THESE DE DOCTORAT

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE

Discipline : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie - Toxicologie

Soutenue publiquement le 16 juin 2026 par

ALUNNI Aurelia

Toxicité pulmonaire *in vitro* des aérosols organiques secondaires issus de la combustion de biomasse

---

Devant le jury composé de :

Barbara D'Anna, Directrice de recherche Université d'Aix-Marseille, LCE, CNRS, France	Présidente
Sonja Bonland, Ingénieure de recherche Université de Paris Cités, France	Examinatrice
Maurizio Gualtieri, Maître de conférences Université de Milano-Bicocca, Italie	Examinateur
Sebastiano Di Bucchianico, Chercheur Université de Rostock, Allemagne	Examinateur
Christelle Monteil, Professeure des universités Université de Rouen Normandie, France	Rapportrice
Isabelle Baudrimont, Professeure des universités Université de Bordeaux, France	Rapportrice
Guillaume Garçon, Professeur des universités Université de Lille, France	Directeur de thèse
Alexandre Albinet, Directeur de recherche	Co-directeur de thèse

A ma famille, aux vivants qui marchent à mes côtés et aux disparus qui illuminent encore mon chemin, unis dans mon cœur et dans cette réussite. Merci.

Remerciements

Liste des publications et participations aux conférences

1. Liste des publications réalisées ou prévues

1. **Alunni, A.**, Simonin, O., Barbier, G., Floreani, M., Albinet, A., Garçon, G., Trouiller, B. A549 and CI-hAELVi cell lines coculture as a new human alveolar epithelium model for air-liquid interface exposure. Toxicology in Vitro, 112, 106200, https://doi.org/10.1016/j.tiv.2026.106200, 2026

2. **Alunni, A.**, Albinet, A., Figeac, M., Blayac, M., Barbier, E., Delaval, M., Garçon, G. Reconsidering Controls in ALI Experiments: The Hidden Impact of Airflow Dynamics. ***En préparation*** *pour Environmental Science & Technology Letters.*

3. **Alunni A.**, Floreani M., Barbier G., Meneboo J.-P., Sebda S., Ferret C., Dermigny A., Beaumont J., El-Masri A., Pinto K., Ait-Ben Ahmad F., Barbier E., Carpentier J., Kumar V., Hayeck N., Baroudi M., Figeac M., Garçon G., Albinet A. Toxicological effects of secondary organic aerosols from daytime and nighttime oxidation of phenol and PAHs on an alveolar epithelium model exposed at the air-liquid interface. ***En préparation*** *pour Particle and Fibre Toxicology.*

2. Participations aux conférences durant la période de thèse :

1. **Alunni, A.**, Trouiller, B., Simonin, O., Garçon, G., M., Albinet, A. Characterization of a new alveolar epithelium co-culture model to study exposure to biomass burning at the air-liquid interface (ALI). Lung In Vitro event for innovative & predictive models (LIVe) 2024, Nice, France. ***Poster.***

2. **Alunni, A.**, Trouiller, B., Garçon, G., M., Albinet, A. Characterization of an enhanced alveolar epithelium model and exposure to polycyclic aromatic hydrocarbon (PAHs) secondary organic aerosols (SOAs) at the air-liquid interface (ALI). European Aerosol Conference (EAC) 2024, Tampere, Finlande. ***Présentation orale.***

3. **Alunni, A.**, Floreani, M., Barbier, G., Ferret, C., Dermigny, A., Gemayel, R., Beaumont, J., El-Masri, A., Pinto, K., Garçon, G., Trouiller, B., Albinet, A. Toxicological effects of laboratory-generated SOA from the day- and nighttime oxidation of PAHs and phenol on an enhanced alveolar epithelium model exposed at the air-liquid interface (ALI). European Aerosol Conference (EAC) 2025, Lecce, Italie. ***Présentation orale.***

4. **Alunni, A.**, Barbier, G., Floreani, M., Dermigny, A., Ferret, C., Beaumont, J., El-Masri, A., Pinto, K., Gemayel, R., Allouche, Y., Figeac, M., Barbier, E., Carpentier, J., Garçon, G., Trouiller, B., Albinet, A. Toxicological effects of secondary organic aerosols from daytime and nighttime oxidation of Phenol and PAHs on a new alveolar epithelium model exposed at the air-liquid interface. Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX) 2025, Athènes, Grèce. ***Poster.***

---

5. **Alunni, A.**, Verdin, A., Jaber, N., Allouche, Y., Hnaino, A., Barbier, E., Carpentier, J., Karoski, N., Fuvel, V., Bardou, J., Dermigny, A., Collet, S., Beaumont, J., Meunier, L., Claude, T., Aujay-Plouzeau, R., Ferret, C., Bocquet, N., Gemayel, R., Harb, S., Floreani, M., Barbier, G., El-Masri, A., Pinto, K., Fuvel, F., Blanquet, J-P., Temime-Roussel, B., D'Anna, B., Courcot, D., Ledoux, F., Garçon, G., Trouiller, B., Albinet, A. Evaluation of the toxicological effects of primary and aged logwood stove emissions on alveolar cells exposed at the air-liquid interface. European Aerosol Conference (EAC) 2025, Lecce, Italie. ***Poster (Verdin A.).***

