de manifestations biologiques à connotation cérébrale (*e.g.*, agressivité, anxiété) chez les souris exposées aux PUF, confortée par les résultats de tests comportementaux ayant révélé une hyperactivité et une désinhibition de ces dernières ont motivé notre choix d'opter pour une approche multi-organe, bien que la porte d'entrée des particules soit pulmonaire. Une fois déposée au niveau des alvéoles, les PUF sont difficilement éliminées, conduisant généralement à une rétention pulmonaire et/ou à une potentielle translocation de ces dernières, du système respiratoire vers certains organes-cibles secondaires, via la circulation systémique ou encore l'épithélium olfactif, comme l'ont déjà suggéré plusieurs auteurs (61,63). Toutefois, de par les difficultés encore rencontrées à ce jour pour détecter *in vivo* les PUF dans les tissus/matrices biologiques, des incertitudes demeurent sur la distribution/persistance des PUF dans l'organisme et les principaux organes-cibles les plus vascularisés (*i.e.*, poumons, cœur, cerveau, foie, reins). La stratégie appliquée dans ce projet de recherche, associant des observations histologiques par microscopie

photonique et microscopie électronique, des dosages de métaux, et l'étude des profils d'expression génique des métallothionéines (*i.e.*, *Mt1*, 2, 3 et 4) et de certains cytochromes P450 (*i.e.*, *Cyp1a1*, *Cyp1b1*), dans les différents organes-cibles a suggéré leur exposition aux PUF et/ou à des composés désorbés à partir de ces dernières, avec des distribution/persistance pulmonaires et cérébrales plus marquées, celles du cœur, du foie, et des reins étant plus limitées, ne reflétant qu'un passage des PUF lors de leur distribution systémique voire de leur élimination. Cette translocation systémique des PUF a déjà été décrite dans la littérature mais principalement suite à l'extrapolation de résultats obtenus *in vivo* à partir d'exposition de modèles murins à des nanomatériaux (*e.g.*, dioxyde de titane : TiO₂, oxyde de zinc :ZnO) ou certaines PUF spécifiques (*i.e.*, Diesel Exhaust Particles, DEP), à des doses et par des modes d'administration le plus souvent peu représentatifs des expositions environnementales (63–65). Quelques études épidémiologiques suggèrent également la distribution des PUF aux organes périphériques par l'apparition d'effets cardio-vasculaires et métaboliques notamment, sans pour autant apporter un concept de preuves contrairement à ce qu'apporte notre projet (102,133,134). Les données obtenues dans ce dernier soulignent ainsi l'importance de considérer non seulement les effets pulmonaires mais aussi les effets cardiovasculaires et cérébraux, voire hépatiques et rénaux, dans l'évaluation des risques sanitaires dans des situations d'exposition aux PUF urbaines.

Le troisième enjeu majeur de ce projet a alors été d'étudier la toxicodynamique des PUF en nous intéressant aux mécanismes physiopathologiques de toxicité de ces dernières, encore peu élucidés à l'heure actuelle. Le POTOX conséquent des PUF étant susceptible de conduire à une génération accrue d'ERO au sein des matrices biologiques et à terme à l'apparition d'un déséquilibre redox, la contribution de ce dernier au développement d'un stress oxydant s'est alors posée. Il a ainsi été démontré qu'une activation significative de la voie de signalisation NRF2 dans les poumons, le cœur, le cerveau, le foie, et, dans une moindre mesure, les reins, accompagnée d'une activation efficace des défenses antioxydantes, enzymatiques (*i.e.*, SOD, GPx, GR, CAT, NQO1, GST) et non enzymatiques (*i.e.*, glutathion), permettait le maintien de l'homéostasie redox dans ces organes-cibles, en limitant l'apparition de lésions oxydatives (*i.e.*, 8-OHdG, 8-OHG, 4-HNE, Prot-CO, AGE, et AOPP). Dans une étude réalisée *in vivo*, Zheng et ses collaborateurs (2019) ont cherché à étudier les effets, au cours du temps, de l'exposition aiguë de souris à des DEP sur les défenses antioxydantes pulmonaires. Il a ainsi été démontré qu'il existait une cinétique antioxydante, débutant tout d'abord par une génération intense d'ERO suivie d'une activation des enzymes antioxydantes, puis l'activité des enzymes antioxydantes diminuent progressivement parallèlement à la concentration en ERO (165). Bien qu'utilisant un modèle murin différent et des doses de particules plus élevées, cette étude est intéressante de par son aspect chronologique, montrant que l'état redox n'est pas figé dans le temps mais bien évolutif vis-à-vis de l'environnement cellulaire. De manière intéressante, dans le projet « PARTICLES » précédemment réalisé au sein du laboratoire dans lequel des souris A/J étaient exposées durant un mois à 10 µg de PM_{2,5}/instillation à raison de 3 instillations intranasales par semaine, bien que les défenses antioxydantes étaient indéniablement activées, des lésions oxydatives étaient générées de manière très importante, ne permettant le rétablissement d'un état d'homéostasie redox que plusieurs mois après cessation des expositions particulières (367). Dans notre projet, il est ainsi possible de supposer que les expositions réitérées induisent une génération d'ERO qui se maintient à un niveau toujours très important après 3 mois d'exposition, conduisant à une transcription accrue des gènes codant pour les enzymes antioxydantes et cytoprotectrices, qui est maintenue durant l'ensemble de la durée du protocole d'exposition et qui empêche l'apparition de lésions oxydatives. De même, en dépit de l'observation de lésions inflammatoires au niveau pulmonaire, l'activation significative de la voie de signalisation NFκB est restée relativement modérée, principalement au niveau cardiaque et cérébrale, et a provoqué la sécrétion de différents profils de cytokines, aux fonctions diverses, en fonction des organes-cibles. Bien que ces effets oxydants et pro-inflammatoires aient déjà été observés au niveau pulmonaire et cardiaque dans d'autres études *in vivo*, ces altérations le sont beaucoup moins dans d'autres organes tel que le cerveau.

Ici, l'activation de la voie de signalisation NFκB couplée à la sécrétion accrue de diverses chimiokines impliquées dans le recrutement des neutrophiles et des lymphocytes lors de la réponse immunitaire laisse suggérer un profil neuro-inflammatoire modéré chez les souris exposées aux PUF bien qu'aucune conséquence lésionnelle n'ait été observée. Ainsi, l'approche multi-organe employée dans ce projet de recherche a permis de mettre en évidence des marqueurs de stress oxydant et d'inflammation dans l'ensemble des organes cibles, à des niveaux d'expression variable.

Afin d'objectiver cet effet multi-organe au niveau sanguin, il a été jugé pertinent d'effectuer une analyse des miARN circulants, ces derniers pouvant constituer de bons marqueurs d'exposition et/ou d'effets des PUF du fait de leur stabilité et accessibilité. Cette analyse a révélé la dérégulation d'un nombre conséquent de miARN circulants à la suite des expositions particulières, dont les plus dérégulés pourraient potentiellement servir de biomarqueurs d'exposition aux PUF. Dans un futur proche, la validation de ces derniers chez l'Homme pourrait constituer un axe de recherche prometteur, permettant l'identification des populations les plus exposées aux PUF et donc les plus à risque vis-à-vis des conséquences sanitaires délétères qui leur sont associées. L'évaluation de la contribution de chaque organe à ce pool de miARN circulants n'a cependant permis d'identifier qu'un nombre limité de miARN pouvant potentiellement servir de biomarqueurs d'effets de la fraction particulaire ultrafine de la pollution atmosphérique. À ce jour, il est donc encore difficile d'établir une relation précise entre la dérégulation des miARN circulants et la contribution spécifique de chaque organes-cible, ne permettant pas de les utiliser comme biomarqueur d'effets.

Bien que des marqueurs de stress oxydant et d'inflammation aient été identifiés dans l'ensemble des organes cibles, seules les analyses histologiques réalisées sur les biopsies pulmonaires ont révélé la présence de conséquences lésionnelles délétères. C'est pourquoi, pour la suite de ce projet de recherche, le choix a été fait de se focaliser uniquement sur cet organe. Des approches transcriptomiques ont alors été initiées uniquement dans les poumons afin de rechercher l'activation de voies de signalisation impliquées dans le remodelage tissulaire, les maladies ischémiques, les maladies métaboliques voire la cancérogenèse. En plus de révéler l'activation de voie de signalisation en relation avec les réponses oxydante et inflammatoire, qui constituent les mécanismes centraux de toxicité des PUF, celles-ci ont révélé l'activation de voies en relation avec des mécanismes de toxicité plus originaux tels que la dysfonction mitochondriale, la mort cellulaire et le remodelage tissulaire. Le métabolisme mitochondrial étant décrit comme étroitement lié à l'apparition de pathologies à composante oxydative et/ou inflammatoire, et les poumons ayant été rapporté comme le principal organe-cible des PUF, une étude de la fonction mitochondriale pulmonaire a été réalisée. Celle-ci a révélé, de manière très originale, une altération de la respiration mitochondriale et de la dynamique mitochondriale (*i.e.*, DRP1, FIS1 versus MFN1, MFN2, OPA1) en dépit d'une phosphorylation oxydative (*i.e.*, OXPHOS) et d'une masse mitochondriale accrue (*i.e.*, TOMM20, VDAC), laissant suggérer une altération de l'activité des mitochondries. Les observations réalisées par microscopie électronique ont par ailleurs conforté cette hypothèse en montrant l'existence d'altérations de la morphologie mitochondriale telles que la présence de crêtes déformées voire absentes et/ou une rupture de la membrane mitochondriale externe, susceptibles d'altérer le fonctionnement physiologique de ces dernières. Ces altérations morphologiques sont en adéquation avec ce qui a déjà pu être observé dans des études expérimentales *in vitro* et *in vivo* respectivement réalisées sur des cellules épithéliales alvéolaires humaines A549 et sur des chiens Beagle exposés aux PUF mais aussi dans une étude épidémiologique menée patients sains ou en déclin cognitifs décédés de manière subite (204,219,220). Afin d'éliminer ces mitochondries dysfonctionnelles et de maintenir un équilibre entre leur biogénèse et leur élimination, les mitochondries semblent renforcer leur flux mitophagique (*i.e.*, PINK1, PARKIN). De manière intéressante, ce type d'observations avaient déjà été réalisées *in vitro* au sein de notre laboratoire sur des cellules bronchiques épithéliales humaines (*i.e.*, BEAS-2B) exposées de façon répétée à

des PUF urbaines (210). Néanmoins, contrairement à nos résultats, une augmentation de la respiration mitochondriale était observée. Cette différence pourrait s'expliquer par la durée d'exposition qui n'était que de 72 heures dans cette étude et donc par les lésions mitochondriales qui étaient moindres. Par ailleurs, l'altération des mitochondries est susceptible d'induire une augmentation de la production d'ERO et donc, de participer à l'initiation et/ou à l'entretien du stress oxydant ambiant.

La mitochondrie étant un organite connu pour jouer un rôle dans l'induction de certaines formes de mort cellulaire, il a été jugé pertinent de s'intéresser à leur induction au sein des tissus pulmonaires, d'autant plus que les données transcriptomiques ont révélé l'activation de voies de signalisation liées à ces processus et plus particulièrement à l'apoptose. Bien que ces analyses n'aient pas montré l'induction d'une morte cellulaire massive au terme des 3 mois d'exposition, celles-ci ont révélé l'apparition d'une TEM et d'un remodelage des tissus pulmonaires (*i.e.*, ZEB1, ZO1, N-cadhérine, E-cadhérine, Intégrine β 1, Smad2, Vimentine, α -SMA, Cathepsine k), résultants d'un déséquilibre entre les mécanismes de mort cellulaire d'une part, et ceux de prolifération et de différenciation des cellules inflammatoires d'autre part. Ces résultats sont en concordance avec plusieurs études réalisées par d'autres auteurs telles que celle de Thevenot et équipe (2013) qui ont démontré l'activation de ces phénomènes de TEM par une réduction de l'expression de l'E-cadhérine et une augmentation de l' α -SMA dans des modèles *in vitro* exposés pendant 24h à une faible dose de PUF contenant du dichlorobenzène (*i.e.*, BEAS-2B et des cellules épithéliales pulmonaires néonatales murines). Ces auteurs ont, par ailleurs, validé ces résultats *in vivo* chez des souris C57BL/6 exposées pendant 7 jours à ce même aérosol (303). De la même manière, Lee et son équipe (2022) ont démontré que l'exposition sub-chronique de souris Balb/c préalablement sensibilisées par un acarien à des PUF diesel pendant 8 semaines induisait un épaississement du collagène sous épithélial, ainsi qu'une diminution de l'expression des marqueurs épithéliaux (*e.g.*, E-cadhérine, ZO-1) couplée à une augmentation de l'expression des marqueurs mésenchymateux (*e.g.*, N-cadhérine, α -SMA) (304). Bien qu'utilisant des PUF diesel plus riches en composés nocifs, ces études confortent les résultats obtenus dans le cadre de notre projet en démontrant la capacité de ces particules à induire une TEM et un remodelage des tissus pulmonaires même à la suite d'une exposition aiguë ou subaiguë. Notre étude, réalisée sur le plus long terme, démontre par ailleurs que des PUF urbaines potentiellement moins nocives que des PUF diesel sont tout de même capables d'induire une TEM et un remodelage des voies respiratoires sur le plus long terme. Dans un contexte d'inflammation chronique persistante, l'induction de ces processus qui ont la particularité d'être impliqués à la fois dans la régénération/cicatrisation tissulaire et dans la progression tumorale, amène à s'interroger sur l'évolution phénotypique des cellules de l'épithélium pulmonaire après cessation des expositions particulières. C'est pourquoi une validation fonctionnelle des voies de signalisation identifiées au terme des 3 mois d'exposition (*i.e.*, altérations mitochondriales, mort cellulaire, remodelage tissulaire) sera également réalisée sur les échantillons de poumons prélevés 3 mois après cessation des expositions. Cet axe de recherche prometteur devrait pouvoir nous indiquer si l'arrêt des expositions permet le rétablissement d'un état d'homéostasie ou si, au contraire, des conséquences lésionnelles, cancéreuses ou non, sont apparues.

Globalement, les résultats de ce projet de recherche apportent indéniablement des données novatrices sur la distribution/persistance des PUF dans les principaux organes-cibles (*i.e.*, poumons, le cœur, le cerveau le foie et les reins) et soulignent l'importance de considérer non seulement les effets pulmonaires mais aussi les effets cardiovasculaires et cérébraux, voire hépatiques et rénaux, dans l'évaluation des risques sanitaires dans des situations d'exposition aux PUF (tableau 41 et figure 99). De plus, l'étude des mécanismes d'action cellulaires et moléculaires impliqués dans la toxicité des PUF a permis d'apprécier les réponses oxydantes et inflammatoires, différentes en fonction des organes, et de les hiérarchiser. L'identification de nouveaux marqueurs biologiques d'exposition (*i.e.*, miARN circulants), certes encore à valider dans le cadre d'une étude

en population humaine, pourrait constituer un outil très novateur de détermination du niveau d'exposition des populations. De plus amples investigations s'avèrent encore nécessaires afin de pouvoir s'en servir comme biomarqueurs d'effet pertinents afin de mieux déterminer, par ce reflet systémique, l'interaction entre les PUF et les différents organes-cibles étudiés dans le cadre de ce projet de recherche. A terme, l'ensemble des résultats pourrait contribuer à proposer des marqueurs biologiques d'exposition et d'effets des PUF, précoces, détectables non seulement au niveau des organes-cibles mais aussi au niveau systémique.

En outre, les informations issues de ce projet de recherche pourraient être transmises aux différents organismes régionaux et nationaux en charge de la pollution atmosphérique, d'origine industrielle ou environnementale, et de ses effets sur la santé humaine, aux instances chargées de la réglementation concernant de telles émissions, ainsi qu'aux industriels afin de contribuer à une meilleure prise de décision quant à la réduction des émissions des polluants majoritaires ou les plus préoccupants du point de vue de leur toxicité voire leur pathogénicité. Par ailleurs, ces données pourront contribuer à la réactualisation des informations nécessaires à la prise de décision quant à l'évaluation et à la gestion des risques inhérents à ce type de pollution. Enfin, la méthodologie développée et validée tout au long de ce projet de recherche pourrait être appliquée à d'autres sources de pollution particulaire voire à d'autres types de polluants environnementaux.

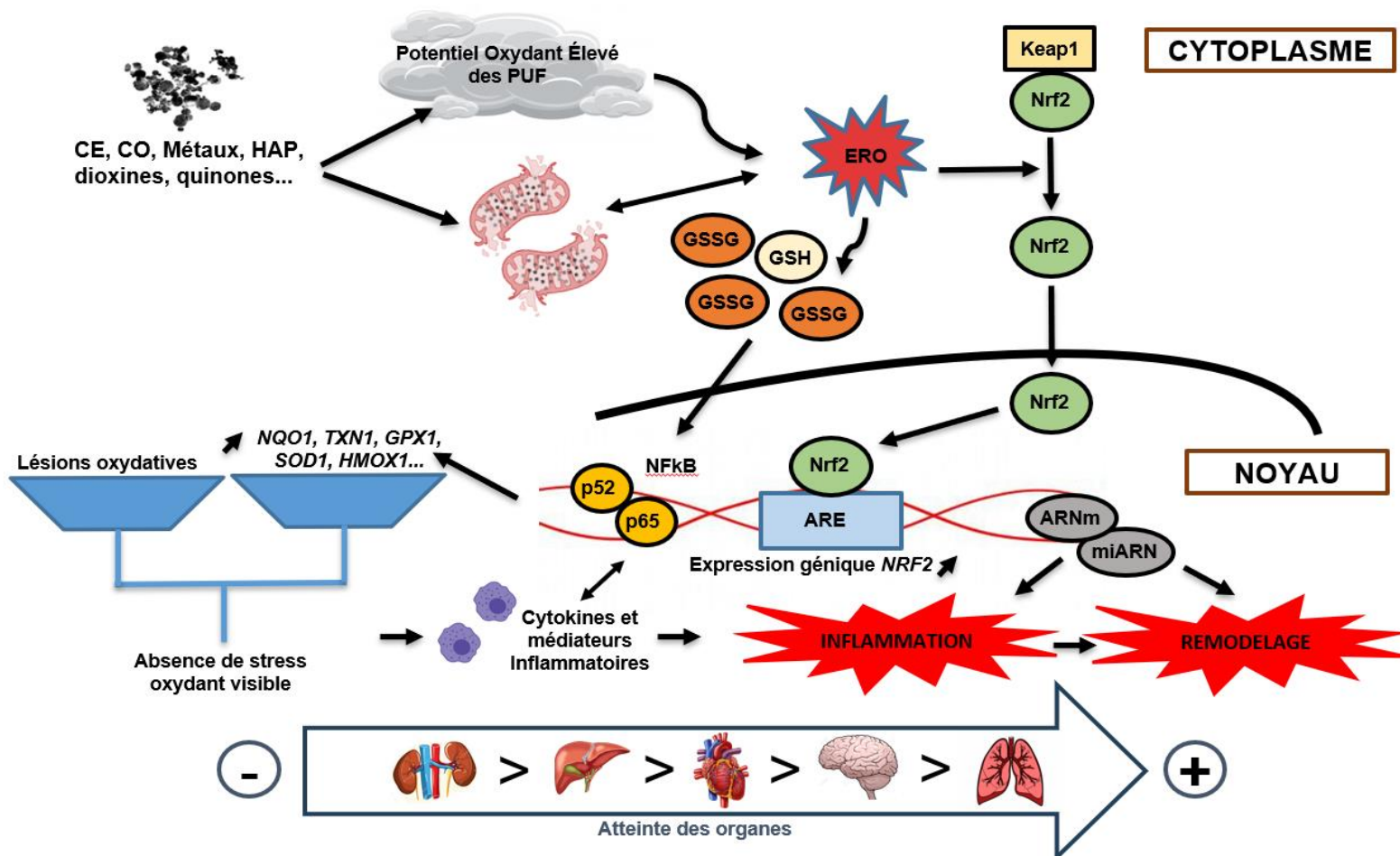


Figure 99 : Schéma récapitulatif des résultats obtenus dans le cadre de ce projet de recherche.