6. **Alunni, A.**, El Mais, A., Trouiller, B., D'Anna, B., Garçon, G., Aït-Aïssa, S., Albinet, A. Understanding of the bioactivity and toxicity of secondary organic aerosols formed from the oxidation of biomass burning VOCs under day- and night-time conditions. Volatile Organic Compounds (VOCs) 2025, Guangzhou, Chine. ***Présentation Orale (Albinet A.).***

7. **Alunni, A.**, Albinet, A., Figeac, M., Blayac, M., Barbier, E., Delaval, M., Garçon, G. Airflow Is Not Inert: Mechanical Stress Drives Baseline Cellular Responses in Air ALI Systems – it's time for clean air control! International Aerosol Conference (IAC) 2026, Xi'an, Chine. ***Courte présentation Orale (Albinet A.).***

8. **Alunni A.**, Floreani M., Barbier G., Meneboo J.-P., Sebda S., Ferret C., Dermigny A., Beaumont J., El-Masri A., Pinto K., Ait-Ben Ahmad F., Barbier E., Carpentier J., Kumar V., Hayeck N., Baroudi M., Figeac M., Garçon G., Albinet A. Day- and Nighttime SOA from PAH, Phenol and mixture Precursors Turn into an Alveolar Toxic Nightmare at ALI exposure. International Aerosol Conference (IAC) 2026, Xi'an, Chine. ***Présentation Orale (Albinet A.).***

Résumé

La pollution aux particules fines ($PM_{2.5}$) dans l'air ambiant est un enjeu environnemental et sanitaire majeur. La combustion de biomasse représente une source importante de $PM_{2.5}$ en lien avec le chauffage résidentiel au bois, les feux de forêt, les pratiques d'écobuage, etc. Cette source émet également de grandes quantités de composés organiques de différentes volatilités, conduisant à la formation d'aérosols organiques secondaires (AOS) par des processus (photo)-chimiques et physiques ayant lieu dans l'atmosphère. Malgré leur contribution importante aux concentrations atmosphériques des $PM_{2.5}$, la toxicité pulmonaire induite par les AOS issus de l'oxydation de précurseurs émis par la combustion de biomasse est encore méconnue. Compte tenu de la très faible granulométrie des AOS (< 1µm), l'étude de leurs effets toxicologiques est particulièrement adaptée à des modèles *in vitro* d'épithélium alvéolaire en interface air-liquide (ALI), permettant une exposition physiologiquement plus représentative. Dans ce contexte, ce travail de thèse visait à caractériser la toxicité des AOS issus de précurseurs (hydrocarbures aromatiques polycycliques – HAP – et phénol) majoritairement émis lors de la combustion de biomasse, en s'appuyant sur un modèle alvéolaire *in vitro* exposé en ALI, intégrant la maîtrise des conditions d'exposition dynamique (sous flux d'air) comme étape essentielle à l'interprétation des réponses toxicologiques. Ainsi, un modèle de coculture alvéolaire humain, simple, stable et physiologiquement pertinent, a été développé et caractérisé pour des conditions d'exposition dynamique en ALI jusqu'à 72 h. Une attention particulière a été portée sur l'impact du flux d'air en lui-même. Les résultats obtenus ont montré que ce dernier induisait un stress mécanique résultant en un stimulus biologique actif associé à une réponse cellulaire et une forte signature génique de mécanotransduction. Il est donc apparu indispensable d'évaluer son impact en lien avec des marqueurs de toxicité ciblés afin de disposer d'une interprétation fiable des effets des polluants atmosphériques testés. Les résultats d'exposition ALI aux AOS de HAP et phénol, seuls ou en mélange, formés dans des conditions d'oxydation diurne (impliquant le radical OH) ou nocturne (impliquant le radical NO_3), ont montré que le potentiel toxique des AOS était gouverné par leurs propriétés physico-chimiques et leur durée d'exposition. Les réponses cellulaires observées ont suivi une trajectoire dynamique allant de l'activation de mécanismes de défense et de réparation jusqu'à l'installation de mécanismes adaptatifs. Au-delà de ces résultats toxicologiques, ce travail a souligné une limite méthodologique majeure : sans contrôle rigoureux des conditions d'exposition en ALI, toute interprétation toxicologique reste discutable.

Mots clés : Toxicité pulmonaire in vitro, Qualité de l'air, Interface air-liquide (ALI), Aérosols organiques secondaires (AOS), Biomarqueurs, Combustion de biomasse.