Conclusion et Perspectives

Ce projet de thèse portant sur l'étude multi-organe des mécanismes physiopathologiques impliqués dans la toxicité des PUF chez un modèle murin, avait pour objectifs principaux d'apporter de éléments novateurs sur la toxicocinétique (*i.e.*, distribution/persistance) et la toxicodynamique (*i.e.*, mécanismes physiopathologiques, voies de signalisation associées) de PUF prélevées en milieu urbain, d'une part, et les effets organo-spécifiques des PUF et l'utilisation des miARN circulants comme indicateurs d'exposition chronique et/ou cumulées aux PUF chez un modèle murin, d'autre part.

Les résultats obtenus jusqu'à présent suggèrent que les PUF riches en composés hautement nocifs (*e.g.*, métaux, HAP, dioxines, endotoxines) prélevées dans la zone urbaine de Lille sont dotées d'un potentiel oxydant intrinsèque élevé conduisant à une génération intense d'ERO au sein des différents organes cibles. Afin de lutter contre ces dernières, l'organisme active des défenses antioxydantes qui réussissent à rétablir un état d'homéostasie redox tout en limitant l'apparition de lésions oxydatives dans l'ensemble des organes, mais qui ne parviennent cependant pas éviter l'initiation d'une réponse pro-inflammatoire dans les poumons, le cœur et le cerveau. En parallèle, les modifications morphologiques mitochondriales induites par l'internalisation des PUF au sein de ces dernières, est à l'origine d'une altération fonctionnelle et dynamique des mitochondries qui sont alors susceptibles d'entretenir les réponses oxydantes et inflammatoire au niveau pulmonaire. Dans ce contexte d'inflammation chronique persistante, un déséquilibre entre les mécanismes de mort cellulaire d'une part, et ceux de prolifération et de différenciation des cellules inflammatoires d'autre part est à l'origine d'un remodelage des tissus pulmonaires impliquant les mécanismes de transition épithélio-mésenchymateuse. L'induction de ces processus, impliqués à la fois dans la régénération des tissus et la progression tumorale, suscitent de nouvelles interrogations quant à l'évolution lésionnelle pulmonaire qu'il sera nécessaire d'éclaircir dans la suite de nos analyses. Bien que les miARN identifiés dans ce projet ne puissent pas, à ce jour, être utilisés comme biomarqueurs de ces effets organo-spécifiques, un certain nombre d'entre eux, significativement dérégulés au niveau circulant pourraient être employés comme biomarqueurs d'exposition aux PUF des populations humaines. En plus d'apporter de nouvelles connaissances sur les PUF urbaines, polluants particuliers encore relativement peu étudiés à ce jour, l'originalité de ce projet a porté sur le choix d'opter pour une approche multi-organe bien que la cible principale des PUF soit pulmonaire.

Bien que ces approches *in vivo* ne puissent pas se substituer aux approches épidémiologiques, elles contribuent indéniablement à établir une relation de causalité entre l'exposition aux PUF et la survenue d'effets délétères pour la santé humaine. À l'heure actuelle, les études portant sur le rôle des PUF dans la survenue de pathologies respiratoires, cardio-vasculaires ou encore neurologiques demeurent encore très parcellaires, soulignant l'importance de réaliser de nouvelles recherches à ce sujet. Ici, la réalisation de ce projet a permis d'accroître les connaissances en termes de mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la toxicité des PUF, au sein de différents organes-cibles richement vascularisés, et par conséquent directement exposés aux PUF lors de leur phase de translocation et de distribution systémique.

Afin de compléter ces résultats prometteurs, des investigations complémentaires pourraient être réalisées afin d'élucider plus en avant les mécanismes d'action sous-jacents. Dans un premier temps, des marquages immunohistochimiques de protéines impliquées dans la transition épithélio-mésenchymateuse et le remodelage tissulaire pourraient être investigués au sein de tissus pulmonaires dans le but de conforter les résultats obtenus par Western blot. Puis, dans un second temps, les voies de signalisation dérégulées au terme des 3 mois d'exposition, liées à la fois à ce remodelage tissulaire mais aussi au stress oxydant, à l'inflammation, à la fonction mitochondriale et à la mort cellulaire, pourraient ensuite être étudiés sur les tissus pulmonaires prélevés chez les souris sacrifiées 24h après une période de recouvrement d'une durée de 3 mois afin de visualiser si cette période sans expositions serait suffisante pour rétablir un état d'homéostasie tissulaire ou

non. Par ailleurs, des observations histologiques pourraient être réalisées sur ces mêmes échantillons afin de voir si, au contraire, ce temps fut suffisant pour laisser des lésions apparaître.

D'autre part, une analyse combinée des profils d'expression des miARN et des ARNm pulmonaires devrait permettre d'identifier de façon plus précise les voies de signalisation dérégulées à la suite des expositions aux PUF. Certaines de ces voies pourront ensuite être validées par transfection de pré-miARN et antago-miARN des miARN sélectionnés dans une lignée de cellules pulmonaires murines, afin d'induire respectivement une augmentation ou une inhibition de leur expression et d'effectuer une validation fonctionnelle de ces voies. De plus, les miARN circulants identifiés comme étant les plus significativement dérégulés, susceptibles de servir de biomarqueurs d'exposition aux PUF, pourront, à terme, être validés en population générale dans le cadre de futurs projets menés par l'équipe. D'autres mécanismes de toxicité tels que la génotoxicité ou les modifications épigénétiques (*i.e.*, méthylation de l'ADN, modifications des histones) pourront, par ailleurs, être étudiés dans l'ensemble des organes cibles.

Enfin, les résultats prometteurs de ce projet suggérant la translocation cérébrale des PUF et l'initiation de réponses oxydative et inflammatoire au sein de cet organe, des investigations plus poussées au niveau cérébrales pourraient être envisagées. Elles pourraient apporter des éléments très importants sur l'impact des facteurs environnementaux et plus spécifiquement des PUF sur le développement de pathologies neurodégénératives telles que la maladie de Parkinson.

Bibliographie

1. Qualité de l'air ambiant et santé [Internet]. [cité 31 juill 2023]. Disponible sur: [https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/ambient-\(outdoor\)-air-quality-and-health](https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/ambient-(outdoor)-air-quality-and-health)
2. OCDE. Panorama de la santé 2021: Les indicateurs de l'OCDE [Internet]. OECD; 2021 [cité 2 juin 2023]. (Panorama de la santé). Disponible sur: https://www.oecd-ilibrary.org/social-issues-migration-health/panorama-de-la-sante-2021_fea50730-fr
3. Air quality in Europe 2022 — European Environment Agency [Internet]. [cité 19 juin 2023]. Disponible sur: <https://www.eea.europa.eu/publications/air-quality-in-europe-2022/>
4. Santé Publique France. Pollution de l'air ambiant : nouvelles estimations de son impact sur la santé des Français [Internet]. [cité 9 févr 2022]. Disponible sur: <https://www.santepubliquefrance.fr/presse/2021/pollution-de-l-air-ambiant-nouvelles-estimations-de-son-impact-sur-la-sante-des-francais>
5. Health Effects Institute. 2020. State of Global Air 2020. Special Report. Boston, MA:Health Effects Institute. 2020.
6. Preunkert S, McConnell JR, Hoffmann H, Legrand M, Wilson AI, Eckhardt S, et al. Lead and Antimony in Basal Ice From Col du Dome (French Alps) Dated With Radiocarbon: A Record of Pollution During Antiquity. *Geophys Res Lett*. 16 mai 2019;46(9):4953-61.
7. Citepa. Citepa. 2023 [cité 19 juin 2023]. Rapport de référence sur les émissions de gaz à effet de serre et de polluants atmosphériques en France. Disponible sur: <https://www.citepa.org/fr/secten/>
8. Atkinson CE, Kesic MJ, Hernandez ML. Ozone in the Development of Pediatric Asthma and Atopic Disease. *Immunol Allergy Clin North Am*. 1 nov 2022;42(4):701-13.
9. Niu Y, Zhou Y, Chen R, Yin P, Meng X, Wang W, et al. Long-term exposure to ozone and cardiovascular mortality in China: a nationwide cohort study. *Lancet Planet Health*. 1 juin 2022;6(6):e496-503.
10. Wiley.com [Internet]. [cité 16 juin 2021]. Atmospheric Chemistry and Physics: From Air Pollution to Climate Change, 3rd Edition | Wiley. Disponible sur: <https://www.wiley.com/en-us/Atmospheric+Chemistry+and+Physics%3A+From+Air+Pollution+to+Climate+Change%2C+3rd+Edition-p-9781118947401>
11. Particules ultrafines : nouvelle étude sur l'influence du secteur aérien | ATMO GrandEst [Internet]. [cité 29 août 2023]. Disponible sur: <https://www.atmo-grandest.eu/actualite/particules-ultrafines-nouvelle-etude-sur-linfluence-du-secteur-aerien>
12. Rapport de projet Particules spéciation chimique et particules ultrafines-1.pdf [Internet]. [cité 17 oct 2022]. Disponible sur: <http://www.atmo-grandest.eu/sites/prod/files/2022-01/Rapport%20de%20projet%20Particules%20%20speciation%20chimique%20et%20particules%20ultrafines-1.pdf>
13. Whitby KT, Kittelson DB, Cantrell BK, Barsic NJ, Bolan DF. Aerosol size distributions and concentrations measured during the General Motors proving grounds sulfate study. In: WASHINGTON DC, USA, AMERICAN CHEM SOC [Internet]. American Chemical Society; 1976 [cité 19 juin 2023]. Disponible sur: <http://www.scopus.com/inward/record.url?scp=0016886954&partnerID=8YFLogxK>
14. Falcon-Rodriguez CI, Osornio-Vargas AR, Sada-Ovalle I, Segura-Medina P. Aeroparticles, Composition, and Lung Diseases. *Front Immunol* [Internet]. 20 janv 2016;7. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4719080/>

15. Rorat A, Lanier C, Cuny D, Deram A, Canivet L. Exposition aux particules atmosphériques : lien entre caractérisation physico-chimique et impact sur la santé.
16. Rodríguez S, Querol X, Alastuey A, Kallos G, Kakaliagou O. Saharan dust contributions to PM10 and TSP levels in Southern and Eastern Spain. *Atmos Environ.* mai 2001;35(14):2433-47.
17. Zauli Sajani S, Miglio R, Bonasoni P, Cristofanelli P, Marinoni A, Sartini C, et al. Saharan dust and daily mortality in Emilia-Romagna (Italy). *Occup Environ Med.* juin 2011;68(6):446-51.
18. Perez L, Tobias A, Querol X, Künzli N, Pey J, Alastuey A, et al. Coarse particles from Saharan dust and daily mortality. *Epidemiol Camb Mass.* nov 2008;19(6):800-7.
19. Nastos PT, Kampanis NA, Giaouzaki KN, Matzarakis A. Environmental impacts on human health during a Saharan dust episode at Crete Island, Greece. *Meteorol Z.* 1 oct 2011;20(5):517-29.
20. De Boeck Supérieur [Internet]. 2022 [cité 19 janv 2023]. Chimie de l'environnement. Disponible sur: <https://www.deboecksuperieur.com/ouvrage/9782804192174-chimie-de-l-environnement>
21. Inventaire des émissions de polluants atmosphériques en France au titre de la convention sur la pollution atmosphérique transfrontalière à longue distance et de la directive européenne concernant la réduction des émissions nationales de certains polluants atmosphériques.
22. Chen G, Canonaco F, Tobler A, Aas W, Alastuey A, Allan J, et al. European aerosol phenomenology – 8: Harmonised source apportionment of organic aerosol using 22 Year-long ACSM/AMS datasets. *Environ Int.* 1 août 2022;166:107325.
23. Morawska L, Ristovski Z, Jayaratne ER, Keogh DU, Ling X. Ambient nano and ultrafine particles from motor vehicle emissions: Characteristics, ambient processing and implications on human exposure. *Atmos Environ.* nov 2008;42(35):8113-38.
24. Li N, Georas S, Alexis N, Fritz P, Xia T, Williams MA, et al. A Work Group Report on Ultrafine Particles (AAAAI) Why Ambient Ultrafine and Engineered Nanoparticles Should Receive Special Attention for Possible Adverse Health Outcomes in Humans. *J Allergy Clin Immunol.* août 2016;138(2):386-96.
25. Contini D, Vecchi R, Viana M. Carbonaceous Aerosols in the Atmosphere. *Atmosphere.* mai 2018;9(5):181.
26. Putaud JP, Raes F, Van Dingenen R, Brüggemann E, Facchini MC, Decesari S, et al. A European aerosol phenomenology—2: chemical characteristics of particulate matter at kerbside, urban, rural and background sites in Europe. *Atmos Environ.* 1 mai 2004;38(16):2579-95.
27. Mo Z, Wang Z, Mao G, Pan X, Wu L, Xu P, et al. Characterization and health risk assessment of PM2.5-bound polycyclic aromatic hydrocarbons in 5 urban cities of Zhejiang Province, China. *Sci Rep.* déc 2019;9(1):7296.
28. Zhang Y, Zhu X, Slanina S, Shao M, Zeng L, Hu M, et al. Aerosol pollution in some Chinese cities (IUPAC Technical Report). *Pure Appl Chem.* 1 janv 2004;76(6):1227-39.
29. Mikrut M, Regiel-Futyra A, Samek L, Macyk W, Stochel G, van Eldik R. Generation of hydroxyl radicals and singlet oxygen by particulate matter and its inorganic components. *Environ Pollut.* 1 juill 2018;238:638-46.
30. Donaldson K, Brown DM, Mitchell C, Dineva M, Beswick PH, Gilmour P, et al. Free radical activity of PM10: iron-mediated generation of hydroxyl radicals. *Environ Health Perspect.* sept 1997;105(Suppl 5):1285-9.

31. Shi T, Duffin R, Borm PJA, Li H, Weishaupt C, Schins RPF. Hydroxyl-radical-dependent DNA damage by ambient particulate matter from contrasting sampling locations. *Environ Res.* mai 2006;101(1):18-24.
32. Valko M, Jomova K, Rhodes CJ, Kuča K, Musílek K. Redox- and non-redox-metal-induced formation of free radicals and their role in human disease. *Arch Toxicol.* 1 janv 2016;90(1):1-37.
33. He M, Ichinose T, Yoshida S, Nishikawa M, Sun G, Shibamoto T. Role of iron and oxidative stress in the exacerbation of allergic inflammation in murine lungs caused by urban particulate matter <2.5 µm and desert dust. *J Appl Toxicol.* 2019;39(6):855-67.
34. Knaapen et al. Soluble metals as well as the insoluble particle fraction are involved in cellular DNA damage induced by particulate matter. *Mol Cell Biochem.* 2002;234-235:317-26.
35. Lippmann M, Chen LC, Gordon T, Ito K, Thurston GD. National Particle Component Toxicity (NPACT) Initiative: integrated epidemiologic and toxicologic studies of the health effects of particulate matter components. *Res Rep Health Eff Inst.* oct 2013;(177):5-13.
36. Bell ML, HEI Health Review Committee. Assessment of the health impacts of particulate matter characteristics. *Res Rep Health Eff Inst.* janv 2012;(161):5-38.
37. Zhou J, Ito K, Lall R, Lippmann M, Thurston G. Time-series analysis of mortality effects of fine particulate matter components in Detroit and Seattle. *Environ Health Perspect.* avr 2011;119(4):461-6.
38. Cakmak S, Dales R, Kauri LM, Mahmud M, Van Ryswyk K, Vanos J, et al. Metal composition of fine particulate air pollution and acute changes in cardiorespiratory physiology. *Environ Pollut Barking Essex* 1987. juin 2014;189:208-14.
39. PM2.5 chemical composition at a rural background site in Central Europe, including correlation and air mass back trajectory analysis.htm.
40. Švédová B, Kucbel M, Raclavská H, Růžičková J, Raclavský K, Sassmanová V. Water-soluble ions in dust particles depending on meteorological conditions in urban environment. *J Environ Manage.* mai 2019;237:322-31.
41. Sillanpää M, Hillamo R, Saarikoski S, Frey A, Pennanen A, Makkonen U, et al. Chemical composition and mass closure of particulate matter at six urban sites in Europe. *Atmos Environ.* 2006;40:212-23.
42. Zhang Y, Yang L, Bie S, Zhao T, Huang Q, Li J, et al. Chemical compositions and the impact of sea salt in atmospheric PM1 and PM2.5 in the coastal area. *Atmospheric Res.* mars 2021;250:105323.
43. Alharbi B, Shareef MM, Husain T. Study of chemical characteristics of particulate matter concentrations in Riyadh, Saudi Arabia. *Atmospheric Pollut Res.* janv 2015;6(1):88-98.
44. Paulauskas R, Striūgas N, Sadeckas M, Sommersacher P, Retschitzegger S, Kienzl N. Online determination of potassium and sodium release behaviour during single particle biomass combustion by FES and ICP-MS. *Sci Total Environ.* déc 2020;746:141162.
45. Glikson M, Rutherford S, Simpson RW, Mitchell CA, Yago A. Microscopic and submicron components of atmospheric particulate matter during high asthma periods in Brisbane, Queensland, Australia. *Atmos Environ.* mars 1995;29(4):549-62.
46. Lembo R, Landoni G, Cianfanelli L, Frontera A. Air pollutants and sars-cov-2 in 33 European countries. *Acta Bio Medica Atenei Parm.* 2021;92(1):e2021166.
47. Article R221-1 - Code de l'environnement - Légifrance [Internet]. [cité 4 sept 2023]. Disponible sur: https://www.legifrance.gouv.fr/codes/article_lc/LEGIARTI000006835543/2007-10-17

48. OECD. Panorama de la santé 2017 Les indicateurs de l'OCDE: Les indicateurs de l'OCDE. OECD Publishing; 2017. 226 p.
49. OCDE. Environment at a Glance Indicators [Internet]. 2022. Disponible sur: <https://www.oecd-ilibrary.org/content/publication/ac4b8b89-en>
50. Crystal RG, Randell SH, Engelhardt JF, Voynow J, Sunday ME. Airway Epithelial Cells. *Proc Am Thorac Soc.* 15 sept 2008;5(7):772-7.
51. Voynow JA, Rubin BK. Mucins, Mucus, and Sputum. *Chest.* 1 févr 2009;135(2):505-12.
52. Adam D, Perotin JM, Lebargy F, Birembaut P, Deslée G, Coraux C. Régénération de l'épithélium des voies aériennes. *Rev Mal Respir.* avr 2014;31(4):300-11.
53. Coraux C, Hajj R, Lesimple P, Puchelle E. Réparation et régénération de l'épithélium respiratoire. *médecine/sciences.* déc 2005;21(12):1063-9.
54. Li P, Xin J, Wang Y, Wang S, Li G, Pan X, et al. The acute effects of fine particles on respiratory mortality and morbidity in Beijing, 2004-2009. *Environ Sci Pollut Res Int.* sept 2013;20(9):6433-44.
55. Hervé-Bazin B. Les nanoparticules : un enjeu majeur pour la santé au travail ? EDP Sciences; 2012. 704 p.
56. Ostiguy C, Roberge B, Woods C, Soucy B. Les nanoparticules de synthèse - Connaissances actuelles sur les risques et les mesures de prévention en SST - 2e édition.
57. Flood-Garibay JA, Angulo-Molina A, Méndez-Rojas MÁ. Particulate matter and ultrafine particles in urban air pollution and their effect on the nervous system. *Environ Sci Process Impacts.* 26 avr 2023;25(4):704-26.
58. Oberdörster G, Oberdörster E, Oberdörster J. Nanotoxicology: An Emerging Discipline Evolving from Studies of Ultrafine Particles. *Environ Health Perspect.* juill 2005;113(7):823-39.
59. Oberdörster G, Ferin J, Lehnert BE. Correlation between particle size, in vivo particle persistence, and lung injury. *Environ Health Perspect.* oct 1994;102(Suppl 5):173-9.
60. Lippmann M, Yeates DB, Albert RE. Deposition, retention, and clearance of inhaled particles. *Br J Ind Med.* nov 1980;37(4):337-62.
61. Elder A, Gelein R, Silva V, Feikert T, Opanashuk L, Carter J, et al. Translocation of Inhaled Ultrafine Manganese Oxide Particles to the Central Nervous System. *Environ Health Perspect.* août 2006;114(8):1172-8.
62. Oberdörster G, Sharp Z, Atudorei V, Elder A, Gelein R, Kreyling W, et al. Translocation of Inhaled Ultrafine Particles to the Brain. *Inhal Toxicol.* 1 janv 2004;16(6-7):437-45.
63. Furuyama A, Kanno S, Kobayashi T, Hirano S. Extrapulmonary translocation of intratracheally instilled fine and ultrafine particles via direct and alveolar macrophage-associated routes. *Arch Toxicol.* 1 mai 2009;83(5):429-37.
64. Stone V, Miller MR, Clift MJD, Elder A, Mills NL, Møller P, et al. Nanomaterials Versus Ambient Ultrafine Particles: An Opportunity to Exchange Toxicology Knowledge. *Environ Health Perspect.* 125(10):106002.
65. Steiner S, Bisig C, Petri-Fink A, Rothen-Rutishauser B. Diesel exhaust: current knowledge of adverse effects and underlying cellular mechanisms. *Arch Toxicol.* 1 juill 2016;90(7):1541-53.