Abstract

Fine particulate matter ($PM_{2.5}$) air pollution is a major environmental and public health concern. Biomass burning accounts for a significant source of $PM_{2.5}$ linked to residential wood heating, wildfires, and agricultural open burning. This source also emits large quantities of organic compounds with varying volatilities, leading to the formation of secondary organic aerosols (SOA) through (photo)-chemical and physical processes occurring in the atmosphere. Despite their substantial contribution to atmospheric $PM_{2.5}$ concentrations, the pulmonary toxicity induced by SOA originating from the oxidation of biomass combustion precursors remains poorly understood. Given the small SOA particle size (< 1 µm), the study of their toxicological effects is particularly well suited to in vitro alveolar epithelial models cultured at the air-liquid interface (ALI), allowing for more physiologically relevant exposure conditions. In this context, the aim of this PhD work was to characterize the toxicity of SOA derived from precursors (polycyclic aromatic hydrocarbons - PAHs, and phenol) predominantly emitted during biomass combustion, using an *in vitro* alveolar model exposed at the ALI, while integrating the control of dynamic exposure conditions (under airflow) as a key step for the interpretation of the toxicological responses. Thus, a simple, stable, and physiologically relevant human alveolar co-culture model was developed and characterized by dynamic exposure conditions at the ALI up to 72 h. Particular attention was given to the impact of airflow itself. The results obtained showed that airflow induced mechanical stress, resulting in an active biological stimulus associated with cellular responses and a strong mechanotransduction genic signature. To ensure reliable interpretation of the effects of the tested atmospheric pollutants, it therefore essential to assess their impacts in relation to the targeted toxicity markers. ALI exposure experiments to SOA derived from PAHs and phenol, either individually or as mixtures, formed under daytime (involving OH radicals) or nighttime oxidation conditions (involving NO_3 radicals), showed that SOA toxic potential was governed by their physicochemical properties and exposure duration. The observed cellular responses followed a dynamic trajectory ranging from the activation of defense and repair mechanisms to the establishment of adaptive responses. Beyond these toxicological findings, this work highlighted a major methodological limitation: without rigorous control of ALI exposure conditions, any toxicological interpretation remains questionable.

Keys words: *In vitro* pulmonary toxicity, Air quality, Air-liquid interface, Secondary organic aerosols (SOA), Biomarkers, Biomass burning.

Table des matières

1. Remerciements 5

2. Liste des publications et participations aux conférences 6

1. Liste des publications réalisées ou prévues 6

2. Participations aux conférences durant la période de thèse : 6

3. Résumé 9

4. Abstract 10

5. Table des matières 11

6. Liste des abréviations 15

7. Liste des noms de protéines/gènes en anglais 18

1. Chapitre 1 – Introduction générale et objectifs de la thèse 25

Contexte 25

Objectifs de la thèse 28

Organisation du manuscrit 29

2. Chapitre 2 – Etat de l'art 33

2.1. Les aérosols atmosphériques 33

2.1.1. Définition 33

2.1.2. Origine, processus d'émission et de formation des aérosols 33

2.1.3. Granulométrie des particules atmosphériques 35

2.1.4. Composition chimique des particules atmosphériques 37

2.1.6. Impact sur le climat et la santé des aérosols et réglementation 44

2.2. La combustion de biomasse et le chauffage résidentiel au bois 48

2.2.1. Une source majeure de $PM_{2.5}$ 48

2.2.2. Une source prépondérante d'AOP et d'AOS 49

2.2.3. Précurseurs d'AOS émis par la combustion de biomasse 50

2.3. L'appareil respiratoire et la pénétration des particules 53

2.3.1. Rappel anatomique de la structure de l'appareil respiratoire 53

2.3.2. Rappel physiologique des épithéliums pulmonaires 56

2.3.3. Distribution, mécanismes d'élimination et absorption des polluants inhalés 60

2.4. Impact sanitaire et toxicité induite par les particules fines _____ 64

2.4.1. Impact sanitaire des particules fines _____ 64

2.4.2. Impacts sanitaires des émissions de la combustion de biomasse _____ 66

2.4.3. Impact sanitaire des aérosols organiques secondaires _____ 67

2.4.4. Toxicité pulmonaire et mécanismes cellulaires _____ 69

2.4.5. Toxicité pulmonaire spécifique des AOS et verrous scientifiques _____ 80

2.5. Approches pour l'étude *in vitro* de la toxicité des PM et des AOS _____ 89

2.5.1. L'interface air-liquide (ALI) : définition, avantages et inconvénients _____ 89

2.5.2. Modèles alvéolaires en interface air-liquide (ALI) : vers une représentation plus physiologique de la toxicité inhalée _____ 92

2.5.3. Comment simuler au mieux l'exposition aux aérosols ? _____ 101

2.6. Synthèse bibliographique des études de la toxicité des AOS par exposition ALI __ 119

3. Chapitre 3 – Matériels et méthodes _____ 135

3.1. Matériels biologiques_____ 135

3.2. Développement et caractérisation d'un modèle cellulaire d'épithélium alvéolaire pour l'exposition en IAL _____ 136

3.2.1. Développement et mise en place du modèle d'épithélium alvéolaire _____ 136

3.2.2. Optimisation de l'exposition du modèle cellulaire à l'ALI _____ 139

3.2.3. Caractérisation biologique du modèle cellulaire _____ 142

3.3. Etude de la toxicité *in vitro* des AOS issus de l'oxydation de HAP et du phénol en ALI _____152

3.3.1. Génération des AOS à partir de précurseurs purs en laboratoire _____ 152

3.3.1. Détermination des concentrations en précurseurs d'AOS injectés _____ 157

3.3.2. Caractérisation physico-chimique des AOS générés _____ 158

3.3.3. Détermination des conditions de réactivité _____ 161

3.3.4. Exposition des cellules en ALI aux AOS générés _____ 162

3.3.5. Détermination de la dose d'AOS déposée sur les cellules _____ 164

3.3.6. Séparation des lots, tests et préparation des échantillons _____ 168

3.3.7. Analyses du stress oxydant _____ 169

3.3.8. Analyses transcriptomique 3'RNAseq _____ 170

3.4. Assurance qualité et contrôles qualité _____ 172

3.4.1. Génération des AOS et exposition ALI _____ 172

3.4.2. Mesures et analyses physico-chimiques _____ 172

3.4.3. Exposition ALI – Identification des risques et actions mises en place _____ 173

3.4.4. Contrôles négatifs et positifs des tests toxicologiques _____ 181

3.4.5. Analyse, statistiques et présentation des données _____ 184

4. Chapitre 4 : Résultats et discussion _____ 187

4.1. Développement et caractérisation d'un modèle simulant l'épithélium alvéolaire pour des études de toxicité *in vitro* en ALI _____ 188