66. Costa LG, Cole TB, Coburn J, Chang YC, Dao K, Roqué PJ. Neurotoxicity of traffic-related air pollution. *NeuroToxicology*. 1 mars 2017;59:133-9.
67. Gorr MW, Youtz DJ, Eichenseer CM, Smith KE, Nelin TD, Cormet-Boyaka E, et al. In vitro particulate matter exposure causes direct and lung-mediated indirect effects on cardiomyocyte function. *Am J Physiol - Heart Circ Physiol*. 1 juill 2015;309(1):H53-62.
68. Gosens I, Cassee FR, Zanella M, Manodori L, Brunelli A, Costa AL, et al. Organ burden and pulmonary toxicity of nano-sized copper (II) oxide particles after short-term inhalation exposure. *Nanotoxicology*. oct 2016;10(8):1084-95.
69. Oberdörster G, Elder A, Rinderknecht A. Nanoparticles and the Brain: Cause for Concern? *J Nanosci Nanotechnol*. août 2009;9(8):4996-5007.
70. Chapman E, Haby MM, Illanes E, Sanchez-Viamonte J, Elias V, Reveiz L. Risk factors for chronic kidney disease of non-traditional causes: a systematic review. *Rev Panam Salud Pública*. 14 mars 2019;43:e35.
71. Elder AC, Gelein R, Finkelstein JN, Cox C, Oberdörster G. Pulmonary inflammatory response to inhaled ultrafine particles is modified by age, ozone exposure, and bacterial toxin. *Inhal Toxicol*. 2000;12 Suppl 4:227-46.
72. Oberdörster G, Finkelstein JN, Johnston C, Gelein R, Cox C, Baggs R, et al. Acute pulmonary effects of ultrafine particles in rats and mice. *Res Rep Health Eff Inst*. août 2000;(96):5-74; disc. 75-86.
73. Wu Y, Guo Y, Song H, Liu W, Yang Y, Liu Y, et al. Oxygen content determines the bio-reactivity and toxicity profiles of carbon black particles. *Ecotoxicol Environ Saf*. 15 avr 2018;150:207-14.
74. Upadhyay S, Stoeger T, George L, Schladweiler MC, Kodavanti U, Ganguly K, et al. Ultrafine carbon particle mediated cardiovascular impairment of aged spontaneously hypertensive rats. *Part Fibre Toxicol*. 17 sept 2014;11(1):36.
75. Noël A, Xiao R, Perveen Z, Zaman HM, Rouse RL, Paulsen DB, et al. Incomplete lung recovery following sub-acute inhalation of combustion-derived ultrafine particles in mice. *Part Fibre Toxicol*. 24 févr 2016;13:10.
76. Alessandrini F, Beck-Speier I, Krappmann D, Weichenmeier I, Takenaka S, Karg E, et al. Role of Oxidative Stress in Ultrafine Particle-induced Exacerbation of Allergic Lung Inflammation. *Am J Respir Crit Care Med*. juin 2009;179(11):984-91.
77. Alessandrini F, Schulz H, Takenaka S, Lentner B, Karg E, Behrendt H, et al. Effects of ultrafine carbon particle inhalation on allergic inflammation of the lung. *J Allergy Clin Immunol*. 1 avr 2006;117(4):824-30.
78. Ganguly K, Upadhyay S, Irmeler M, Takenaka S, Pukelsheim K, Beckers J, et al. Impaired resolution of inflammatory response in the lungs of JF1/Msf mice following carbon nanoparticle instillation. *Respir Res*. 2011;12(1):94.
79. Li G, Cao Y, Sun Y, Xu R, Zheng Z, Song H. Ultrafine particles in the airway aggravated experimental lung injury through impairment in Treg function. *Biochem Biophys Res Commun*. 9 sept 2016;478(1):494-500.
80. Kleinman MT, Sioutas C, Froines JR, Fanning E, Hamade A, Mendez L, et al. Inhalation of Concentrated Ambient Particulate Matter Near a Heavily Trafficked Road Stimulates Antigen-Induced Airway Responses in Mice. *Inhal Toxicol*. 1 janv 2007;19(sup1):117-26.

81. Li N, Harkema JR, Lewandowski RP, Wang M, Bramble LA, Gookin GR, et al. Ambient ultrafine particles provide a strong adjuvant effect in the secondary immune response: implication for traffic-related asthma flares. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* sept 2010;299(3):L374-383.
82. Laumbach RJ, Kipen HM, Ko S, Kelly-McNeil K, Cepeda C, Pettit A, et al. A controlled trial of acute effects of human exposure to traffic particles on pulmonary oxidative stress and heart rate variability. *Part Fibre Toxicol.* 1 nov 2014;11:45.
83. Schaumann F, Frömke C, Dijkstra D, Alessandrini F, Windt H, Karg E, et al. Effects of ultrafine particles on the allergic inflammation in the lung of asthmatics: results of a double-blinded randomized cross-over clinical pilot study. *Part Fibre Toxicol.* 10 sept 2014;11:39.
84. Chen J, Zhao Q, Liu BB, Wang J, Xu HB, Zhang Y, et al. [Airway oxidative stress and inflammation markers in chronic obstructive pulmonary diseases(COPD) patients are linked with exposure to traffic-related air pollution: a panel study]. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi.* mai 2016;50(5):411-7.
85. Chen X, Sun Y, Zhao Q, Song X, Huang W, Han Y, et al. Design and characterization of human exposure to generated sulfate and soot particles in a pilot chamber study. *J Air Waste Manag Assoc.* 2 avr 2016;66(4):366-76.
86. Han Y, Zhu T, Guan T, Zhu Y, Liu J, Ji Y, et al. Association between size-segregated particles in ambient air and acute respiratory inflammation. *Sci Total Environ.* 15 sept 2016;565:412-9.
87. Vlaanderen JJ, Janssen NA, Hoek G, Keski-Rahkonen P, Barupal DK, Cassee FR, et al. The impact of ambient air pollution on the human blood metabolome. *Environ Res.* 1 juill 2017;156:341-8.
88. Park HY, Gilbreath S, Barakatt E. Respiratory outcomes of ultrafine particulate matter (UFPM) as a surrogate measure of near-roadway exposures among bicyclists. *Environ Health.* 8 févr 2017;16(1):6.
89. Samoli E, Andersen ZJ, Katsouyanni K, Hennig F, Kuhlbusch TAJ, Bellander T, et al. Exposure to ultrafine particles and respiratory hospitalisations in five European cities. *Eur Respir J.* sept 2016;48(3):674-82.
90. 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. *Environ Int.* 1 mars 2016;88:44-52.
91. Liu Q, Babadjouni R, Radwanski R, Cheng H, Patel A, Hodis DM, et al. Stroke Damage Is Exacerbated by Nano-Size Particulate Matter in a Mouse Model. *Block ML, éditeur. PLOS ONE.* 12 avr 2016;11(4):e0153376.
92. Araujo JA, Barajas B, Kleinman M, Wang X, Bennett BJ, Gong KW, et al. Ambient Particulate Pollutants in the Ultrafine Range Promote Early Atherosclerosis and Systemic Oxidative Stress. *Circ Res.* 3 mars 2008;102(5):589.
93. Keebaugh AJ, Sioutas C, Pakbin P, Schauer JJ, Mendez LB, Kleinman MT. Is atherosclerotic disease associated with organic components of ambient fine particles? *Sci Total Environ.* 15 nov 2015;533:69-75.
94. Li R, Mittelstein D, Kam W, Pakbin P, Du Y, Tintut Y, et al. Atmospheric ultrafine particles promote vascular calcification via the NF- κ B signaling pathway. *Am J Physiol - Cell Physiol.* 15 févr 2013;304(4):C362-9.
95. Khandoga A, Stampfl A, Takenaka S, Schulz H, Radykewicz R, Kreyling W, et al. Ultrafine Particles Exert Prothrombotic but Not Inflammatory Effects on the Hepatic Microcirculation in Healthy Mice In Vivo. *Circulation.* 16 mars 2004;109(10):1320-5.

96. Elder A, Couderc JP, Gelein R, Eberly S, Cox C, Xia X, et al. Effects of on-road highway aerosol exposures on autonomic responses in aged, spontaneously hypertensive rats. *Inhal Toxicol.* 1 janv 2007;19(1):1-12.
97. Elder A, Gelein R, Finkelstein J, Phipps R, Frampton M, Utell M, et al. On-road exposure to highway aerosols. 2. Exposures of aged, compromised rats. *Inhal Toxicol.* 2004;16(SUPPL. 1):41-53.
98. Harder V, Gilmour PS, Lentner B, Karg E, Takenaka S, Ziesenis A, et al. Cardiovascular Responses in Unrestrained WKY Rats to Inhaled Ultrafine Carbon Particles. *Inhal Toxicol.* 1 janv 2005;17(1):29-42.
99. Kunovac et al. Environmental Inhalants and Cardiovascular Disease: Cardiovascular adaptations to particle inhalation exposure: molecular mechanisms of the toxicology [Internet]. [cité 6 juin 2023]. Disponible sur: <https://www-ncbi-nlm-nih-gov.ressources-electroniques.univ-lille.fr/pmc/articles/PMC7473925/?report=reader>
100. Tang et al. The short- and long-term associations of particulate matter with inflammation and blood coagulation markers: A meta-analysis [Internet]. [cité 6 juin 2023]. Disponible sur: <https://www-ncbi-nlm-nih-gov.ressources-electroniques.univ-lille.fr/pmc/articles/PMC7687019/>
101. Steenhof M, Janssen NAH, Strak M, Hoek G, Gosens I, Mudway IS, et al. Air pollution exposure affects circulating white blood cell counts in healthy subjects: the role of particle composition, oxidative potential and gaseous pollutants – the RAPTES project. *Inhal Toxicol.* 1 févr 2014;26(3):141-65.
102. Croft DP, Cameron SJ, Morrell CN, Lowenstein CJ, Ling F, Zareba W, et al. Associations between ambient wood smoke and other particulate pollutants and biomarkers of systemic inflammation, coagulation and thrombosis in cardiac patients. *Environ Res.* avr 2017;154:352-61.
103. Bind MA, VanderWeele TJ, Schwartz JD, Coull BA. Quantile causal mediation analysis allowing longitudinal data. *Stat Med.* 20 nov 2017;36(26):4182-95.
104. Lane KJ, Levy JI, Scammell MK, Peters JL, Patton AP, Reisner E, et al. Association of modeled long-term personal exposure to ultrafine particles with inflammatory and coagulation biomarkers. *Environ Int.* 2016;92-93:173-82.
105. Aguilera I, Dratva J, Caviezel S, Burdet L, de Groot E, Ducret-Stich RE, et al. Particulate Matter and Subclinical Atherosclerosis: Associations between Different Particle Sizes and Sources with Carotid Intima-Media Thickness in the SAPALDIA Study. *Environ Health Perspect.* nov 2016;124(11):1700-6.
106. Wang et al. Particulate air pollution and circulating biomarkers among type 2 diabetic mellitus patients: the roles of particle size and time windows of exposure - ScienceDirect [Internet]. [cité 6 juin 2023]. Disponible sur: <https://www-sciencedirect-com.ressources-electroniques.univ-lille.fr/science/article/pii/S0013935115001048>
107. Chung M, Wang DD, Rizzo AM, Gachette D, Delnord M, Parambi R, et al. Association of PNC, BC, and PM2.5 Measured at a Central Monitoring Site with Blood Pressure in a Predominantly Near Highway Population. *Int J Environ Res Public Health.* mars 2015;12(3):2765-80.
108. Rich DQ, Peters A, Schneider A, Zareba W, Breitner S, Oakes D, et al. Ambient and Controlled Particle Exposures as Triggers for Acute ECG Changes. *Res Rep Health Eff Inst.* mai 2016;(186):5-75.
109. Endes S, Schaffner E, Caviezel S, Dratva J, Stolz D, Schindler C, et al. Is physical activity a modifier of the association between air pollution and arterial stiffness in older adults: The SAPALDIA cohort study. *Int J Hyg Environ Health.* 1 août 2017;220(6):1030-8.
110. Liu L, Breitner S, Schneider A, Cyrus J, Brüske I, Franck U, et al. Size-fractioned particulate air pollution and cardiovascular emergency room visits in Beijing, China. *Environ Res.* 1 févr 2013;121:52-63.

111. Holland NA, Fraiser CR, Sloan RC, Devlin RB, Brown DA, Wingard CJ. Ultrafine Particulate Matter Increases Cardiac Ischemia/Reperfusion Injury via Mitochondrial Permeability Transition Pore. *Cardiovasc Toxicol.* oct 2017;17(4):441-50.
112. Khandoga A, Stoeger T, Khandoga AG, Bihari P, Karg E, Ettehadieh D, et al. Platelet adhesion and fibrinogen deposition in murine microvessels upon inhalation of nanosized carbon particles. *J Thromb Haemost.* 2010;8(7):1632-40.
113. Campbell A, Oldham M, Becaria A, Bondy SC, Meacher D, Sioutas C, et al. Particulate Matter in Polluted Air May Increase Biomarkers of Inflammation in Mouse Brain. *NeuroToxicology.* 1 janv 2005;26(1):133-40.
114. Campbell A, Araujo JA, Li H, Sioutas C, Kleinman M. Particulate matter induced enhancement of inflammatory markers in the brains of apolipoprotein E knockout mice. *J Nanosci Nanotechnol.* août 2009;9(8):5099-104.
115. Kleinman MT, Araujo J, Nel A, Sioutas C, Campbell A, Cong PQ, et al. Inhaled ultrafine particulate matter affects CNS inflammatory processes and may act via MAP kinase signaling pathways. *Toxicol Lett.* 5 mai 2008;178(2):127-30.
116. Allen JL, Oberdorster G, Morris-Schafer K, Wong C, Klocke C, Sobolewski M, et al. Developmental Neurotoxicity of Inhaled Ambient Ultrafine Particle Air Pollution: Parallels with Neuropathological and Behavioral Features of Autism and Other Neurodevelopmental Disorders. *Neurotoxicology.* mars 2017;59:140-54.
117. Calderón-Garcidueñas L, González-Maciél A, Reynoso-Robles R, Hammond J, Kulesza R, Lachmann I, et al. Quadruple abnormal protein aggregates in brainstem pathology and exogenous metal-rich magnetic nanoparticles (and engineered Ti-rich nanorods). The substantia nigrae is a very early target in young urbanites and the gastrointestinal tract a key brainstem portal. *Environ Res.* 1 déc 2020;191:110139.
118. Klocke C, Allen JL, Sobolewski M, Mayer-Pröschel M, Blum JL, Lauterstein D, et al. Neuropathological Consequences of Gestational Exposure to Concentrated Ambient Fine and Ultrafine Particles in the Mouse. *Toxicol Sci.* avr 2017;156(2):492-508.
119. Onoda A, Takeda K, Umezawa M. Dose-dependent induction of astrocyte activation and reactive astrogliosis in mouse brain following maternal exposure to carbon black nanoparticle. *Part Fibre Toxicol.* 2 févr 2017;14(1):4.
120. Allen JL, Conrad K, Oberdörster G, Johnston CJ, Sleezer B, Cory-Slechta DA. Developmental exposure to concentrated ambient particles and preference for immediate reward in mice. *Environ Health Perspect.* janv 2013;121(1):32-8.
121. Allen JL, Liu X, Pelkowski S, Palmer B, Conrad K, Oberdörster G, et al. Early postnatal exposure to ultrafine particulate matter air pollution: persistent ventriculomegaly, neurochemical disruption, and glial activation preferentially in male mice. *Environ Health Perspect.* sept 2014;122(9):939-45.
122. Allen JL, Liu X, Weston D, Prince L, Oberdörster G, Finkelstein JN, et al. Developmental exposure to concentrated ambient ultrafine particulate matter air pollution in mice results in persistent and sex-dependent behavioral neurotoxicity and glial activation. *Toxicol Sci Off J Soc Toxicol.* juill 2014;140(1):160-78.
123. Wu AH, Fruin S, Larson TV, Tseng CC, Wu J, Yang J, et al. Association between airport-related ultrafine particles and risk of malignant brain cancer: a multiethnic cohort study. *Cancer Res.* 15 août 2021;81(16):4360-9.