4.1.1. Optimisation des conditions de culture de la coculture A549/hAELVi _____ 188

4.1.2. Optimisation du modèle A549 par supplémentation du milieu nutritif en acide rétinoïque (AR) _____ 196

4.1.3. Coculture des lignées cellulaires A549 et Ci-hAELVi comme nouveau modèle d'épithélium alvéolaire humain pour l'exposition à l'interface air-liquide _____ 205

4.2. Impact du flux d'air seul sur les réponses biologiques des cellules _____ 225

4.2.1. Flux d'air dynamique en ALI : une variable expérimentale encore sous-estimée _____ 225

4.2.2. Manque d'harmonisation et rôle crucial des paramètres d'exposition dans les études en ALI _____ 227

4.2.3. Le flux d'air induit une réponse biologique cachée au-delà des paramètres classiques de viabilité 229

4.2.4. Le stress mécanique dû au flux d'air est-il inévitable ? _____ 243

4.3. Effets toxicologiques des AOS de HAP et phénol sur des cellules alvéolaires exposées en ALI _____ 248

4.3.1. Compréhension de la compétition des oxydants, de la photolyse et des différents précurseurs d'AOS dans le réacteur d'oxydation à écoulement PAM-OFR _____ 248

4.3.2. Concentrations, morphologie et granulométrie des AOS générés _____ 252

4.3.3. Composition chimique des particules d'AOS générés _____ 257

4.3.4. Déposition des particules d'AOS sur les cellules _____ 262

4.3.5. Evaluation des réponses toxicologiques selon le type d'AOS et les conditions expérimentales _____ 265

4.3.6. Liens entre les caractéristiques physico-chimiques des AOS générés et leurs effets toxicologiques induits _____ 278

4.3.7. Une signature transcriptionnelle globale identifiable des AOS HAP et phénol typiques des AOS de combustion de biomasse ? _____ 281

4.3.8. Effet de la durée d'exposition _____ 291

5. Conclusions générales _____ 305

6. Perspectives _____ 315

6.1. Perspectives directes à court terme _____ 315

6.2. Perspectives à moyen terme _____ 317

6.3. Perspectives à long terme et générales _____ 319

7. Références bibliographiques _____ 327

8. Annexe 1 – Données complémentaires « A549 and CI-hAELVi Cell Lines Coculture as a New Human Alveolar Epithelium Model for Air-Liquid Interface Exposure » _____ 405

9. Annexe 2 – Tableau non exhaustif des études d'exposition dynamique ALI _____ 433

10. Annexe 3 – Tableau des gènes différentiellement dérégulés lors des expositions aux AOS _____ 449

Liste des abréviations

A549	*Human lung adenocarcinoma epithelial cells*
ACE	Acénaphtène
ACSM	*Aerosol chemical speciation monitor*
ACY	Acénaphtylène
ADN	Acide désoxyribonucléique
ALI	*Air liquide interface*
AO	Aérosols organiques
AOP	Aérosols organiques primaires
AOS	Aérosols organiques secondaires
AR	Acide rétinoïque
ARN	Acide ribonucléique
AT1	*Alveolar type 1 cell*
AT2	*Alveolar type 2 cell*
BPCO	Bronchopneumopathie chronique obstructive
COSV	Composés organiques semi-volatils
COV	Composés organiques volatils
COVI	Composés organiques de volatilité intermédiaire
CPC	*Condensation particle counter*
DMA	*Differential mobility analyser*

DMSO	Diméthylsulfoxyde
EC	*Elemental carbon*
FC	*Fold change*
hAELVi	*Human alveolar epithelial lentivirus immortalized cells*
HAP	Hydrocarbures aromatiques polycycliques
HR	Humidité relative
iPSC	*Induit pluripotent stem cell*
LFR	*Laminar flow reactor*
MA	Macrophage alvéolaire
MEB	Microscopie électronique à balayage
MET	Microscopie électronique à transmission
NAPH	Naphtalène
ND	Non détecté
NP	Nanoparticules
NR	Non renseigné
OC	*Organic Carbon*
OMS	Organisation mondiale de la santé
PFA	Paraformaldéhyde
PM	*Particulate matter*
PSL	*Polystyrene latex*

PT1	Pneumocyte de type 1
PT2	Pneumocyte de type 2
PTR-MS	Proton-Transfer-Reaction Mass Spectrometry
QCM	*Quartz crystal microbalance*
ROS	*Reactive oxygen species*
SMPS	*Scanning mobility particle sizer*
TA	Température ambiante
TBS	Solution saline tamponnée au Tris
TEER	*Transepithelial electrical resistance*

Note : Certains termes sont volontairement conservés en anglais dans ce manuscrit (signalés en italique). Ces choix terminologiques s'expliquent par leur usage prédominant et consensuel dans la littérature scientifique internationale, ainsi que par l'absence d'équivalent français strictement établi ou couramment employé. Afin de garantir la précision scientifique et la cohérence avec les publications de référence du domaine, ces termes sont maintenus dans leur formulation originale : par exemple *Particulate Matter*, PM.

Liste des noms de protéines/gènes en anglais

AhR	*Aryl hydrocarbon receptor*
AhRR	*Aryl hydrocarbon receptor repressor*
AKR1B1	*Aldo-keto reductase family 1 member B*
AKT	*AKT serine/threonine kinase 1*
ANLN	*Anillin, actin binding protein*
AQP5	*Aquaporin 5*
BDKRB2	*Bradykinin receptor B2*
BEST2	*Bestrophin 2*
CAT	*Catalase*
CAV-1	*Caveolin-1*
CAVIN3	*Caveolae associated protein 3*
CCL2	*C-C motif chemokine ligand 2*
CCT6B	*Chaperonin containing TCP1 subunit 6B*
CDH	*Cadherin*
CEMIP	*Cell migration inducing hyaluronidase 1*
COX	*Cytochrome c oxidase assembly factor*
CXCL	*C-X-C motif chemokine ligand*
CYP1A1	*Cytochrome P450 family 1 subfamily A member 1*
CYP1B1	*Cytochrome P450 family 1 subfamily B member 1*

CYP2E1	*Cytochrome P450 family 2 subfamily E member 1*
FOSB	*FosB proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit*
GSN	*Gelsolin*
HMOX1	*Heme oxygenase 1*
HTI-56	Human Lung Alveolar Type 1 (56 kDa)
HTII-280	Human Lung Alveolar Type 2 (280 kDa)
ICAM-1	*Intercellular adhesion molecule*
IDNK	*IDNK gluconokinase*
IL-	*Interleukine*
KCNE	*Potassium voltage-gated channel subfamily E regulatory*
KEAP1	*Kelch like ECH associated protein 1*
KIFC1	*Kinesin family member C1*
KRT14	*Keratin 14*
KRTAP2-3	*Keratin associated protein 2-3*
LCN2	*Lipocalin 2*
LDH	*Lactate dehydrogenase*
MAPK	*Mitogen-activated protein kinase*
MMP	*Matrix metallopeptidase*
mTOR	*Mechanistic target of rapamycin kinase*
MUC-	*Mucins*

NRF2/NFE2L2	*Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2*
PCK1	*Phosphoenolpyruvate carboxykinase 1*
PDPN	*Podoplanin*
PEX6	*Peroxisomal biogenesis factor 6*
PI3K	*Phosphoinositide-3-kinase*
PLAT	*Plasminogen activator, tissue type*
PLXNC1	*Plexin C1*
PPP1R3F	*Protein phosphatase 1 regulatory subunit 3F*
PRDX2	*Peroxiredoxin 2*
RAGE/AGER	*Advanced glycosylation end-product specific receptor*
SERPINA5	*Serpin family A member 5*
SOD1	*Superoxide dismutase 1*
SP-	*Surfactant proteins*
SPP1	*Secreted phosphoprotein 1*
TDO2	*Tryptophan 2,3-dioxygenase*
TJP-1	*Tight junction protein-1*
TNF	*Tumor necrosis factor*
TP53	*Tumor protein 53*
TRIM31	*Tripartite motif containing 31*
UGT2B10	*UDP glucuronosyltransferase family 2 member B10*

UPP1 *Uridine phosphorylase 1*

ZO-1 *Zonula occluding 1*

Note : Les noms des gènes et protéines sont indiqués conformément à la nomenclature officielle internationale (HUGO Gene Nomenclature Committee, HGNC pour les gènes humains) et sont conservés en anglais. Contrairement aux protéines, les gènes sont nommés en italiques. Cette convention, universellement adoptée dans la littérature scientifique, permet d'assurer la cohérence, la reproductibilité et l'absence d'ambiguïté terminologique.

Chapitre 1 – Introduction générale et objectifs de la thèse

Chapitre 1 – Introduction générale et objectifs de la thèse

Contexte

La pollution atmosphérique, et en particulier la matière particulaire (PM, *Particulate matter*) ou particules atmosphériques, a un impact majeur sur le climat, les écosystèmes et la santé humaine (Pope et al., 2002; World Health Organization, 2013; Kinney, 2018; Sharma et al., 2020; He et al., 2021; Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC), 2023; Wang, Yang, et al., 2023; Thiagarajan et al., 2024; Liu and Zhang, 2025; Perumpully and Gautam, 2025; Peng et al., 2026). Outre les modifications environnementales, l'exposition chronique aux particules est associée à une augmentation de la morbidité et de la mortalité liée à des pathologies cardiovasculaires, pulmonaires, neurologiques, et digestives de même que par certaines pathologies inflammatoires systémiques (Pope et al., 2002; Brook, 2008; Heal et al., 2012; Kim et al., 2015, 2018; Lelieveld et al., 2015; Landrigan, 2017; Rajagopalan et al., 2018; Fu et al., 2019; Hahad et al., 2020; Turner et al., 2020; de Bont et al., 2022; Fuller et al., 2022; Arfin et al., 2023; Louis et al., 2023; Abdul-Rahman et al., 2024; Agarwal et al., 2024; World Health Organization, 2024; European Environment Agency, 2025). Les voies respiratoires constituent la principale porte d'entrée des PM dans l'organisme, favorisant l'apparition de nombreuses pathologies respiratoire et systémiques (Kim et al., 2015; Tarín-Carrasco et al., 2021; Hoffmann et al., 2022; Pozzer et al., 2023; Yu et al., 2024). Selon l'Organisation mondiale de la santé (OMS), environ 4,2 millions de décès prématurés sont attribués chaque année à l'exposition à la pollution de l'air ambiant dont 68 % seraient dus à des cardiopathies ischémiques et à des accidents vasculaires cérébraux, 14 % à la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO), 14 % à des infections aiguës des voies respiratoires inférieures, et 4 % à des cancers du poumon (OMS, 2024).