124. Weichenthal S, Olaniyan T, Christidis T, Lavigne E, Hatzopoulou M, Van Ryswyk K, et al. Within-city Spatial Variations in Ambient Ultrafine Particle Concentrations and Incident Brain Tumors in Adults. *Epidemiol Camb Mass*. mars 2020;31(2):177-83.
125. Sunyer J, Esnaola M, Alvarez-Pedrerol M, Forns J, Rivas I, López-Vicente M, et al. Association between traffic-related air pollution in schools and cognitive development in primary school children: a prospective cohort study. *PLoS Med*. mars 2015;12(3):e1001792.
126. Forns J, Dadvand P, Esnaola M, Alvarez-Pedrerol M, López-Vicente M, Garcia-Esteban R, et al. Longitudinal association between air pollution exposure at school and cognitive development in school children over a period of 3.5 years. *Environ Res*. 1 nov 2017;159:416-21.
127. Onoda A, Takeda K, Umezawa M. Dysregulation of major functional genes in frontal cortex by maternal exposure to carbon black nanoparticle is not ameliorated by ascorbic acid pretreatment. *Sci Total Environ*. 1 sept 2018;634:1126-35.
128. Laurent O, Hu J, Li L, Kleeman MJ, Bartell SM, Cockburn M, et al. Low birth weight and air pollution in California: Which sources and components drive the risk? *Environ Int*. 2016;92-93:471-7.
129. Wu J, Laurent O, Li L, Hu J, Kleeman M. Adverse Reproductive Health Outcomes and Exposure to Gaseous and Particulate-Matter Air Pollution in Pregnant Women. *Res Rep Health Eff Inst*. 1 juill 2016;2016:188.
130. Johnson NM, Hoffmann AR, Behlen JC, Lau C, Pendleton D, Harvey N, et al. Air pollution and children's health—a review of adverse effects associated with prenatal exposure from fine to ultrafine particulate matter. *Environ Health Prev Med*. 2021;26:72.
131. Zhong F, Xu M, Schelli K, Rutowski J, Holmén BA, Zhu J. Comparing the impact of ultrafine particles from petrodiesel and biodiesel combustion to bacterial metabolism by targeted HPLC-MS/MS metabolic profiling. *Ecotoxicol Environ Saf*. 1 août 2017;142:164-70.
132. Bai L, Chen H, Hatzopoulou M, Jerrett M, Kwong JC, Burnett RT, et al. Exposure to Ambient Ultrafine Particles and Nitrogen Dioxide and Incident Hypertension and Diabetes. *Epidemiology*. mai 2018;29(3):323.
133. Peters A, Hampel R, Cyrus J, Breitner S, Geruschkat U, Kraus U, et al. Elevated particle number concentrations induce immediate changes in heart rate variability: a panel study in individuals with impaired glucose metabolism or diabetes. *Part Fibre Toxicol*. 30 mars 2015;12(1):7.
134. Sun Y, Song X, Han Y, Ji Y, Gao S, Shang Y, et al. Size-fractioned ultrafine particles and black carbon associated with autonomic dysfunction in subjects with diabetes or impaired glucose tolerance in Shanghai, China. *Part Fibre Toxicol*. 25 mars 2015;12(1):8.
135. Vora R, Zareba W, Utell MJ, Pietropaoli AP, Chalupa D, Little EL, et al. Inhalation of ultrafine carbon particles alters heart rate and heart rate variability in people with type 2 diabetes. *Part Fibre Toxicol*. 16 juill 2014;11(1):31.
136. Kumar S, Verma MK, Srivastava AK. Ultrafine particles in urban ambient air and their health perspectives. *Rev Environ Health*. 1 nov 2013;28(2-3):117-28.
137. Monarca S, Crebelli R, Feretti D, Zanardini A, Fuselli S, Filini L, et al. Mutagens and carcinogens in size-classified air particulates of a Northern Italian town. *Sci Total Environ*. 20 oct 1997;205(2):137-44.
138. Weichenthal S, Lavigne E, Valois MF, Hatzopoulou M, Van Ryswyk K, Shekarrizfard M, et al. Spatial variations in ambient ultrafine particle concentrations and the risk of incident prostate cancer: A case-control study. *Environ Res*. 1 juill 2017;156:374-80.

139. Chang CY, You R, Armstrong D, Bandi A, Cheng YT, Burkhardt PM, et al. Chronic exposure to carbon black ultrafine particles reprograms macrophage metabolism and accelerates lung cancer. *Sci Adv.* 2022;8(46):eabq0615.
140. Gao R, Sang N. Quasi-ultrafine particles promote cell metastasis via HMGB1-mediated cancer cell adhesion. *Environ Pollut.* 1 janv 2020;256:113390.
141. Wardoyo AYP, Juswono UP, Noor JAE. A study of the correlation between ultrafine particle emissions in motorcycle smoke and mice erythrocyte damages. *Exp Toxicol Pathol.* 2 oct 2017;69(8):649-55.
142. Milkovic L, Cipak Gasparovic A, Cindric M, Mouthuy PA, Zarkovic N. Short Overview of ROS as Cell Function Regulators and Their Implications in Therapy Concepts. *Cells.* 30 juill 2019;8(8):793.
143. Garçon G, Dagher Z, Zerimech F, Ledoux F, Courcot D, Aboukais A, et al. Dunkerque City air pollution particulate matter-induced cytotoxicity, oxidative stress and inflammation in human epithelial lung cells (L132) in culture. *Toxicol In Vitro.* 1 juin 2006;20(4):519-28.
144. Dahl JU, Gray MJ, Jakob U. Protein Quality Control under Oxidative Stress Conditions. *J Mol Biol.* 10 avr 2015;427(7):1549-63.
145. Boutten A, Goven D, Artaud-Macari É, Bonay M. La voie Nrf2 en pathologie respiratoire. *MS Médecine Sci* ISSN Pap 0767-0974 ISSN Numér 1958-5381 2011 Vol 27 N° 11 P 966-972 [Internet]. 2011 [cité 26 juin 2020]; Disponible sur: <http://www.ipubli.inserm.fr/handle/10608/7659>
146. Migdal C, Serres M. Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant. *médecine/sciences.* 1 avr 2011;27(4):405-12.
147. (2) (PDF) Dietary polyphénols : extraction, antioxidant activity and metal ion interaction [Internet]. [cité 20 janv 2023]. Disponible sur: https://www.researchgate.net/publication/278645043_Dietary_polyphenols_extraction_antioxidant_activity_and_metal_ion_interaction
148. Ahmed SMU, Luo L, Namani A, Wang XJ, Tang X. Nrf2 signaling pathway: Pivotal roles in inflammation. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Basis Dis.* févr 2017;1863(2):585-97.
149. Buendia I, Michalska P, Navarro E, Gameiro I, Egea J, León R. Nrf2–ARE pathway: An emerging target against oxidative stress and neuroinflammation in neurodegenerative diseases. *Pharmacol Ther.* janv 2016;157:84-104.
150. Kensler TW, Wakabayashi N, Biswal S. Cell Survival Responses to Environmental Stresses Via the Keap1-Nrf2-ARE Pathway. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1 févr 2007;47(1):89-116.
151. Bayo Jimenez MT, Frenis K, Hahad O, Steven S, Cohen G, Cuadrado A, et al. Protective actions of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (NRF2) and downstream pathways against environmental stressors. *Free Radic Biol Med.* juill 2022;187:72-91.
152. Forman HJ, Zhang H, Rinna A. Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Mol Aspects Med.* avr 2009;30(1-2):1-12.
153. Biswas SK, Rahman I. Environmental toxicity, redox signaling and lung inflammation: the role of glutathione. *Mol Aspects Med.* avr 2009;30(1-2):60-76.
154. Ballatori N, Krance SM, Notenboom S, Shi S, Tieu K, Hammond CL. Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases. *Biol Chem.* mars 2009;390(3):191-214.
155. Baeza A, Marano F. Pollution atmosphérique et maladies respiratoires - Un rôle central pour le stress oxydant. *médecine/sciences.* 1 mai 2007;23(5):497-501.

156. Xiao GG, Wang M, Li N, Loo JA, Nel AE. Use of Proteomics to Demonstrate a Hierarchical Oxidative Stress Response to Diesel Exhaust Particle Chemicals in a Macrophage Cell Line. *J Biol Chem.* déc 2003;278(50):50781-90.
157. Pardo M, Shafer MM, Rudich A, Schauer JJ, Rudich Y. Single Exposure to near Roadway Particulate Matter Leads to Confined Inflammatory and Defense Responses: Possible Role of Metals. *Environ Sci Technol.* 21 juill 2015;49(14):8777-85.
158. Shuster-Meiseles T, Shafer MM, Heo J, Pardo M, Antkiewicz DS, Schauer JJ, et al. ROS-generating/ARE-activating capacity of metals in roadway particulate matter deposited in urban environment. *Environ Res.* avr 2016;146:252-62.
159. Tacu I, Kokalari I, Abollino O, Albrecht C, Malandrino M, Ferretti AM, et al. Mechanistic Insights into the Role of Iron, Copper, and Carbonaceous Component on the Oxidative Potential of Ultrafine Particulate Matter. *Chem Res Toxicol.* 15 mars 2021;34(3):767-79.
160. Sun KA, Li Y, Meliton AY, Woods PS, Kimmig LM, Cetin-Atalay R, et al. Endogenous itaconate is not required for particulate matter-induced NRF2 expression or inflammatory response. *eLife.* 7 avr 2020;9:e54877.
161. Jin L, Ni J, Tao Y, Weng X, Zhu Y, Yan J, et al. N-acetylcysteine attenuates PM2.5-induced apoptosis by ROS-mediated Nrf2 pathway in human embryonic stem cells. *Sci Total Environ.* mai 2019;666:713-20.
162. Li N, Alam J, Venkatesan MI, Eiguren-Fernandez A, Schmitz D, Stefano ED, et al. Nrf2 Is a Key Transcription Factor That Regulates Antioxidant Defense in Macrophages and Epithelial Cells: Protecting against the Proinflammatory and Oxidizing Effects of Diesel Exhaust Chemicals. *J Immunol.* 1 sept 2004;173(5):3467-81.
163. Zhao QJ, Liu XJ, Zeng XL, Bao HR. [Effect of PM2.5 on the level of nuclear factor erythroid-2 related factor 2 in chronic obstructive pulmonary disease mice and its relationship with oxidative stress]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 26 juill 2016;96(28):2241-5.
164. Deng X, Rui W, Zhang F, Ding W. PM2.5 induces Nrf2-mediated defense mechanisms against oxidative stress by activating PIK3/AKT signaling pathway in human lung alveolar epithelial A549 cells. *Cell Biol Toxicol.* 1 juin 2013;29(3):143-57.
165. Zheng X, Wang G, Bin P, Meng T, Niu Y, Yang M, et al. Time-course effects of antioxidants and phase II enzymes on diesel exhaust particles-induced oxidative damage in the mouse lung. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1 mars 2019;366:25-34.
166. Juarez Facio AT, Yon J, Corbière C, Rogez-Florent T, Castilla C, Lavanant H, et al. Toxicological impact of organic ultrafine particles (UFPs) in human bronchial epithelial BEAS-2B cells at air-liquid interface. *Toxicol In Vitro.* 1 févr 2022;78:105258.
167. Chan JK, Charrier JG, Kodani SD, Vogel CF, Kado SY, Anderson DS, et al. Combustion-derived flame generated ultrafine soot generates reactive oxygen species and activates Nrf2 antioxidants differently in neonatal and adult rat lungs. *Part Fibre Toxicol.* 1 août 2013;10:34.
168. Pardo M, Qiu X, Zimmermann R, Rudich Y. Particulate Matter Toxicity Is Nrf2 and Mitochondria Dependent: The Roles of Metals and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Chem Res Toxicol.* 18 mai 2020;33(5):1110-20.
169. Harmon AC, Hebert VY, Cormier SA, Subramanian B, Reed JR, Backes WL, et al. Particulate matter containing environmentally persistent free radicals induces AhR-dependent cytokine and reactive oxygen species production in human bronchial epithelial cells. *PLOS ONE.* 11 oct 2018;13(10):e0205412.

170. Hammond J, Maher BA, Gonet T, Bautista F, Allsop D. Oxidative Stress, Cytotoxic and Inflammatory Effects of Urban Ultrafine Road-Deposited Dust from the UK and Mexico in Human Epithelial Lung (Calu-3) Cells. *Antioxidants*. 14 sept 2022;11(9):1814.
171. Li Y, Yang M, Meng T, Niu Y, Dai Y, Zhang L, et al. Oxidative stress induced by ultrafine carbon black particles can elicit apoptosis in vivo and vitro. *Sci Total Environ*. 20 mars 2020;709:135802.
172. Shang Y, Xue W, Kong J, Chen Y, Qiu X, An X, et al. Ultrafine black carbon caused mitochondrial oxidative stress, mitochondrial dysfunction and mitophagy in SH-SY5Y cells. *Sci Total Environ*. 20 mars 2022;813:151899.
173. Aghasafari P, George U, Pidaparti R. A review of inflammatory mechanism in airway diseases. *Inflamm Res*. 1 janv 2019;68(1):59-74.
174. Yunna C, Mengru H, Lei W, Weidong C. Macrophage M1/M2 polarization. *Eur J Pharmacol*. 15 juin 2020;877:173090.
175. Mege JL, Capo C. La polarisation des macrophages, le noeud gordien des infections bactériennes ? *médecine/sciences*. 1 janv 2010;26(1):83-8.
176. Cell Signaling Technology [Internet]. [cité 9 juin 2023]. Mouse Immune Cell Marker Guide. Disponible sur: <https://www.cellsignal.com/pathways/immune-cell-markers-mouse>
177. Mogensen TH. Pathogen Recognition and Inflammatory Signaling in Innate Immune Defenses. *Clin Microbiol Rev*. avr 2009;22(2):240-73.
178. *Histologie_de_l_appareil_respiratoire-_Voies_aeriennes_profondes.pdf* [Internet]. [cité 26 mai 2021]. Disponible sur: https://sofia.medicalistes.fr/spip/IMG/pdf/Histologie_de_l_appareil_respiratoire-_Voies_aeriennes_profondes.pdf
179. Vareille M, Kieninger E, Edwards MR, Regamey N. The airway epithelium: soldier in the fight against respiratory viruses. *Clin Microbiol Rev*. janv 2011;24(1):210-29.
180. Hiemstra PS, McCray PB, Bals R. The innate immune function of airway epithelial cells in inflammatory lung disease. *Eur Respir J*. avr 2015;45(4):1150-62.
181. Whitsett JA, Alenghat T. Respiratory epithelial cells orchestrate pulmonary innate immunity. *Nat Immunol*. 18 déc 2014;16(1):27-35.
182. Jouan Y, Si-Tahar M, Guillon A. Immunité de la muqueuse respiratoire : physiologie et implications en réanimation. *Médecine Intensive Réanimation* [Internet]. 17 nov 2016 [cité 26 mai 2021]; Disponible sur: <http://link.springer.com/10.1007/s13546-016-1245-9>
183. Lobry C, Weil R. Mécanismes régulateurs de la voie NF- κ B dans les lymphocytes T. *médecine/sciences*. oct 2007;23(10):857-61.
184. Liu T, Zhang L, Joo D, Sun SC. NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Transduct Target Ther*. 14 juill 2017;2:17023.
185. Wardyn JD, Ponsford AH, Sanderson CM. Dissecting molecular cross-talk between Nrf2 and NF- κ B response pathways. *Biochem Soc Trans*. 1 août 2015;43(4):621-6.
186. Sivandzade F, Prasad S, Bhalerao A, Cucullo L. NRF2 and NF- κ B interplay in cerebrovascular and neurodegenerative disorders: Molecular mechanisms and possible therapeutic approaches. *Redox Biol*. 28 nov 2018;21:101059.

187. Stéphanie V, Laurent M, Hélène C, Abderrazak Y, Hélène M, Armelle BS. Role of size and composition of traffic and agricultural aerosols in the molecular responses triggered in airway epithelial cells. *Inhal Toxicol.* 1 sept 2011;23(11):627-40.
188. Bhargava A, Shukla A, Bunkar N, Shandilya R, Lodhi L, Kumari R, et al. Exposure to ultrafine particulate matter induces NF- κ B mediated epigenetic modifications. *Environ Pollut.* 1 sept 2019;252:39-50.
189. De Grove KC, Provoost S, Braun H, Blomme EE, Teufelberger AR, Krysko O, et al. IL-33 signalling contributes to pollutant-induced allergic airway inflammation. *Clin Exp Allergy.* 2018;48(12):1665-75.
190. Liu J, Ye X, Ji D, Zhou X, Qiu C, Liu W, et al. Diesel exhaust inhalation exposure induces pulmonary arterial hypertension in mice. *Environ Pollut.* juin 2018;237:747-55.
191. Borm PJA, Höhr D, Steinfartz Y, Zeitträger I, Albrecht C. Chronic Inflammation and Tumor Formation in Rats After Intratracheal Instillation of High Doses of Coal Dusts, Titanium Dioxides, and Quartz. *Inhal Toxicol.* 1 janv 2000;12(sup3):225-31.
192. Saleh Y, Antherieu S, Dusautoir R, Y. Alleman L, Sotty J, De Sousa C, et al. Exposure to Atmospheric Ultrafine Particles Induces Severe Lung Inflammatory Response and Tissue Remodeling in Mice. *Int J Environ Res Public Health* [Internet]. avr 2019 [cité 27 juill 2020];16(7). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6479904/>
193. Lundborg M, Dahlén SE, Johard U, Gerde P, Jarstrand C, Camner P, et al. Aggregates of ultrafine particles impair phagocytosis of microorganisms by human alveolar macrophages. *Environ Res.* 1 févr 2006;100(2):197-204.
194. Nemmar A, Hoet PHM, Vanquickenborne B, Dinsdale D, Thomeer M, Hoylaerts MF, et al. Passage of inhaled particles into the blood circulation in humans. *Circulation.* 29 janv 2002;105(4):411-4.
195. León-Mejía G, Machado MN, Okuro RT, Silva LFO, Telles C, Dias J, et al. Intratracheal instillation of coal and coal fly ash particles in mice induces DNA damage and translocation of metals to extrapulmonary tissues. *Sci Total Environ.* 1 juin 2018;625:589-99.
196. Ferecatu I, Borot MC, Bossard C, Leroux M, Boggetto N, Marano F, et al. Polycyclic aromatic hydrocarbon components contribute to the mitochondria-antiapoptotic effect of fine particulate matter on human bronchial epithelial cells via the aryl hydrocarbon receptor. *Part Fibre Toxicol.* 21 juill 2010;7(1):18.
197. Ku T, Ji X, Zhang Y, Li G, Sang N. PM2.5, SO2 and NO2 co-exposure impairs neurobehavior and induces mitochondrial injuries in the mouse brain. *Chemosphere.* 1 nov 2016;163:27-34.
198. Bassot A, Morio B, Bortoli S, Coumoul X. Le B-A-BA de la mitochondrie, une cheffe d'orchestre intracellulaire très dynamique. *Cah Nutr Diététique.* 1 avr 2023;58(2):142-54.
199. Sauvanet C, Arnauné-Pelloquin L, David C, Belenguer P, Rojo M. Dynamique et morphologie mitochondriales: Acteurs, mécanismes et pertinence fonctionnelle. *médecine/sciences.* oct 2010;26(10):823-9.
200. Geny B, Charles AL, Lejay A, Meyer A. Pollution et stress oxydant. *Rev Fr Allergol.* 1 avr 2019;59(3):174-6.
201. Li et al. Ultrafine particulate pollutants induce oxidative stress and mitochondrial damage. [Internet]. [cité 31 mai 2023]. Disponible sur: <https://ehp.niehs.nih.gov/doi/epdf/10.1289/ehp.6000>
202. Du Z, Chen S, Cui G, Yang Y, Zhang E, Wang Q, et al. Silica nanoparticles induce cardiomyocyte apoptosis via the mitochondrial pathway in rats following intratracheal instillation. *Int J Mol Med.* 1 mars 2019;43(3):1229-40.

203. Maher BA, González-Maciél A, Reynoso-Robles R, Torres-Jardón R, Calderón-Garcidueñas L. Iron-rich air pollution nanoparticles: An unrecognised environmental risk factor for myocardial mitochondrial dysfunction and cardiac oxidative stress. *Environ Res.* sept 2020;188:109816.
204. Calderón-Garcidueñas L, González-Maciél A, Mukherjee PS, Reynoso-Robles R, Pérez-Guillé B, Gayosso-Chávez C, et al. Combustion- and friction-derived magnetic air pollution nanoparticles in human hearts. *Environ Res.* sept 2019;176:108567.
205. González-Maciél A, Reynoso-Robles R, Torres-Jardón R, Mukherjee PS, Calderón-Garcidueñas L. Combustion-Derived Nanoparticles in Key Brain Target Cells and Organelles in Young Urbanites: Culprit Hidden in Plain Sight in Alzheimer's Disease Development. *J Alzheimers Dis.* 1 janv 2017;59(1):189-208.
206. Loxham M, Morgan-Walsh RJ, Cooper MJ, Blume C, Swindle EJ, Dennison PW, et al. The Effects on Bronchial Epithelial Mucociliary Cultures of Coarse, Fine, and Ultrafine Particulate Matter From an Underground Railway Station. *Toxicol Sci.* mai 2015;145(1):98-107.
207. Xia T, Korge P, Weiss JN, Li N, Venkatesen MI, Sioutas C, et al. Quinones and Aromatic Chemical Compounds in Particulate Matter Induce Mitochondrial Dysfunction: Implications for Ultrafine Particle Toxicity. *Environ Health Perspect.* 2004;112(14):1347-58.
208. Mischler SE, Cauda EG, Di Giuseppe M, McWilliams LJ, St. Croix C, Sun M, et al. Differential activation of RAW 264.7 macrophages by size-segregated crystalline silica. *J Occup Med Toxicol.* 15 déc 2016;11(1):57.
209. Daiber A, Kuntic M, Hahad O, Delogu LG, Rohrbach S, Di Lisa F, et al. Effects of air pollution particles (ultrafine and fine particulate matter) on mitochondrial function and oxidative stress – Implications for cardiovascular and neurodegenerative diseases. *Arch Biochem Biophys.* 15 déc 2020;696:108662.
210. Sotty J, Kluza J, De Sousa C, Tardivel M, Anthérieu S, Alleman LY, et al. Mitochondrial alterations triggered by repeated exposure to fine (PM_{2.5-0.18}) and quasi-ultrafine (PM_{0.18}) fractions of ambient particulate matter. *Environ Int.* sept 2020;142:105830.
211. Chu S, Li X, Sun N, He F, Cui Z, Li Y, et al. The combination of ultrafine carbon black and lead provokes cytotoxicity and apoptosis in mice lung fibroblasts through oxidative stress-activated mitochondrial pathways. *Sci Total Environ.* 10 déc 2021;799:149420.
212. Hathaway QA, Majumder N, Goldsmith WT, Kunovac A, Pinti MV, Harkema JR, et al. Transcriptomics of single dose and repeated carbon black and ozone inhalation co-exposure highlight progressive pulmonary mitochondrial dysfunction. *Part Fibre Toxicol.* 15 déc 2021;18(1):44.
213. Bhargava A, Tamrakar S, Aglawe A, Lad H, Srivastava RK, Mishra DK, et al. Ultrafine particulate matter impairs mitochondrial redox homeostasis and activates phosphatidylinositol 3-kinase mediated DNA damage responses in lymphocytes. *Environ Pollut.* 1 mars 2018;234:406-19.
214. 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-Landmark.* 1 janv 2007;12(4):1238-46.
215. Lu CF, Li LZ, Zhou W, Zhao J, Wang YM, Peng SQ. Silica nanoparticles and lead acetate co-exposure triggered synergistic cytotoxicity in A549 cells through potentiation of mitochondria-dependent apoptosis induction. *Environ Toxicol Pharmacol.* 1 juin 2017;52:114-20.
216. Sivakumar B, Kurian GA. Diesel particulate matter exposure deteriorates cardiovascular health and increases the sensitivity of rat heart towards ischemia reperfusion injury via suppressing mitochondrial bioenergetics function. *Chem Biol Interact.* 5 janv 2022;351:109769.

217. Sivakumar B, Kurian GA. Inhalation of PM_{2.5} from diesel exhaust promote impairment of mitochondrial bioenergetics and dysregulate mitochondrial quality in rat heart: implications in isoproterenol-induced myocardial infarction model. *Inhal Toxicol*. 12 mai 2022;34(5-6):107-19.
218. Wang Y, Zhang M, Li Z, Yue J, Xu M, Zhang Y, et al. Fine particulate matter induces mitochondrial dysfunction and oxidative stress in human SH-SY5Y cells. *Chemosphere*. 1 mars 2019;218:577-88.
219. Villarreal-Calderon R, Franco-Lira M, González-Maciél A, Reynoso-Robles R, Harritt L, Pérez-Guillé B, et al. Up-Regulation of mRNA Ventricular PRNP Prion Protein Gene Expression in Air Pollution Highly Exposed Young Urbanites: Endoplasmic Reticulum Stress, Glucose Regulated Protein 78, and Nanosized Particles. *Int J Mol Sci*. 28 nov 2013;14(12):23471-91.
220. Mazzarella G, Lucariello A, Bianco A, Calabrese C, Thanassoulas T, Savarese L, et al. Exposure to Submicron Particles (PM_{1.0}) from Diesel Exhaust and Pollen Allergens of Human Lung Epithelial Cells Induces Morphological Changes of Mitochondria Tonofilaments and Rough Endoplasmic Reticulum. *In Vivo*. 2014;
221. Araújo JE, Jorge S, Santos HM, Chiechi A, Galstyan A, Lodeiro C, et al. Proteomic changes driven by urban pollution suggest particulate matter as a deregulator of energy metabolism, mitochondrial activity, and oxidative pathways in the rat brain. *Sci Total Environ*. 15 oct 2019;687:839-48.
222. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wide-ranging Implications in Tissue Kinetics. *Br J Cancer*. août 1972;26(4):239-57.
223. Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol*. 2007;35(4):495-516.
224. Renahan AG, Booth C, Potten CS. What is apoptosis, and why is it important? *BMJ*. 23 juin 2001;322(7301):1536-8.
225. Fuchs Y, Steller H. Programmed Cell Death in Animal Development and Disease. *Cell*. 11 nov 2011;147(4):742-58.
226. Yuan J, Shaham S, Ledoux S, Ellis HM, Horvitz HR. The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 β -converting enzyme. *Cell*. 19 nov 1993;75(4):641-52.
227. Couzinet A, Hérincs Z, Hueber AO. Régulation de la mort cellulaire programmée : vers une conception plus dynamique. *médecine/sciences*. août 2002;18(8-9):841-52.
228. Seol SYJ & DW, *. The role of mitochondria in apoptosis. *BMB Rep*. 31 janv 2008;41(1):011-22.
229. Ferri KF, Kroemer G. Organelle-specific initiation of cell death pathways. *Nat Cell Biol*. nov 2001;3(11):E255-63.
230. An APAF-1-Cytochrome c Multimeric Complex Is a Functional Apoptosome That Activates Procaspase-9 - ScienceDirect [Internet]. [cité 16 mai 2023]. Disponible sur: <https://www.sciencedirect.com/ressources-electroniques.univ-lille.fr/science/article/pii/S0021925819734620?via%3Dihub>
231. Tummers B, Green DR. Caspase-8: regulating life and death. *Immunol Rev*. 2017;277(1):76-89.
232. Campeau-Péloquin A, Roy S. Culture cellulaire animale et végétale.
233. Maiuri MC, Zalckvar E, Kimchi A, Kroemer G. Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. sept 2007;8(9):741-52.
234. Joffre C, Djavaheri-Mergny M, Patingre S, Giuriato S. L'autophagie : le yin et le yang des cancers. *médecine/sciences*. mars 2017;33(3):328-34.

235. Parzych KR, Klionsky DJ. An Overview of Autophagy: Morphology, Mechanism, and Regulation. *Antioxid Redox Signal*. 20 janv 2014;20(3):460-73.
236. D'Arcy MS. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol Int*. 2019;43(6):582-92.
237. Kono H, Rock KL. How dying cells alert the immune system to danger. *Nat Rev Immunol*. avr 2008;8(4):279-89.
238. Cabon L, Martinez-Torres AC, Susin SA. La mort cellulaire programmée ne manque pas de vocabulaire. *médecine/sciences*. 1 déc 2013;29(12):1117-24.
239. Hitomi J, Christofferson DE, Ng A, Yao J, Degterev A, Xavier RJ, et al. Identification of a molecular signaling network that regulates a cellular necrotic cell death pathway. *Cell*. 26 déc 2008;135(7):1311-23.
240. Dhuriya YK, Sharma D. Necroptosis: a regulated inflammatory mode of cell death. *J Neuroinflammation*. 6 juill 2018;15(1):199.
241. La ferroptose, une nouvelle forme de mort cellulaire applicable au traitement médical des cancers | médecine/sciences [Internet]. [cité 24 mai 2023]. Disponible sur: https://www-medecinesciences-org.ressources-electroniques.univ-lille.fr/en/articles/medsci/full_html/2014/08/medsci2014308-9p779/medsci2014308-9p779.html
242. Lu B, Chen XB, Ying MD, He QJ, Cao J, Yang B. The Role of Ferroptosis in Cancer Development and Treatment Response. *Front Pharmacol* [Internet]. 2018 [cité 24 mai 2023];8. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2017.00992>
243. Lachaier E, Louandre C, Ezzoukhry Z, Godin C, Mazière JC, Chauffert B, et al. La ferroptose, une nouvelle forme de mort cellulaire applicable au traitement médical des cancers. *médecine/sciences*. août 2014;30(8-9):779-83.
244. Andón FT, Fadeel B. Programmed Cell Death: Molecular Mechanisms and Implications for Safety Assessment of Nanomaterials. *Acc Chem Res*. 19 mars 2013;46(3):733-42.
245. De Stefano D, Carnuccio R, Maiuri MC. Nanomaterials Toxicity and Cell Death Modalities. *J Drug Deliv*. 5 déc 2012;2012:e167896.
246. Xia T, Zhu Y, Mu L, Zhang ZF, Liu S. Pulmonary diseases induced by ambient ultrafine and engineered nanoparticles in twenty-first century. *Natl Sci Rev*. 1 déc 2016;3(4):416-29.
247. Peixoto MS, de Oliveira Galvão MF, Batistuzzo de Medeiros SR. Cell death pathways of particulate matter toxicity. *Chemosphere*. 1 déc 2017;188:32-48.
248. Chen Y, Wu Y, Qi Y, Liu S. Cell Death Pathways: The Variable Mechanisms Underlying Fine Particulate Matter-Induced Cytotoxicity. *ACS Nanosci Au*. 19 avr 2023;3(2):130-9.
249. Wang Y, Zhong Y, Liao J, Wang G. PM2.5-related cell death patterns. *Int J Med Sci*. 1 janv 2021;18(4):1024-9.
250. Dou C, Zhang J, Qi C. Cooking oil fume-derived PM2.5 induces apoptosis in A549 cells and MAPK/NF- κ B/STAT1 pathway activation. *Environ Sci Pollut Res*. 1 avr 2018;25(10):9940-8.
251. Yang X, Zhao T, Feng L, Shi Y, Jiang J, Liang S, et al. PM2.5-induced ADRB2 hypermethylation contributed to cardiac dysfunction through cardiomyocytes apoptosis via PI3K/Akt pathway. *Environ Int*. 1 juin 2019;127:601-14.

252. Yin J, Xia W, Li Y, Guo C, Zhang Y, Huang S, et al. COX-2 mediates PM_{2.5}-induced apoptosis and inflammation in vascular endothelial cells. *Am J Transl Res.* 15 sept 2017;9(9):3967-76.
253. Wang Q, Gan X, Li F, Chen Y, Fu W, Zhu X, et al. PM_{2.5} Exposure Induces More Serious Apoptosis of Cardiomyocytes Mediated by Caspase3 through JNK/ P53 Pathway in Hyperlipidemic Rats. *Int J Biol Sci.* 1 janv 2019;15(1):24-33.
254. Dagher Z, Garçon G, Billet S, Gosset P, Ledoux F, Courcot D, et al. Activation of different pathways of apoptosis by air pollution particulate matter (PM_{2.5}) in human epithelial lung cells (L132) in culture. *Toxicology.* 1 août 2006;225(1):12-24.
255. Jin X, Xue B, Zhou Q, Su R, Li Z. Mitochondrial damage mediated by ROS incurs bronchial epithelial cell apoptosis upon ambient PM_{2.5} exposure. *J Toxicol Sci.* 2018;43(2):101-11.
256. Li J, Zhou Q, Yang T, Li Y, Zhang Y, Wang J, et al. SGK1 inhibits PM_{2.5}-induced apoptosis and oxidative stress in human lung alveolar epithelial A549 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 19 févr 2018;496(4):1291-5.
257. Yang X, Feng L, Zhang Y, Hu H, Shi Y, Liang S, et al. Cytotoxicity induced by fine particulate matter (PM_{2.5}) via mitochondria-mediated apoptosis pathway in human cardiomyocytes. *Ecotoxicol Environ Saf.* 15 oct 2018;161:198-207.
258. Cao J, Qin G, Shi R, Bai F, Yang G, Zhang M, et al. Overproduction of reactive oxygen species and activation of MAPKs are involved in apoptosis induced by PM_{2.5} in rat cardiac H9c2 cells. *J Appl Toxicol.* 2016;36(4):609-17.
259. Wang W, Deng Z, Feng Y, Liao F, Zhou F, Feng S, et al. PM_{2.5} induced apoptosis in endothelial cell through the activation of the p53-bax-caspase pathway. *Chemosphere.* 1 juin 2017;177:135-43.
260. Liu J, Liang S, Du Z, Zhang J, Sun B, Zhao T, et al. PM_{2.5} aggravates the lipid accumulation, mitochondrial damage and apoptosis in macrophage foam cells. *Environ Pollut.* 1 juin 2019;249:482-90.
261. Chen M, Li B, Sang N. Particulate matter (PM_{2.5}) exposure season-dependently induces neuronal apoptosis and synaptic injuries. *J Environ Sci.* 1 avr 2017;54:336-45.
262. Zhou T, Zhong Y, Hu Y, Sun C, Wang Y, Wang G. PM_{2.5} downregulates miR-194-3p and accelerates apoptosis in cigarette-inflamed bronchial epithelium by targeting death-associated protein kinase 1. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.* 1 août 2018;13:2339-49.
263. Zhu XM, Wang Q, Xing WW, Long MH, Fu WL, Xia WR, et al. PM_{2.5} induces autophagy-mediated cell death via NOS2 signaling in human bronchial epithelium cells. *Int J Biol Sci.* 5 avr 2018;14(5):557-64.
264. Xu X, Wang H, Liu S, Xing C, Liu Y, Aodengqimuge, et al. TP53-dependent autophagy links the ATR-CHEK1 axis activation to proinflammatory VEGFA production in human bronchial epithelial cells exposed to fine particulate matter (PM_{2.5}). *Autophagy.* 2 oct 2016;12(10):1832-48.
265. Wang Y, Lin Z, Huang H, He H, Yang L, Chen T, et al. AMPK is required for PM_{2.5}-induced autophagy in human lung epithelial A549 cells. 2015;
266. Deng X, Feng N, Zheng M, Ye X, Lin H, Yu X, et al. PM_{2.5} exposure-induced autophagy is mediated by lncRNA loc146880 which also promotes the migration and invasion of lung cancer cells. *Biochim Biophys Acta BBA - Gen Subj.* 1 févr 2017;1861(2):112-25.
267. Deng X, Zhang F, Rui W, Long F, Wang L, Feng Z, et al. PM_{2.5}-induced oxidative stress triggers autophagy in human lung epithelial A549 cells. *Toxicol In Vitro.* 1 sept 2013;27(6):1762-70.

268. Ding R, Zhang C, Zhu X, Cheng H, Zhu F, Xu Y, et al. ROS-AKT-mTOR axis mediates autophagy of human umbilical vein endothelial cells induced by cooking oil fumes-derived fine particulate matters in vitro. *Free Radic Biol Med.* 1 déc 2017;113:452-60.
269. Xia WR, Fu W, Wang Q, Zhu X, Xing WW, Wang M, et al. Autophagy Induced FHL2 Upregulation Promotes IL-6 Production by Activating the NF- κ B Pathway in Mouse Aortic Endothelial Cells after Exposure to PM2.5. *Int J Mol Sci.* juill 2017;18(7):1484.
270. Qiu Y, Zheng Z, Kim H, Yang Z, Zhang G, Shi X, et al. Inhalation Exposure to PM2.5 Counteracts Hepatic Steatosis in Mice Fed High-fat Diet by Stimulating Hepatic Autophagy. *Sci Rep.* 24 nov 2017;7(1):16286.
271. Zhang R, Zhang X, Gao S, Liu R. Assessing the in vitro and in vivo toxicity of ultrafine carbon black to mouse liver. *Sci Total Environ.* mars 2019;655:1334-41.
272. Li X, Chu S, Song Z, He F, Cui Z, Liu R. Discrepancy of apoptotic events in mouse hepatocytes and catalase performance: Size-dependent cellular and molecular toxicity of ultrafine carbon black. *J Hazard Mater.* 5 janv 2022;421:126781.
273. Kim JY, Kim JH, Kim YD, Seo JH. Ultrafine Diesel Exhaust Particles Induce Apoptosis of Oligodendrocytes by Increasing Intracellular Reactive Oxygen Species through NADPH Oxidase Activation. *Antioxidants.* 23 mai 2022;11(5):1031.
274. Chen ZH, Wu YF, Wang PL, Wu YP, Li ZY, Zhao Y, et al. Autophagy is essential for ultrafine particle-induced inflammation and mucus hyperproduction in airway epithelium. *Autophagy.* 15 déc 2015;12(2):297-311.
275. Duan J, Yu Y, Yu Y, Li Y, Huang P, Zhou X, et al. Silica nanoparticles enhance autophagic activity, disturb endothelial cell homeostasis and impair angiogenesis. *Part Fibre Toxicol.* 30 sept 2014;11:50.
276. Shang Y, Liu M, Wang T, Wang L, He H, Zhong Y, et al. Modifications of autophagy influenced the Alzheimer-like changes in SH-SY5Y cells promoted by ultrafine black carbon. *Environ Pollut.* 1 mars 2019;246:763-71.
277. Badran G, Verdin A, Grare C, Abbas I, Achour D, Ledoux F, et al. Toxicological appraisal of the chemical fractions of ambient fine (PM2.5-0.3) and quasi-ultrafine (PM0.3) particles in human bronchial epithelial BEAS-2B cells. *Environ Pollut.* 1 août 2020;263:114620.
278. Zhou W, Yuan X, Zhang L, Su B, Tian D, Li Y, et al. Overexpression of HO-1 assisted PM2.5-induced apoptosis failure and autophagy-related cell necrosis. *Ecotoxicol Environ Saf.* 1 nov 2017;145:605-14.
279. Duan S, Zhang M, Sun Y, Fang Z, Wang H, Li S, et al. Mechanism of PM2.5-induced human bronchial epithelial cell toxicity in central China. *J Hazard Mater.* 5 sept 2020;396:122747.
280. Dornhof R, Maschowski C, Osipova A, Gieré R, Seidl M, Merfort I, et al. Stress fibers, autophagy and necrosis by persistent exposure to PM2.5 from biomass combustion. *PLOS ONE.* 3 juill 2017;12(7):e0180291.
281. Zhao Y, Zhang H, Yang X, Zhang Y, Feng S, Yan X. Fine particulate matter (PM2.5) enhances airway hyperresponsiveness (AHR) by inducing necroptosis in BALB/c mice. *Environ Toxicol Pharmacol.* 1 mai 2019;68:155-63.
282. Wang Y, Tang M. PM2.5 induces ferroptosis in human endothelial cells through iron overload and redox imbalance. *Environ Pollut.* 1 nov 2019;254:112937.
283. Park M, Cho YL, Choi Y, Min JK, Park YJ, Yoon SJ, et al. Particulate matter induces ferroptosis by accumulating iron and dysregulating the antioxidant system. *BMB Rep.* 2 févr 2023;56(2):96.