Parmi ces PM, les particules fines ($PM_{2.5}$) représentent une fraction particulièrement préoccupante en raison de leur capacité à pénétrer profondément dans l'arbre respiratoire jusqu'à la région alvéolaire (Salo et al., 2021). À l'échelle mondiale, la pollution aux $PM_{2.5}$ contribue de manière significative à la charge sanitaire globale (Tarín-Carrasco et al., 2021; OMS, 2024). A l'échelle Européenne, l'impact sanitaire demeure particulièrement marqué,

avec 182 000 à 904 000 décès prématurés attribuables annuellement au $PM_{2.5}$, selon les estimations (Tarín-Carrasco et al., 2021; European Environment Agency, 2025). Cependant des incertitudes persistent quant à l'évaluation précise de l'impact global des $PM_{2.5}$, notamment en raison de la diversité de leurs sources d'exposition, de leurs compositions chimiques et de leurs effets biologiques associés (Pozzer et al., 2023).

Parmi les sources d'émissions primaires de PM dans l'atmosphère, la combustion de biomasse au sens large (feux de forêts, chauffage domestique au bois, brûlage des déchets vert, d'écobuage, etc.) contribue de façon substantielle aux concentrations atmosphériques de $PM_{2.5}$ observées dans l'air ambiant (Andreae and Merlet, 2001; Chafe et al., 2014; Chen et al., 2017; Andreae, 2019; Hopke et al., 2020; Song et al., 2022; Tessum et al., 2022; Burke et al., 2023; Huang and Skidmore, 2025). Ces particules primaires sont essentiellement carbonées comprenant une fraction organique (aérosol organique primaire – AOP) et du carbone suie. La combustion de biomasse émet également de grandes quantités de composés organiques, couvrant une large gamme de volatilité : Composés Organiques Volatils, de Volatilité Intermédiaire et Semi-Volatils (COV, COVI et COSV) (McDonald et al., 2000; Schauer et al., 2001; Pettersson et al., 2011; Evtyugina et al., 2014; Hatch et al., 2015, 2017; Baudic et al., 2016; Bruns et al., 2016; Hartikainen et al., 2018; Ahern et al., 2019; Akherati et al., 2020; Růžičková et al., 2022). Dans l'atmosphère, sous l'action de différents processus physiques et (photo-)chimiques, ces espèces vont conduire à la formation d'Aérosols Organiques Secondaires (AOS, particules organiques formées dans l'atmosphère par des réactions de nucléation, condensation, coagulation et oxydation) (Hallquist et al., 2009; Ziemann and Atkinson, 2012) contribuant significativement aux concentrations de $PM_{2.5}$ dans l'air ambiant (Ciarelli et al., 2017; Kelly et al., 2018; Olsen et al., 2020).

Si la toxicité des particules primaires issues de la combustion de biomasse a largement été étudiée et documentée, celle des AOS formés à partir de ces émissions demeurent insuffisamment caractérisée (Naeher et al., 2007; Kocbach Bølling et al., 2009; Sigsgaard et al., 2015; Chen et al., 2017; Kelly and Fussell, 2020; Pardo, Li, et al., 2020; Schwartz et al., 2020; Karanasiou et al., 2021; Pardo et al., 2024). L'évaluation toxicologique des PM repose historiquement sur des approches *in vivo*, qui ont permis d'identifier de nombreux effets sanitaires associés à l'exposition aux $PM_{2.5}$. Cependant, ces approches présentent des limites éthiques, logistiques et expérimentales. Dans ce contexte, le développement de

Nouvelles Approches Méthodologique (NAMs) permet de s'inscrire dans la démarche de 3R (Remplacer, Réduire et Raffiner) (W. M. S. Russell, R. L. Burch, 1960; Paul Flecknell, 2002; Tannenbaum and Bennett, 2015; Hubrecht and Carter, 2019). Ainsi, le développement de modèles *in vitro* constitue une alternative pertinente pour l'étude des effets cellulaires des PM, en particulier lorsqu'ils permettent de reproduire des conditions d'exposition réalistes. Parmi ces approches, l'exposition de modèles cellulaires d'épithélium pulmonaire en interface air-liquide (ALI, *Air-Liquid Interface*), représente une stratégie expérimentale particulièrement adaptée aux études d'inhalation en permettant une exposition directe des cellules aux aérosols dans des conditions plus représentatives de la physiologie respiratoire (Lacroix et al., 2018; Upadhyay and Palmberg, 2018; Chen and Schoen, 2019; Baldassi et al., 2021; Jaber and Billet, 2024; Salana and Verma, 2024).