284. Xiong Q, Tian X, Xu C, Ma B, Liu W, Sun B, et al. PM2.5 exposure-induced ferroptosis in neuronal cells via inhibiting ERK/CREB pathway. *Environ Toxicol*. 2022;37(9):2201-13.
285. Yue D, Zhang Q, Zhang J, Liu W, Chen L, Wang M, et al. Diesel exhaust PM2.5 greatly deteriorates fibrosis process in pre-existing pulmonary fibrosis via ferroptosis. *Environ Int*. 1 janv 2023;171:107706.
286. Yan K, Hou T, Zhu L, Ci X, Peng L. PM2.5 inhibits system Xc- activity to induce ferroptosis by activating the AMPK-Beclin1 pathway in acute lung injury. *Ecotoxicol Environ Saf*. 15 oct 2022;245:114083.
287. Guo L, Bai S, Ding S, Zhao L, Xu S, Wang X. PM2.5 Exposure Induces Lung Injury and Fibrosis by Regulating Ferroptosis via TGF- β Signaling. *Dis Markers*. 27 sept 2022;2022:7098463.
288. Benayoun L, Pretolani M. Le remodelage bronchique dans l'asthme : mécanismes et enjeux thérapeutiques. *médecine/sciences*. mars 2003;19(3):319-26.
289. Godinas L, Duquenne S, Louis R. Comparaison du remodelage tissulaire dans l'asthme et la BPCO. *Rev Med Liege*. :5.
290. Gras D, Bourdin A, Chanez P, Vachier I. Remodelage bronchique dans l'asthme - Conséquences cliniques et fonctionnelles respiratoires. *médecine/sciences*. 1 nov 2011;27(11):959-65.
291. Puisieux A, Caramel J. La transition épithélio-mésenchymateuse, un processus d'adaptation des cellules cancéreuses. 2013;7.
292. Rôle de la transition épithélio-mésenchymateuse au cours de la progression tumorale – Académie nationale de médecine | Une institution dans son temps [Internet]. [cité 13 oct 2022]. Disponible sur: <https://www.academie-medecine.fr/role-de-la-transition-epithelio-mesenchymateuse-au-cours-de-la-progression-tumorale/>
293. Lu W, Kang Y. Epithelial-mesenchymal plasticity in cancer progression and metastasis. *Dev Cell*. 6 mai 2019;49(3):361-74.
294. Nawrocki-Raby B, Polette M, Tournier JM, Birembaut P. Rôle des métalloprotéinases matricielles dans le remodelage de la matrice extracellulaire au cours des phénomènes de migration cellulaire de l'épithélium bronchique. 2001;(4):5.
295. Xu Z, Ding W, Deng X. PM2.5, Fine Particulate Matter: A Novel Player in the Epithelial-Mesenchymal Transition? *Front Physiol* [Internet]. 2019 [cité 17 oct 2022];10. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphys.2019.01404>
296. Tang W, Du L, Sun W, Yu Z, He F, Chen J, et al. Maternal exposure to fine particulate air pollution induces epithelial-to-mesenchymal transition resulting in postnatal pulmonary dysfunction mediated by transforming growth factor- β /Smad3 signaling. *Toxicol Lett*. 5 févr 2017;267:11-20.
297. Gu LZ, Sun H, Chen JH. Histone deacetylases 3 deletion restrains PM2.5-induced mice lung injury by regulating NF- κ B and TGF- β /Smad2/3 signaling pathways. *Biomed Pharmacother*. 1 janv 2017;85:756-62.
298. Li K, Yan J, Wang S, Liang X, Lin B, Tian L, et al. Acute Exposure of Atmospheric Ultrafine Particles Induced Inflammation Response and Dysregulated TGF β /Smads Signaling Pathway in ApoE $^{-/-}$ Mice. *Cardiovasc Toxicol*. 1 mai 2021;21(5):410-21.
299. Longhin E, Gualtieri M, Capasso L, Bengalli R, Mollerup S, Holme JA, et al. Physico-chemical properties and biological effects of diesel and biomass particles. *Environ Pollut Barking Essex* 1987. août 2016;215:366-75.

300. Grilli A, Bengalli R, Longhin E, Capasso L, Proverbio MC, Forcato M, et al. Transcriptional profiling of human bronchial epithelial cell BEAS-2B exposed to diesel and biomass ultrafine particles. *BMC Genomics*. 27 avr 2018;19(1):302.
301. Rynning I, Neca J, Vrbova K, Libalova H, Rossner P, Holme JA, et al. In Vitro Transformation of Human Bronchial Epithelial Cells by Diesel Exhaust Particles: Gene Expression Profiling and Early Toxic Responses. *Toxicol Sci*. nov 2018;166(1):51-64.
302. LaGier AJ, Manzo ND, Dye JA. Diesel Exhaust Particles Induce Aberrant Alveolar Epithelial Directed Cell Movement by Disruption of Polarity Mechanisms. *J Toxicol Environ Health A*. 1 janv 2013;76(2):71-85.
303. Thevenot PT, Saravia J, Jin N, Giaimo JD, Chustz RE, Mahne S, et al. Radical-Containing Ultrafine Particulate Matter Initiates Epithelial-to-Mesenchymal Transitions in Airway Epithelial Cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. févr 2013;48(2):188-97.
304. Lee M, Lim S, Kim YS, Khalmuratova R, Shin SH, Kim I, et al. DEP-induced ZEB2 promotes nasal polyp formation via epithelial-to-mesenchymal transition. *J Allergy Clin Immunol*. 1 janv 2022;149(1):340-57.
305. Niranjana R, Muthukumaravel S, Panneer D, Ojha SK. Eosinophils Restrict Diesel Exhaust Particles-induced Cell Proliferation of Lung Epithelial A549 Cells via Interleukin-13 Mediated Mechanisms: Implications for Tissue Remodeling and Fibrosis. *Comb Chem High Throughput Screen*. 2022;25(10):1682-94.
306. Bové H, Devoght J, Rasking L, Peters M, Slenders E, Roeffaers M, et al. Combustion-derived particles inhibit in vitro human lung fibroblast-mediated matrix remodeling. *J Nanobiotechnology*. 27 oct 2018;16(1):82.
307. Singh N, Arora N. Diesel exhaust exposure in mice induces pulmonary fibrosis by TGF- β /Smad3 signaling pathway. *Sci Total Environ*. 10 févr 2022;807:150623.
308. Yin Y, Mu C, Wang J, Wang Y, Hu W, Zhu W, et al. CXCL17 Attenuates Diesel Exhaust Emissions Exposure-Induced Lung Damage by Regulating Macrophage Function. *Toxics*. 26 juill 2023;11(8):646.
309. Kim BG, Lee PH, Lee SH, Kim YE, Shin MY, Kang Y, et al. Long-Term Effects of Diesel Exhaust Particles on Airway Inflammation and Remodeling in a Mouse Model. *Allergy Asthma Immunol Res*. mai 2016;8(3):246-56.
310. Melchior M, Poisbeau P. Conséquences des perturbations périnatales sur les réponses douloureuses. *Douleurs Eval - Diagn - Trait*. 7 avr 2015;16.
311. Dunoyer P. La bataille du silence - Mécanisme et inhibition du RNA silencing au cours des interactions plante/virus. *médecine/sciences*. 1 mai 2009;25(5):505-12.
312. Baulande S, Criqui A, Duthieuw M. Les microARN circulants, une nouvelle classe de biomarqueurs pour la médecine. *médecine/sciences*. 1 mars 2014;30(3):289-96.
313. Ma Y, Shen N, Wicha MS, Luo M. The Roles of the Let-7 Family of MicroRNAs in the Regulation of Cancer Stemness. *Cells*. 14 sept 2021;10(9):2415.
314. Cao W, Wang Q, Huang C. Let-7a Inhibits Tumor Metastasis by Regulating TGF- β /Smad Signaling in the Colorectal Adenocarcinoma Cell Line LS-174T. *Anticancer Res*. 1 août 2021;41(8):3801-8.
315. Li Y, Dong R, Lu M, Cheng C, Feng Z, Zhao R, et al. Let-7b-3p inhibits tumor growth and metastasis by targeting the BRF2-mediated MAPK/ERK pathway in human lung adenocarcinoma. *Transl Lung Cancer Res*. avr 2021;10(4):1841-56.

316. Shen C, Li J, Che G. Prognostic value of let-7 in lung cancer: systematic review and meta-analysis. *Transl Cancer Res.* oct 2020;9(10):6354-61.
317. Bai J, Shi Z, Wang S, Pan H, Zhang T. MiR-21 and let-7 cooperation in the regulation of lung cancer. *Front Oncol.* 29 sept 2022;12:950043.
318. Bica-Pop C, Cojocneanu-Petric R, Magdo L, Raduly L, Gulei D, Berindan-Neagoe I. Overview upon miR-21 in lung cancer: focus on NSCLC. *Cell Mol Life Sci.* 1 oct 2018;75(19):3539-51.
319. He H, Zhang H, Li Z, Wang R, Li N, Zhu L. miRNA-214: Expression, Therapeutic and Diagnostic Potential in Cancer. *Tumori J.* 1 juill 2015;101(4):375-83.
320. Cheng M, Wang B, Yang M, Ma J, Ye Z, Xie L, et al. microRNAs expression in relation to particulate matter exposure: A systematic review. *Environ Pollut Barking Essex 1987.* mai 2020;260:113961.
321. 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.* 8 mars 2016;13:13.
322. Krauskopf J, de Kok TM, Hebels DG, Bergdahl IA, Johansson A, Spaeth F, et al. MicroRNA profile for health risk assessment: Environmental exposure to persistent organic pollutants strongly affects the human blood microRNA machinery. *Sci Rep.* 23 août 2017;7(1):9262.
323. Izzotti A, Pulliero A. The effects of environmental chemical carcinogens on the microRNA machinery. *Int J Hyg Environ Health.* juill 2014;217(6):601-27.
324. Li M, Huo X, Davuljigari CB, Dai Q, Xu X. MicroRNAs and their role in environmental chemical carcinogenesis. *Environ Geochem Health.* févr 2019;41(1):225-47.
325. Pogribny IP, Beland FA, Rusyn I. The role of microRNAs in the development and progression of chemical-associated cancers. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1 déc 2016;312:3-10.
326. Sima M, Rossnerova A, Simova Z, Rossner P. The Impact of Air Pollution Exposure on the MicroRNA Machinery and Lung Cancer Development. *J Pers Med.* janv 2021;11(1):60.
327. Fossati S, Baccarelli A, Zanobetti A, Hoxha M, Vokonas PS, Wright RO, et al. Ambient Particulate Air Pollution and MicroRNAs in Elderly Men. *Epidemiology.* janv 2014;25(1):68.
328. Mancini FR, Laine JE, Tarallo S, Vlaanderen J, Vermeulen R, van Nunen E, et al. microRNA expression profiles and personal monitoring of exposure to particulate matter. *Environ Pollut Barking Essex 1987.* août 2020;263(Pt B):114392.
329. Chen R, Li H, Cai J, Wang C, Lin Z, Liu C, et al. Fine Particulate Air Pollution and the Expression of microRNAs and Circulating Cytokines Relevant to Inflammation, Coagulation, and Vasoconstriction. *Environ Health Perspect.* 17 janv 2018;126(1):017007.
330. Louwies T, Vuegen C, Panis LI, Cox B, Vrijens K, Nawrot TS, et al. miRNA expression profiles and retinal blood vessel calibers are associated with short-term particulate matter air pollution exposure. *Environ Res.* 1 mai 2016;147:24-31.
331. Krauskopf J, Caiment F, van Veldhoven K, Chadeau-Hyam M, Sinharay R, Chung KF, et al. The human circulating miRNome reflects multiple organ disease risks in association with short-term exposure to traffic-related air pollution. *Environ Int.* 1 avr 2018;113:26-34.
332. Krauskopf J, Verheijen M, Kleinjans JC, de Kok TM, Caiment F. Development and regulatory application of microRNA biomarkers. *Biomark Med.* nov 2015;9(11):1137-51.

333. Krauskopf J, van Veldhoven K, Chadeau-Hyam M, Vermeulen R, Carrasco-Turigas G, Nieuwenhuijsen M, et al. Short-term exposure to traffic-related air pollution reveals a compound-specific circulating miRNA profile indicating multiple disease risks. *Environ Int.* 1 juill 2019;128:193-200.
334. 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.* 26 juill 2016;15:80.
335. Tumolo MR, Panico A, De Donno A, Mincarone P, Leo CG, Guarino R, et al. The expression of microRNAs and exposure to environmental contaminants related to human health: a review. *Int J Environ Health Res.* févr 2022;32(2):332-54.
336. Amini S, Abak A, Sakhinia E, Abhari A. MicroRNA-221 and MicroRNA-222 in Common Human Cancers: Expression, Function, and Triggering of Tumor Progression as a Key Modulator. *Lab Med.* 10 oct 2019;50(4):333-47.
337. Bollati V, Marinelli B, Apostoli P, Bonzini M, Nordio F, Hoxha M, et al. Exposure to Metal-Rich Particulate Matter Modifies the Expression of Candidate MicroRNAs in Peripheral Blood Leukocytes. *Environ Health Perspect.* juin 2010;118(6):763-8.
338. Tsamou M, Vrijens K, Madhloum N, Lefebvre W, Vanpoucke C, Nawrot TS. Air pollution-induced placental epigenetic alterations in early life: a candidate miRNA approach. *Epigenetics.* 1 févr 2018;13(2):135-46.
339. 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.* 1 avr 2013;132(2):307-16.
340. Motta V, Favero C, Dioni L, Iodice S, Battaglia C, Angelici L, et al. MicroRNAs are associated with blood-pressure effects of exposure to particulate matter: Results from a mediated moderation analysis. *Environ Res.* avr 2016;146:274-81.
341. Rodosthenous RS, Kloog I, Colicino E, Zhong J, Herrera LA, Vokonas P, et al. Extracellular vesicle-enriched microRNAs interact in the association between long-term particulate matter and blood pressure in elderly men. *Environ Res.* nov 2018;167:640-9.
342. Crobeddu B, Aragao-Santiago L, Bui LC, Boland S, Baeza Squiban A. Oxidative potential of particulate matter 2.5 as predictive indicator of cellular stress. *Environ Pollut.* 1 nov 2017;230:125-33.
343. Promega, GSH/GSSG-GloTM Assay, Instructions for use of Products, V6611 and V6612.
344. Janssen N, Strak M, Yang A, Hellack B, Kelly F, Kuhlbusch TAJ, et al. Associations between three specific a-cellular measures of the oxidative potential of particulate matter and markers of acute airway and nasal inflammation in healthy volunteers. *Occup Environ Med.* 7 août 2014;
345. Seranno S de, Meuwissen R. Progress and applications of mouse models for human lung cancer. *Eur Respir J.* 1 févr 2010;35(2):426-43.
346. Handley SL, Mithani S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* août 1984;327(1):1-5.
347. TransAM NRF2 [Internet]. [cité 18 janv 2023]. Disponible sur: <https://www.activemotif.com/documents/1600.pdf>
348. AllPrep DNA/RNA/miRNA Universal Kit, Quick-Start Protocol.
349. Catalase Assay Kit, Sigma-Aldrich.

350. Glutathione Peroxidase Cellular Activity Assay Kit.
351. Glutathione Reductase Assay Kit.
352. Glutathione S-Transferase (GST) Assay Kit [Internet]. [cité 22 juin 2023]. Disponible sur: <https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/documents/101/301/cs0410bul.pdf>
353. NQO1 Activity Assay_ab184867.pdf [Internet]. [cité 22 juin 2023]. Disponible sur: [https://www.abcam.com/ps/products/184/ab184867/documents/ab184867_NQO1%20Activity%20Assay_17%20Apr%2015%20\(website\).pdf](https://www.abcam.com/ps/products/184/ab184867/documents/ab184867_NQO1%20Activity%20Assay_17%20Apr%2015%20(website).pdf)
354. Superoxide Dismutase Activity Assay Kit.
355. OxiSelect™ Oxidative DNA Damage ELISA Kit (8-OHdG Quantitation).
356. STA-325-8ohg-elisa-kit.pdf [Internet]. [cité 20 juin 2023]. Disponible sur: <https://www.cellbiolabs.com/sites/default/files/STA-325-8ohg-elisa-kit.pdf>
357. STA-817-advanced-glycation-age-competitive-elisa-kit.pdf [Internet]. [cité 20 juin 2023]. Disponible sur: <https://www.cellbiolabs.com/sites/default/files/STA-817-advanced-glycation-age-competitive-elisa-kit.pdf>
358. STA-318-aopp-assay.pdf [Internet]. [cité 20 juin 2023]. Disponible sur: <https://www.cellbiolabs.com/sites/default/files/STA-318-aopp-assay.pdf>
359. OxiSelect™ Protein Carbonyl ELISA Kit.
360. TransAM™ Flexi NFκB Family Transcription Factor Assay Kit.
361. proinflammatory panel 1 mouse insert.pdf [Internet]. [cité 20 juin 2023]. Disponible sur: <https://www.mesoscale.com/~media/files/product%20inserts/proinflammatory%20panel%201%20mouse%20insert.pdf>
362. v-plex-cytokine-panel-1-mouse-insert.pdf [Internet]. [cité 20 juin 2023]. Disponible sur: <https://www.mesoscale.com/~media/files/product%20inserts/v-plex-cytokine-panel-1-mouse-insert.pdf>
363. Divakaruni AS, Rogers GW, Murphy AN. Measuring Mitochondrial Function in Permeabilized Cells Using the Seahorse XF Analyzer or a Clark-Type Oxygen Electrode. *Curr Protoc Toxicol.* 27 mai 2014;60:25.2.1-16.
364. Les particules ultrafines dans le viseur d'Airparif | Airparif [Internet]. [cité 16 sept 2023]. Disponible sur: <https://www.airparif.asso.fr/actualite/2022/les-particules-ultrafines-dans-le-viseur-dairparif>
365. Pascal et al. Influence de la saison et des épisodes de fortes chaleurs sur les liens entre ozone, particules et mortalité dans neuf villes françaises.
366. Fűri P, Groma V, Tűrűk S, Farkas Á, Dian C. Ultrafine urban particle measurements in Budapest and their airway deposition distribution calculation. *Inhal Toxicol.* 2020;32(13-14):494-502.
367. Barbier E, Carpentier J, Simonin O, Gosset P, Platel A, Happillon M, et al. Oxidative stress and inflammation induced by air pollution-derived PM2.5 persist in the lungs of mice after cessation of their sub-chronic exposure. *Environ Int.* 1 nov 2023;181:108248.
368. Wang YF, Huang KL, Li CT, Mi HH, Luo JH, Tsai PJ. Emissions of fuel metals content from a diesel vehicle engine. *Atmos Environ.* oct 2003;37(33):4637-43.

369. Morawska L, (Jim) Zhang J. Combustion sources of particles. 1. Health relevance and source signatures. *Chemosphere*. déc 2002;49(9):1045-58.
370. Dahl A, Gharibi A, Swietlicki E, Gudmundsson A, Bohgard M, Ljungman A, et al. Traffic-generated emissions of ultrafine particles from pavement–tire interface. *Atmos Environ*. mars 2006;40(7):1314-23.
371. Ntziachristos L, Ning Z, Geller MD, Sheesley RJ, Schauer JJ, Sioutas C. Fine, ultrafine and nanoparticle trace element compositions near a major freeway with a high heavy-duty diesel fraction. *Atmos Environ*. sept 2007;41(27):5684-96.
372. Gietl JK, Lawrence R, Thorpe AJ, Harrison RM. Identification of brake wear particles and derivation of a quantitative tracer for brake dust at a major road. *Atmos Environ*. 1 janv 2010;44(2):141-6.
373. Lough GC, Schauer JJ, Park JS, Shafer MM, DeMinter JT, Weinstein JP. Emissions of Metals Associated with Motor Vehicle Roadways. *Environ Sci Technol*. 1 févr 2005;39(3):826-36.
374. Hays MD, Cho SH, Baldauf R, Schauer JJ, Shafer M. Particle size distributions of metal and non-metal elements in an urban near-highway environment. *Atmos Environ*. 1 févr 2011;45(4):925-34.
375. Sanders PG, Xu N, Dalka TM, Maricq MM. Airborne Brake Wear Debris: Size Distributions, Composition, and a Comparison of Dynamometer and Vehicle Tests. *Environ Sci Technol*. 1 sept 2003;37(18):4060-9.
376. Saffari A, Daher N, Shafer MM, Schauer JJ, Sioutas C. Seasonal and spatial variation of trace elements and metals in quasi-ultrafine (PM_{0.25}) particles in the Los Angeles metropolitan area and characterization of their sources. *Environ Pollut*. 1 oct 2013;181:14-23.
377. Morishita M, Keeler GJ, Kamal AS, Wagner JG, Harkema JR, Rohr AC. Identification of ambient PM_{2.5} sources and analysis of pollution episodes in Detroit, Michigan using highly time-resolved measurements. *Atmos Environ*. mars 2011;45(8):1627-37.
378. Wu YS, Fang GC, Lee WJ, Lee JF, Chang CC, Lee CZ. A review of atmospheric fine particulate matter and its associated trace metal pollutants in Asian countries during the period 1995–2005. *J Hazard Mater*. 8 mai 2007;143(1):511-5.
379. Leclercq B, Alleman LY, Perdrix E, Riffault V, Happillon M, Strecker A, et al. Particulate metal bioaccessibility in physiological fluids and cell culture media: Toxicological perspectives. *Environ Res*. 1 juill 2017;156:148-57.
380. Biswas P, Wu CY. Nanoparticles and the environment. *J Air Waste Manag Assoc* 1995. juin 2005;55(6):708-46.
381. Sotty J, Garçon G, Denayer FO, Alleman LY, Saleh Y, Perdrix E, et al. Toxicological effects of ambient fine (PM_{2.5-0.18}) and ultrafine (PM_{0.18}) particles in healthy and diseased 3D organo-typic mucociliary-phenotype models. *Environ Res*. 1 sept 2019;176:108538.
382. Chaudhuri N, Paiva C, Donaldson K, Duffin R, Parker LC, Sabroe I. Diesel exhaust particles override natural injury-limiting pathways in the lung. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol*. août 2010;299(2):L263-71.
383. Arimoto T, Kadiiska MB, Sato K, Corbett J, Mason RP. Synergistic Production of Lung Free Radicals by Diesel Exhaust Particles and Endotoxin. *Am J Respir Crit Care Med*. 15 févr 2005;171(4):379-87.
384. Inoue K ichiro, Takano H, Yanagisawa R, Hirano S, Sakurai M, Shimada A, et al. Effects of Airway Exposure to Nanoparticles on Lung Inflammation Induced by Bacterial Endotoxin in Mice. *Environ Health Perspect*. sept 2006;114(9):1325-30.

385. Takano H, Yanagisawa R, Ichinose T, Sadakane K, Yoshino S, Yoshikawa T, et al. Diesel Exhaust Particles Enhance Lung Injury Related to Bacterial Endotoxin through Expression of Proinflammatory Cytokines, Chemokines, and Intercellular Adhesion Molecule-1. *Am J Respir Crit Care Med.* mai 2002;165(9):1329-35.
386. Zhang X, Staimer N, Tjoa T, Gillen DL, Schauer JJ, Shafer MM, et al. Associations between microvascular function and short-term exposure to traffic-related air pollution and particulate matter oxidative potential. *Environ Health.* 26 juill 2016;15(1):81.
387. Liu L, Urch B, Szyszkowicz M, Evans G, Speck M, Van Huang A, et al. Metals and oxidative potential in urban particulate matter influence systemic inflammatory and neural biomarkers: A controlled exposure study. *Environ Int.* déc 2018;121(Pt 2):1331-40.
388. Yu Y qi, Zhu T. Effects of endogenous and exogenous reductants in lung fluid on the bioaccessible metal concentration and oxidative potential of ultrafine particles. *Sci Total Environ.* 15 juill 2023;882:163652.
389. Li R, Sun Q, Lam SM, Chen R, Zhu J, Gu W, et al. Sex-dependent effects of ambient PM2.5 pollution on insulin sensitivity and hepatic lipid metabolism in mice. *Part Fibre Toxicol.* 22 avr 2020;17(1):14.
390. Zhang J, Wang X, Yan M, Shan A, Wang C, Yang X, et al. Sex Differences in Cardiovascular Risk Associated With Long-Term PM2.5 Exposure: A Systematic Review and Meta-Analysis of Cohort Studies. *Front Public Health.* 2022;10:802167.
391. Bertin M, Chevrier C, Serrano T, Monfort C, Cordier S, Viel JF. Sex-specific differences in fetal growth in newborns exposed prenatally to traffic-related air pollution in the PELAGIE mother-child cohort (Brittany, France). *Environ Res.* oct 2015;142:680-7.
392. Mutlu GM, Green D, Bellmeyer A, Baker CM, Burgess Z, Rajamannan N, et al. Ambient particulate matter accelerates coagulation via an IL-6-dependent pathway. *J Clin Invest.* 1 oct 2007;117(10):2952-61.
393. Indice de la qualité de l'air | Atmo Hauts-de-France [Internet]. [cité 20 janv 2023]. Disponible sur: <https://www.atmo-hdf.fr/article/indice-de-la-qualite-de-lair>
394. Bilan des épisodes de pollution de l'année 2022 en Hauts-de-France | Atmo Hauts-de-France [Internet]. [cité 30 juin 2023]. Disponible sur: <https://www.atmo-hdf.fr/actualite/bilan-des-episodes-de-pollution-de-lannee-2022-en-hauts-de-france>
395. AIR2010sa0183Ra.pdf [Internet]. [cité 30 juin 2023]. Disponible sur: <https://www.anses.fr/fr/system/files/AIR2010sa0183Ra.pdf>
396. Liu L, Ma X, Wen W, Sun C, Jiao J. Characteristics and potential sources of wintertime air pollution in Linfen, China. *Environ Monit Assess.* 8 avr 2021;193(5):252.
397. Shi G, Liu J, Zhong X. Spatial and temporal variations of PM2.5 concentrations in Chinese cities during 2015-2019. *Int J Environ Health Res.* 2 déc 2022;32(12):2695-707.
398. Gardner DK. *Environmental Pollution in China: What Everyone Needs to Know.* Oxford University Press; 2018. 305 p.
399. An Z, Huang RJ, Zhang R, Tie X, Li G, Cao J, et al. Severe haze in northern China: A synergy of anthropogenic emissions and atmospheric processes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 30 avr 2019;116(18):8657-66.
400. Jew K, Herr D, Wong C, Kennell A, Morris-Schaffer K, Oberdörster G, et al. Selective memory and behavioral alterations after ambient ultrafine particulate matter exposure in aged 3xTgAD Alzheimer's disease mice. *Part Fibre Toxicol.* 26 nov 2019;16(1):45.

401. Cory-Slechta DA, Allen JL, Conrad K, Marvin E, Sobolewski M. Developmental Exposure to Low Level Ambient Ultrafine Particle Air Pollution and Cognitive Dysfunction. *Neurotoxicology*. déc 2018;69:217-31.
402. Sobolewski M, Anderson T, Conrad K, Marvin E, Klocke C, Morris-Schaffer K, et al. Developmental exposures to ultrafine particle air pollution reduces early testosterone levels and adult male social novelty preference: Risk for children's sex-biased neurobehavioral disorders. *Neurotoxicology*. sept 2018;68:203-11.
403. Shih CH, Chen JK, Kuo LW, Cho KH, Hsiao TC, Lin ZW, et al. Chronic pulmonary exposure to traffic-related fine particulate matter causes brain impairment in adult rats. *Part Fibre Toxicol*. 9 nov 2018;15(1):44.
404. Shou Y, Zhu X, Zhu D, Yin H, Shi Y, Chen M, et al. Ambient PM2.5 chronic exposure leads to cognitive decline in mice: From pulmonary to neuronal inflammation. *Toxicol Lett*. 1 oct 2020;331:208-17.
405. Garcia Y, Esquivel N. Comparison of the Response of Male BALB/c and C57BL/6 Mice in Behavioral Tasks to Evaluate Cognitive Function. *Behav Sci*. 18 janv 2018;8(1):14.
406. Vogel CFA, Van Winkle LS, Esser C, Haarmann-Stemmann T. The aryl hydrocarbon receptor as a target of environmental stressors – Implications for pollution mediated stress and inflammatory responses. *Redox Biol*. 18 avr 2020;34:101530.
407. Boudjema J, Lima B, Grare C, Alleman LY, Rousset D, Perdrix E, et al. Metal enriched quasi-ultrafine particles from stainless steel gas metal arc welding induced genetic and epigenetic alterations in BEAS-2B cells. *NanoImpact*. 1 juill 2021;23:100346.
408. Seriani R, de Souza CEC, Krempel PG, Frias DP, Matsuda M, Correia AT, et al. Human bronchial epithelial cells exposed in vitro to diesel exhaust particles exhibit alterations in cell rheology and cytotoxicity associated with decrease in antioxidant defenses and imbalance in pro- and anti-apoptotic gene expression. *Environ Sci Pollut Res*. 1 mai 2016;23(10):9862-70.
409. Park SJ, Lee J, Lee S, Lim S, Noh J, Cho SY, et al. Exposure of ultrafine particulate matter causes glutathione redox imbalance in the hippocampus: A neurometabolic susceptibility to Alzheimer's pathology. *Sci Total Environ*. 20 mai 2020;718:137267.
410. Griffith OW. Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. *Free Radic Biol Med*. 1 nov 1999;27(9):922-35.
411. Anderson ME. Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation. *Chem Biol Interact*. 24 avr 1998;111-112:1-14.
412. Kiyosawa N, Ito K, Sakuma K, Niino N, Kanbori M, Yamoto T, et al. Evaluation of glutathione deficiency in rat livers by microarray analysis. *Biochem Pharmacol*. 1 oct 2004;68(7):1465-75.
413. Tomasi ML, Ryoo M, Yang H, Ara AI, Ko KS, Lu SC. Molecular Mechanisms of Lipopolysaccharide-mediated Inhibition of Glutathione Synthesis in Mice. *Free Radic Biol Med*. mars 2014;68:148-58.
414. Moraes TB, Dalazen GR, Jacques CE, de Freitas RS, Rosa AP, Dutra-Filho CS. Glutathione metabolism enzymes in brain and liver of hyperphenylalaninemic rats and the effect of lipoic acid treatment. *Metab Brain Dis*. 1 sept 2014;29(3):609-15.
415. Chen Y, Dong H, Thompson D, Shertzer H, Nebert D, Vasiliou V. GLUTATHIONE DEFENSE MECHANISM IN LIVER INJURY: INSIGHTS FROM ANIMAL MODELS. *Food Chem Toxicol Int J Publ Br Ind Biol Res Assoc*. oct 2013;60:38-44.

416. Lin TY, Cantley LC, DeNicola GM, Lin TY, Cantley LC, DeNicola GM. NRF2 Rewires Cellular Metabolism to Support the Antioxidant Response. In: A Master Regulator of Oxidative Stress - The Transcription Factor Nrf2 [Internet]. IntechOpen; 2016 [cité 20 sept 2023]. Disponible sur: <https://www.intechopen.com/chapters/52298>
417. Ajuwon OR, Marnewick JL, Oguntibeju OO, Davids LM. Red Palm Oil Ameliorates Oxidative Challenge and Inflammatory Responses Associated with Lipopolysaccharide-Induced Hepatic Injury by Modulating NF- κ B and Nrf2/GCL/HO-1 Signaling Pathways in Rats. *Antioxidants*. 22 août 2022;11(8):1629.
418. Leclercq B, Happillon M, Antherieu S, Hardy EM, Alleman LY, Grova N, et al. Differential responses of healthy and chronic obstructive pulmonary diseased human bronchial epithelial cells repeatedly exposed to air pollution-derived PM4. *Environ Pollut*. 1 nov 2016;218:1074-88.
419. Dunning S, ur Rehman A, Tiebosch MH, Hannivoort RA, Haijjer FW, Woudenberg J, et al. Glutathione and antioxidant enzymes serve complementary roles in protecting activated hepatic stellate cells against hydrogen peroxide-induced cell death. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Basis Dis*. 1 déc 2013;1832(12):2027-34.
420. Ross D, Siegel D. The diverse functionality of NQO1 and its roles in redox control. *Redox Biol*. 20 mars 2021;41:101950.
421. Ross D, Kepa JK, Winski SL, Beall HD, Anwar A, Siegel D. NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1): chemoprotection, bioactivation, gene regulation and genetic polymorphisms. *Chem Biol Interact*. 1 déc 2000;129(1):77-97.
422. Sepasi Tehrani H, Moosavi-Movahedi AA. Catalase and its mysteries. *Prog Biophys Mol Biol*. 1 déc 2018;140:5-12.
423. Handy DE, Loscalzo J. The role of glutathione peroxidase-1 in health and disease. *Free Radic Biol Med*. 1 août 2022;188:146-61.
424. Wang SW, Lee CH, Lin MS, Chi CW, Chen YJ, Wang GS, et al. ZnO Nanoparticles Induced Caspase-Dependent Apoptosis in Gingival Squamous Cell Carcinoma through Mitochondrial Dysfunction and p70S6K Signaling Pathway. *Int J Mol Sci*. janv 2020;21(5):1612.
425. Li X, He F, Hu S, Sun N, Huo C, Liu R. The culprits of superoxide dismutase inactivation under size-dependent stress of ultrafine carbon black: Superoxide anion, genotoxicity and protein corona. *Sci Total Environ*. 1 mars 2023;862:160770.
426. Ryter SW. Heme Oxygenase-1: An Anti-Inflammatory Effector in Cardiovascular, Lung, and Related Metabolic Disorders. *Antioxid Basel Switz*. 15 mars 2022;11(3):555.
427. Chen XL, Kunsch C. Induction of cytoprotective genes through Nrf2/antioxidant response element pathway: a new therapeutic approach for the treatment of inflammatory diseases. *Curr Pharm Des*. 2004;10(8):879-91.
428. Burke R, Chu C, Zhou GD, Putluri V, Putluri N, Stading RE, et al. Role of Human NADPH Quinone Oxidoreductase (NQO1) in Oxygen-Mediated Cellular Injury and Oxidative DNA Damage in Human Pulmonary Cells. *Oxid Med Cell Longev*. 15 oct 2021;2021:5544600.
429. Nebert DW, Dalton TP. The role of cytochrome P450 enzymes in endogenous signalling pathways and environmental carcinogenesis. *Nat Rev Cancer*. déc 2006;6(12):947-60.
430. Gasparotto J, Somensi N, Caregnato FF, Rabelo TK, DaBoit K, Oliveira MLS, et al. Coal and tire burning mixtures containing ultrafine and nanoparticulate materials induce oxidative stress and inflammatory activation in macrophages. *Sci Total Environ*. 1 oct 2013;463-464:743-53.

431. Cheng H, Saffari A, Sioutas C, Forman HJ, Morgan TE, Finch CE. Nanoscale Particulate Matter from Urban Traffic Rapidly Induces Oxidative Stress and Inflammation in Olfactory Epithelium with Concomitant Effects on Brain. *Environ Health Perspect.* oct 2016;124(10):1537-46.
432. Costa DL, Amaral EP, Andrade BB, Sher A. Modulation of Inflammation and Immune Responses by Heme Oxygenase-1: Implications for Infection with Intracellular Pathogens. *Antioxidants.* 30 nov 2020;9(12):1205.
433. Jung SS, Moon JS, Xu JF, Ifedigbo E, Ryter SW, Choi AMK, et al. Carbon monoxide negatively regulates NLRP3 inflammasome activation in macrophages. *Am J Physiol-Lung Cell Mol Physiol.* 15 mai 2015;308(10):L1058-67.
434. Otterbein LE, Bach FH, Alam J, Soares M, Tao Lu H, Wysk M, et al. Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway. *Nat Med.* avr 2000;6(4):422-8.
435. Morse D, Pischke SE, Zhou Z, Davis RJ, Flavell RA, Loop T, et al. Suppression of Inflammatory Cytokine Production by Carbon Monoxide Involves the JNK Pathway and AP-1 *. *J Biol Chem.* 26 sept 2003;278(39):36993-8.
436. Pae HO, Oh GS, Choi BM, Chae SC, Kim YM, Chung KR, et al. Carbon Monoxide Produced by Heme Oxygenase-1 Suppresses T Cell Proliferation via Inhibition of IL-2 Production1. *J Immunol.* 15 avr 2004;172(8):4744-51.
437. Sarady-Andrews JK, Liu F, Gallo D, Nakao A, Overhaus M, Öllinger R, et al. Biliverdin administration protects against endotoxin-induced acute lung injury in rats. *Am J Physiol-Lung Cell Mol Physiol.* déc 2005;289(6):L1131-7.
438. Gibbs PEM, Maines MD. Biliverdin inhibits activation of NF- κ B: Reversal of inhibition by human biliverdin reductase. *Int J Cancer.* 2007;121(11):2567-74.
439. Shuvaev VV, Han J, Tliba S, Arguiri E, Christofidou-Solomidou M, Ramirez SH, et al. Anti-Inflammatory Effect of Targeted Delivery of SOD to Endothelium: Mechanism, Synergism with NO Donors and Protective Effects In Vitro and In Vivo. *PLOS ONE.* 11 oct 2013;8(10):e77002.
440. Kimura A, Kitajima M, Nishida K, Serada S, Fujimoto M, Naka T, et al. NQO1 inhibits the TLR-dependent production of selective cytokines by promoting I κ B- ζ degradation. *J Exp Med.* 22 juin 2018;215(8):2197-209.
441. Chen XL, Varner SE, Rao AS, Grey JY, Thomas S, Cook CK, et al. Laminar flow induction of antioxidant response element-mediated genes in endothelial cells. A novel anti-inflammatory mechanism. *J Biol Chem.* 10 janv 2003;278(2):703-11.
442. Henderson WR, Chi EY, Teo JL, Nguyen C, Kahn M. A Small Molecule Inhibitor of Redox-Regulated NF- κ B and Activator Protein-1 Transcription Blocks Allergic Airway Inflammation in a Mouse Asthma Model. *J Immunol.* 1 nov 2002;169(9):5294-9.
443. Schmitt P, Girard JP, Cayrol C. L'interleukine 33 - De la biologie aux implications thérapeutiques. *médecine/sciences.* 1 mai 2019;35(5):440-51.
444. Jang TY, Kim YH. Interleukin-33 and Mast Cells Bridge Innate and Adaptive Immunity: From the Allergologist's Perspective. *Int Neurourol J.* sept 2015;19(3):142-50.
445. Andrade MV, Iwaki S, Ropert C, Gazzinelli RT, Cunha-Melo JR, Beaven MA. Amplification of Cytokine Production through Synergistic Activation of NFAT and AP-1 Following Stimulation of Mast Cells with Antigen and IL-33. *Eur J Immunol.* mars 2011;41(3):760-72.