Malgré les avancées récentes dans le développement de ces approches, relativement peu d'études ont porté sur les effets toxiques des particules émises par la combustion de biomasse dans des conditions d'exposition ALI (Hawley and Volckens, 2013; Mülhopt et al., 2016; Kanashova et al., 2018; Upadhyay and Palmberg, 2018; Ihantola et al., 2020, 2022; Chen, Zhang, et al., 2024; Dilger et al., 2024; Pardo et al., 2024). Cette limitation est encore plus marquée pour les effets toxiques des émissions vieillies (secondaires) ou des AOS formés à partir des émissions de combustion de biomasse (Künzi et al., 2013; Krapf et al., 2017; Chowdhury et al., 2018, 2019; Pardo, Czech, et al., 2023; Offer et al., 2024). Pourtant, l'approche ALI apparaît particulièrement prometteuse pour améliorer la compréhension des mécanismes cellulaires impliqués lors d'expositions aux polluants atmosphériques et semble être un outil de choix pour renforcer l'évaluation des risques sanitaires qui y sont associés (Paur et al., 2011; Lacroix et al., 2018; Baldassi et al., 2021; Cao et al., 2021; Jaber and Billet, 2024; Salana and Verma, 2024; Navarrete-Aliaga et al., 2025).

Objectifs de la thèse

Dans ce contexte, ce travail de thèse visait à caractériser la toxicité des AOS issus de précurseurs clés (hydrocarbures aromatiques polycycliques – HAP – et phénol) majoritairement émis lors de la combustion de biomasse, en s'appuyant sur un modèle alvéolaire *in vitro* exposé en ALI, intégrant la maîtrise des conditions d'exposition dynamique comme étape essentielle à l'interprétation des réponses toxicologiques. Il est articulé autour de trois axes principaux :

1. Développement et optimisation d'un nouveau modèle d'épithélium alvéolaire humain pour l'exposition en ALI

Un modèle de coculture, en ALI, reposant sur l'association de lignées alvéolaires humaines, a été développé afin de reproduire certaines caractéristiques structurales et fonctionnelles de l'épithélium alvéolaire humain. Les conditions de culture et les paramètres d'exposition en ALI ont été optimisés afin d'assurer la stabilité morphologique et fonctionnelle du modèle et sa compatibilité avec des expositions prolongées.

2. Caractérisation de l'impact biologique intrinsèque du flux d'air dans des conditions d'exposition dynamique en ALI

L'impact biologique du flux d'air seul, indépendamment de toute exposition à des polluants, a été évalué afin d'identifier les réponses cellulaires induites par les contraintes mécaniques associées aux expositions dynamiques. Cette étape visait à mieux comprendre l'état basal induit par le flux d'air, nécessaire à une interprétation fiable des effets toxicologiques observés lors d'expositions aux AOS.

3. Evaluation toxicologique des AOS issus de l'oxydation de HAP et du phénol

Des AOS ont été générés en laboratoire à partir de HAP et de phénol, seuls ou en mélange, en conditions d'oxydation diurne (radical OH) et nocturne (radical NO_3). Les effets toxicologiques ont été évalués aux échelles cellulaire et moléculaire, puis mis en relation avec les caractéristiques physico-chimiques des AOS, afin d'identifier les paramètres influençant leur potentiel toxique lors d'expositions en ALI.

Organisation du manuscrit

A la suite de ce chapitre introductif, le manuscrit de thèse est divisé en trois chapitres :

- **Le chapitre 2** est consacré à l'état de l'art relatif aux travaux présentés dans ce manuscrit. Il débute par une présentation générale des aérosols atmosphériques puis des émissions issues de la combustion de biomasse, incluant leur contribution à la qualité de l'air, leurs caractéristiques physico-chimiques et les processus de formation des particules secondaires, notamment des AOS. Il se concentre ensuite sur la relation entre la structure de l'arbre respiratoire et la pénétration des particules pour expliquer les impacts sanitaires associés. Enfin, ce chapitre aborde la toxicité potentielle des particules atmosphériques et présente les principales approches expérimentales utilisées pour l'étude *in vitro* de la toxicité des PM et des AOS, en mettant l'accent sur les modèles cellulaires alvéolaires et leur exposition en ALI.

- **Le chapitre 3** décrit le matériel, les méthodes et le déroulement expérimental suivi pour ces travaux. Il commence par une description des expériences qui ont permis le développement et la caractérisation du modèle de coculture et son exposition en ALI. Il aborde ensuite les méthodes utilisées pour la génération, la caractérisation et l'exposition du modèle cellulaire aux AOS. Les méthodes utilisées pour déterminer la dose de particules déposée à la surface des cellules ainsi que les techniques d'analyses toxicologiques pratiquées sont ensuite détaillées. Enfin, ce chapitre se termine par la description des méthodes mises en œuvre pour contrôler et assurer la qualité des expériences et des résultats obtenus.

- **Le chapitre 4** présente et discute l'ensemble des résultats obtenus au cours de ce travail de thèse. Il est structuré en trois parties successives. La première partie est dédiée au développement et à la caractérisation d'un modèle de coculture alvéolaire, incluant l'optimisation des conditions d'exposition en ALI. La deuxième partie porte sur la caractérisation de l'impact biologique intrinsèque du flux d'air seul sur les cellules, permettant d'identifier les effets associés aux contraintes

mécaniques induites par l'exposition dynamique. Enfin, la troisième partie est consacrée à l'évaluation des effets toxicologiques des AOS issus de l'oxydation de HAP et de phénol, en relation avec leurs caractéristiques physico-chimiques, lors d'expositions en ALI.