446. Enoksson M, Möller-Westerberg C, Wicher G, Fallon PG, Forsberg-Nilsson K, Lunderius-Andersson C, et al. Intraperitoneal influx of neutrophils in response to IL-33 is mast cell-dependent. *Blood*. 17 janv 2013;121(3):530-6.
447. Zharichenko N, Njoku DB. The Role of Pro-Inflammatory and Regulatory Signaling by IL-33 in the Brain and Liver: A Focused Systematic Review of Mouse and Human Data and Risk of Bias Assessment of the Literature. *Int J Mol Sci*. 30 mai 2020;21(11):3933.
448. Shapouri-Moghaddam A, Mohammadian S, Vazini H, Taghadosi M, Esmaeili SA, Mardani F, et al. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *J Cell Physiol*. 2018;233(9):6425-40.
449. Tumpey TM, Fenton R, Molesworth-Kenyon S, Oakes JE, Lausch RN. Role for Macrophage Inflammatory Protein 2 (MIP-2), MIP-1 α , and Interleukin-1 α in the Delayed-Type Hypersensitivity Response to Viral Antigen. *J Virol*. août 2002;76(16):8050-7.
450. Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE. Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1): An Overview. *J Interferon Cytokine Res*. juin 2009;29(6):313-26.
451. Yeoh WJ, Vu VP, Krebs P. IL-33 biology in cancer: An update and future perspectives. *Cytokine*. sept 2022;157:155961.
452. Kotsiou OS, Gourgoulianis KI, Zarogiannis SG. IL-33/ST2 Axis in Organ Fibrosis. *Front Immunol*. 24 oct 2018;9:2432.
453. Lin L, Li Y, Liu M, Li Q, Liu Q, Li R. The Interleukin-33/ST2 axis promotes glioma mesenchymal transition, stemness and TMZ resistance via JNK activation. *Aging*. 29 janv 2020;12(2):1685-703.
454. Sun Z, Ji N, Ma Q, Zhu R, Chen Z, Wang Z, et al. Epithelial-Mesenchymal Transition in Asthma Airway Remodeling Is Regulated by the IL-33/CD146 Axis. *Front Immunol* [Internet]. 2020 [cité 18 août 2022];11. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2020.01598>
455. Wang L, Zhang S, Wu H, Rong X, Guo J. M2b macrophage polarization and its roles in diseases. *J Leukoc Biol*. août 2019;106(2):345-58.
456. Chia YC, Kieneker LM, van Hassel G, Binnenmars SH, Nolte IM, van Zanden JJ, et al. Interleukin 6 and Development of Heart Failure With Preserved Ejection Fraction in the General Population. *J Am Heart Assoc*. juin 2021;10(11):e018549.
457. Markousis-Mavrogenis G, Tromp J, Ouwerkerk W, Devalaraja M, Anker SD, Cleland JG, et al. The clinical significance of interleukin-6 in heart failure: results from the BIOSTAT-CHF study. *Eur J Heart Fail*. 2019;21(8):965-73.
458. Liu J, Guan X, Ma X. Regulation of IL-27 p28 gene expression in macrophages through MyD88- and interferon- γ -mediated pathways. *J Exp Med*. 22 janv 2007;204(1):141-52.
459. Wei K, Pan C, Yao G, Liu B, Ma T, Xia Y, et al. MiR-106b-5p Promotes Proliferation and Inhibits Apoptosis by Regulating BTG3 in Non-Small Cell Lung Cancer. *Cell Physiol Biochem Int J Exp Cell Physiol Biochem Pharmacol*. 2017;44(4):1545-58.
460. Ling B, Liao X, Tang Q, Ye G, Bin X, Wang J, et al. MicroRNA-106b-5p inhibits growth and progression of lung adenocarcinoma cells by downregulating IGSF10. *Aging*. 29 juill 2021;13(14):18740-56.
461. Huang Z, Li S, Ma Y, Wu N, Yang Y. [Expression of MiR-148b-3p in Lung Adenocarcinoma and Its Correlation with Prognosis]. *Zhongguo Fei Ai Za Zhi Chin J Lung Cancer*. 20 mai 2019;22(5):306-11.

462. Fu Y, Li Y, Wang X, Li F, Lu Y. Overexpression of miR-425-5p is associated with poor prognosis and tumor progression in non-small cell lung cancer. *Cancer Biomark Sect Dis Markers*. 2020;27(2):147-56.
463. Zhou JS, Yang ZS, Cheng SY, Yu JH, Huang CJ, Feng Q. miRNA-425-5p enhances lung cancer growth via the PTEN/PI3K/AKT signaling axis. *BMC Pulm Med*. 24 août 2020;20(1):223.
464. van Rooij E, Sutherland LB, Liu N, Williams AH, McAnally J, Gerard RD, et al. A signature pattern of stress-responsive microRNAs that can evoke cardiac hypertrophy and heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 28 nov 2006;103(48):18255-60.
465. Yang K, Shi J, Hu Z, Hu X. The deficiency of miR-214-3p exacerbates cardiac fibrosis via miR-214-3p/NLRC5 axis. *Clin Sci*. 13 sept 2019;133(17):1845-56.
466. Aurora AB, Mahmoud AI, Luo X, Johnson BA, van Rooij E, Matsuzaki S, et al. MicroRNA-214 protects the mouse heart from ischemic injury by controlling Ca²⁺ overload and cell death. *J Clin Invest*. avr 2012;122(4):1222-32.
467. Wang HJ, Liu H, Lin YH, Zhang SJ. MiR-32-5p knockdown inhibits epithelial to mesenchymal transition and renal fibrosis by targeting SMAD7 in diabetic nephropathy. *Hum Exp Toxicol*. avr 2021;40(4):587-95.
468. Lan F, Yu H, Hu M, Xia T, Yue X. miR-144-3p exerts anti-tumor effects in glioblastoma by targeting c-Met. *J Neurochem*. oct 2015;135(2):274-86.
469. Cheng ZX, Song YX, Wang ZY, Wang Y, Dong Y. miR-144-3p serves as a tumor suppressor by targeting FZD7 and predicts the prognosis of human glioblastoma. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. sept 2017;21(18):4079-86.
470. Zhou J, Liu R. Upregulation of miR-144-3p expression attenuates glioma cell viability and invasion by targeting BCL6. *Exp Ther Med*. oct 2021;22(4):1157.
471. Cebula M, Schmidt EE, Arnér ESJ. TrxR1 as a Potent Regulator of the Nrf2-Keap1 Response System. *Antioxid Redox Signal*. 1 oct 2015;23(10):823-53.
472. Senftleben U, Cao Y, Xiao G, Greten FR, Krähn G, Bonizzi G, et al. Activation by IKK α of a Second, Evolutionary Conserved, NF- κ B Signaling Pathway. *Science*. 2001;293(5534):1495-9.
473. Liu Q, Weng J, Li C, Feng Y, Xie M, Wang X, et al. Attenuation of PM2.5-induced alveolar epithelial cells and lung injury through regulation of mitochondrial fission and fusion. *Part Fibre Toxicol*. 18 juill 2023;20:28.
474. Pardo M, Katra I, Schaeur JJ, Rudich Y. Mitochondria-mediated oxidative stress induced by desert dust in rat alveolar macrophages. *GeoHealth*. 6 mars 2017;1(1):4-16.
475. Wang B, Chan YL, Li G, Ho KF, Anwer AG, Smith BJ, et al. Maternal Particulate Matter Exposure Impairs Lung Health and Is Associated with Mitochondrial Damage. *Antioxidants*. 25 juin 2021;10(7):1029.
476. Gao M, Liang C, Hong W, Yu X, Zhou Y, Sun R, et al. Biomass-related PM2.5 induces mitochondrial fragmentation and dysfunction in human airway epithelial cells. *Environ Pollut Barking Essex 1987*. 1 janv 2022;292(Pt B):118464.
477. Park SR, Lee JW, Kim SK, Yu WJ, Lee SJ, Kim D, et al. The impact of fine particulate matter (PM) on various beneficial functions of human endometrial stem cells through its key regulator SERPINB2. *Exp Mol Med*. 2 déc 2021;53(12):1850-65.

478. Shiva S, Crawford JH, Ramachandran A, Ceaser EK, Hillson T, Brookes PS, et al. Mechanisms of the interaction of nitroxyl with mitochondria. *Biochem J.* 15 avr 2004;379(Pt 2):359-66.
479. Zhong J, Cayir A, Trevisi L, Sanchez-Guerra M, Lin X, Peng C, et al. Traffic-Related Air Pollution, Blood Pressure, and Adaptive Response of Mitochondrial Abundance. *Circulation.* 26 janv 2016;133(4):378-87.
480. Winckelmans E, Nawrot TS, Tsamou M, Den Hond E, Baeyens W, Kleinjans J, et al. Transcriptome-wide analyses indicate mitochondrial responses to particulate air pollution exposure. *Environ Health.* 18 août 2017;16:87.
481. Hara H, Kuwano K, Araya J. Mitochondrial Quality Control in COPD and IPF. *Cells.* août 2018;7(8):86.
482. Wiegman CH, Michaeloudes C, Haji G, Narang P, Clarke CJ, Russell KE, et al. Oxidative stress–induced mitochondrial dysfunction drives inflammation and airway smooth muscle remodeling in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *J Allergy Clin Immunol.* 1 sept 2015;136(3):769-80.
483. Zhou R, Yazdi AS, Menu P, Tschopp J. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature.* janv 2011;469(7329):221-5.
484. Leclercq B, Kluza J, Antherieu S, Sotty J, Alleman LY, Perdrix E, et al. Air pollution-derived PM2.5 impairs mitochondrial function in healthy and chronic obstructive pulmonary diseased human bronchial epithelial cells. *Environ Pollut.* 1 déc 2018;243:1434-49.
485. Zorov DB, Vorobjev IA, Popkov VA, Babenko VA, Zorova LD, Pevzner IB, et al. Lessons from the Discovery of Mitochondrial Fragmentation (Fission): A Review and Update. *Cells.* févr 2019;8(2):175.
486. Stotland A, Gottlieb RA. Mitochondrial quality control: Easy come, easy go. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res.* 1 oct 2015;1853(10, Part B):2802-11.
487. Guo Z, Hong Z, Dong W, Deng C, Zhao R, Xu J, et al. PM2.5-Induced Oxidative Stress and Mitochondrial Damage in the Nasal Mucosa of Rats. *Int J Environ Res Public Health.* févr 2017;14(2):134.
488. Zou L, Li B, Xiong L, Wang Y, Xie W, Huang X, et al. Urban fine particulate matter causes cardiac hypertrophy through calcium-mediated mitochondrial bioenergetics dysfunction in mice hearts and human cardiomyocytes. *Environ Pollut.* 15 juill 2022;305:119236.
489. Vigié P, Camougrand N. Mitophagie et contrôle qualité des mitochondries. *médecine/sciences.* 1 mars 2017;33(3):231-7.
490. Yamini B. Nfkb1/p50 and mammalian aging. *Oncotarget.* 30 janv 2015;6(6):3471-2.
491. Casal JI, Bartolomé RA. Beyond N-Cadherin, Relevance of Cadherins 5, 6 and 17 in Cancer Progression and Metastasis. *Int J Mol Sci.* 9 juill 2019;20(13):3373.
492. Hazan RB, Qiao R, Keren R, Badano I, Suyama K. Cadherin Switch in Tumor Progression. *Ann N Y Acad Sci.* 2004;1014(1):155-63.
493. Kaszak I, Witkowska-Piłaszewicz O, Niewiadomska Z, Dworecka-Kaszak B, Ngosa Toka F, Jurka P. Role of Cadherins in Cancer—A Review. *Int J Mol Sci.* 15 oct 2020;21(20):7624.
494. Kuo WT, Odenwald MA, Turner JR, Zuo L. Tight junction proteins occludin and ZO-1 as regulators of epithelial proliferation and survival. *Ann N Y Acad Sci.* 2022;1514(1):21-33.

495. Rastaldi MP, Ferrario F, Giardino L, Dell'Antonio G, Grillo C, Grillo P, et al. Epithelial-mesenchymal transition of tubular epithelial cells in human renal biopsies. *Kidney Int.* 1 juill 2002;62(1):137-46.
496. Ding L, Zhang Z, Shang D, Cheng J, Yuan H, Wu Y, et al. α -Smooth muscle actin-positive myofibroblasts, in association with epithelial–mesenchymal transition and lymphogenesis, is a critical prognostic parameter in patients with oral tongue squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med.* 2014;43(5):335-43.
497. Liu CY, Lin HH, Tang MJ, Wang YK. Vimentin contributes to epithelial-mesenchymal transition cancer cell mechanics by mediating cytoskeletal organization and focal adhesion maturation. *Oncotarget.* 18 avr 2015;6(18):15966-83.
498. Sökeland G, Schumacher U. The functional role of integrins during intra- and extravasation within the metastatic cascade. *Mol Cancer.* 18 janv 2019;18:12.
499. Wafai R, Williams ED, de Souza E, Simpson PT, McCart Reed AE, Kutasovic JR, et al. Integrin alpha-2 and beta-1 expression increases through multiple generations of the EDW01 patient-derived xenograft model of breast cancer—insight into their role in epithelial mesenchymal transition in vivo gained from an in vitro model system. *Breast Cancer Res BCR.* 2020;22:136.
500. Ju L, Zhou C. Integrin beta 1 enhances the epithelial-mesenchymal transition in association with gefitinib resistance of non-small cell lung cancer. *Cancer Biomark.* 1 janv 2013;13(5):329-36.
501. Margadant C, Sonnenberg A. Integrin–TGF- β crosstalk in fibrosis, cancer and wound healing. *EMBO Rep.* févr 2010;11(2):97-105.
502. van den Brûle S, Misson P, Bühling F, Lison D, Huaux F. Overexpression of cathepsin K during silica-induced lung fibrosis and control by TGF- β . *Respir Res.* 2005;6(1):84.
503. Chen B, You L, Wang Y, Stoner GD, You M. Allele-specific activation and expression of the K-ras gene in hybrid mouse lung tumors induced by chemical carcinogens. *Carcinogenesis.* 1 sept 1994;15(9):2031-5.

Résumé

Bien qu'une diminution conséquente de la pollution atmosphérique soit constatée depuis les années 1990, cette dernière demeure un problème de santé publique majeur, à l'origine de plus de 4,2 millions de décès prématurés par an dans le monde. À l'heure actuelle, l'attention des experts se concentre sur les particules ultrafines (PM_{0,1} ou PUF) en raison de leur capacité à transloquer dans la circulation systémique pour atteindre les organes périphériques où elles seront alors susceptibles d'avoir un impact néfaste. Néanmoins, les connaissances en termes de mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la toxicité de ces particules restent encore très parcellaires et demeurent, le plus souvent, centrées sur leur cible principale qu'est le poumon. Ainsi, ce projet de thèse avait pour objectifs principaux d'apporter des éléments novateurs sur la toxicocinétique (*i.e.*, distribution/persistance) et la toxicodynamique (*i.e.*, mécanismes physiopathologiques, voies de signalisation associées) de PUF prélevées en milieu urbain, d'une part, et les effets organo-spécifiques des PUF et l'utilisation des miARN circulants comme indicateurs d'exposition chronique et/ou cumulées aux PUF dans un modèle murin, d'autre part. Afin de répondre à ces interrogations, des souris Balb/cJRj ont été exposées durant 3 mois à différentes doses de PUF prélevées dans la zone urbaine de Lille, puis des analyses ont été réalisées au sein de différents organes-cibles richement vascularisés, et par conséquent directement exposés aux PUF lors de leur phase de translocation et de distribution systémique. Les résultats obtenus ont démontré que, dans l'ensemble des organes cibles, le potentiel oxydant intrinsèque des PUF induisait indéniablement la production d'espèces pro-oxydantes et l'activation de défenses antioxydantes en quantité suffisante pour rétablir un état d'homéostasie redox mais ne parvenant pas, cependant, à éviter l'apparition d'une réponse inflammatoire au niveau pulmonaire, cardiaque et cérébral. Des approches transcriptomiques réalisées au sein des poumons, organes cibles présentant les effets délétères les plus marqués, ont suggéré la dérégulation de nombreuses voies de signalisation en relation avec les réponses oxydante et inflammatoire, qui constituent les mécanismes centraux de toxicité des PUF mais aussi avec des mécanismes de toxicité plus originaux tels que la dysfonction mitochondriale, la transition épithélio-mésenchymateuse et le remodelage tissulaire, dont la modulation a également été validée d'un point de vue fonctionnel. Ces données prometteuses pourraient à terme contribuer à une meilleure prise de décision quant à la réduction des émissions des PUF de même qu'à la réactualisation des normes réglementaires actuellement en vigueur.

Mots clés : Pollution atmosphérique ; Particules ultrafines ; Exposition sub-chronique ; Souris Balb/cJRj ; Multi-organe ; Stress oxydant ; Inflammation ; Altérations transcriptomiques ; miARN ; Altérations mitochondriales ; Remodelage tissulaire.

Abstract

Although there has been a significant reduction in air pollution since the 1990s, it remains a major public health problem, responsible for over 4.2 million premature deaths worldwide every year. At present, experts' attention is focused on ultrafine particles (PM_{0,1} or UFP) because of their ability to translocate into the systemic circulation and reach peripheral organs, where they are likely to have a harmful impact. Nevertheless, the knowledge of the cellular and molecular mechanisms involved in the toxicity of these particles is still very patchy, and most often remains focused on their main target, the lung. Thus, the main objectives of this thesis project were to provide innovative insights into the toxicokinetics (*i.e.*, distribution/persistence) and toxicodynamics (*i.e.*, pathophysiological mechanisms, associated cell signaling pathways) of UFP collected in urban environments, on the one hand, and the organo-specific effects of UFP and the use of circulating miRNA as indicators of chronic and/or cumulative exposure to UFP in a mouse model, on the other hand. To answer these questions, Balb/cJRj mice were exposed for 3 months to various doses of UFP collected in the urban area of Lille, then analyzed in various target organs richly vascularized, and therefore directly exposed to UFP during their translocation and systemic distribution phase. The results showed that, in all target organs, the intrinsic oxidative potential of UFP undeniably induced the production of oxidative oxygen species and the activation of antioxidant defenses in sufficient quantities to restore a state of redox homeostasis, but were unable to prevent the onset of an inflammatory response in the lungs, heart and brain. Transcriptomic approaches carried out in the lungs, the target organ with the most marked deleterious effects, have suggested the deregulation of numerous signaling pathways in relation to oxidative and inflammatory responses, which constitute the central mechanisms of UFP toxicity, but also with more original toxicity mechanisms such as mitochondrial dysfunction, epithelial-mesenchymal transition and tissue remodeling, whose modulation has also been validated from a functional point of view. These promising data could ultimately contribute to better decision-making on the reduction of UFP emissions, as well as to the updating of current regulatory standards.

Key words: Air pollution; Ultrafine particles; Sub-chronic exposure; Balb/cJRj mice; Multi-organ; Oxidative stress; Inflammation; Transcriptomic alterations; miRNA; Mitochondrial alterations; Tissue remodeling.