Le manuscrit se conclut par une synthèse des principaux résultats, une discussion de leurs limites et propose une ouverture vers différentes perspectives de recherche.

Chapitre 2 – Etat de l’art

Chapitre 2 – Etat de l'art

2.1. Les aérosols atmosphériques

2.1.1. Définition

L'atmosphère est une structure complexe, qui évolue et interagit en permanence avec les compartiments environnementaux. Principalement composée de diazote (N_2), dioxygène (O_2) et divers gaz comme le dioxyde de carbone (CO_2), elle comprend aussi des composés organiques volatiles (COV), semi-volatils (COSV) ainsi que de la vapeur d'eau. L'atmosphère est aussi le réceptacle de grandes quantités de particules solides ou liquides en suspension, dont l'exemple le plus connu est les nuages. Dans le domaine des sciences atmosphériques, il existe cependant une distinction entre les nuages et les autres particules en suspension dans l'atmosphère.

Ainsi, à l'exception des hydrométéores tels que les gouttelettes d'eau nuageuse, les cristaux de glace, la pluie ou encore les flocons de neige, toutes particules solides ou liquides en suspension dans l'air ambiant sont appelées les aérosols atmosphériques (Pöschl, 2005). L'ensemble de toutes ces particules forme la matière particulaire (PM, *Particulate matter*) qui est un mélange complexe de substances chimiques organiques et inorganiques dans l'atmosphère.

2.1.2. Origine, processus d'émission et de formation des aérosols

Les aérosols atmosphériques proviennent d'une grande diversité de sources naturelles et anthropiques. Les sources naturelles d'émission de PM en suspension dans l'air incluent les feux de forêts, les éruptions volcaniques, les embruns marins ou encore les poussières issues de l'érosion des sols, des débris végétaux, des pollens et des spores tandis que les sources anthropiques comprennent principalement des processus de combustion de biomasse et de combustibles fossiles (Figure 2. 1.) (Viana et al., 2014).

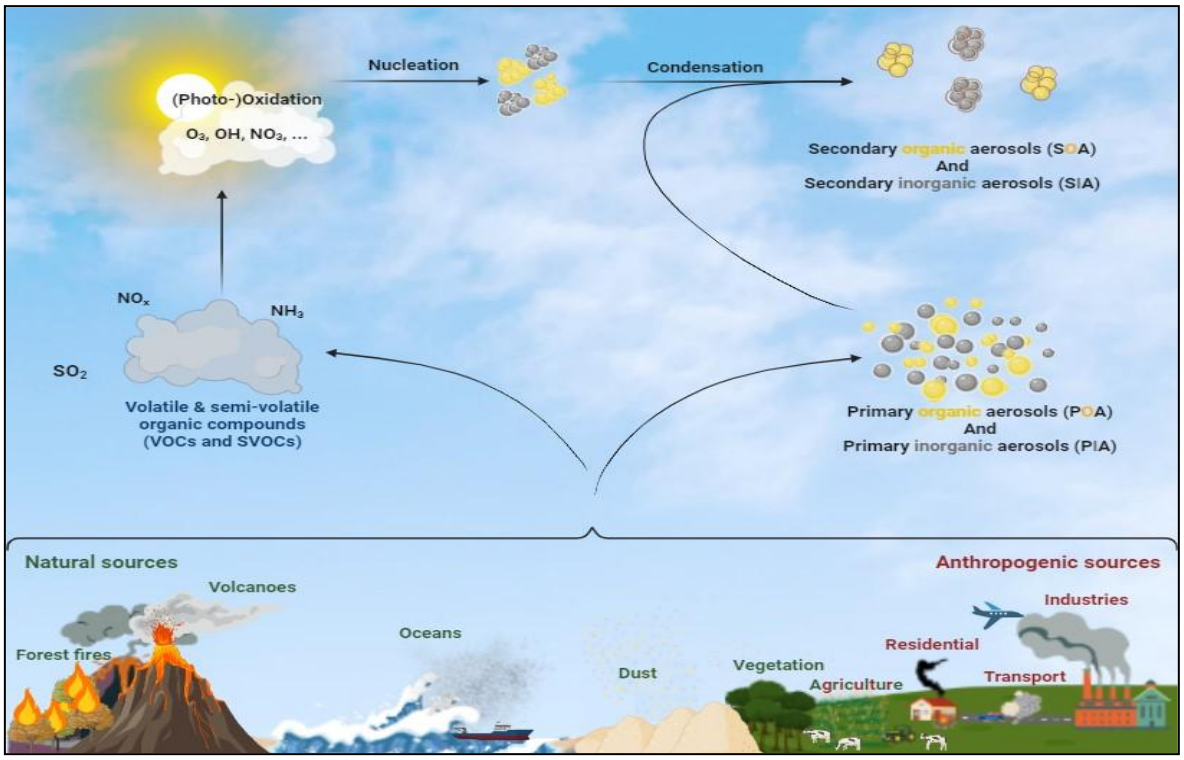


Figure 2. 1. : Schéma simplifié représentant l'origine, les sources, processus d'émission et de formation des aérosols dans l'atmosphère.

Classiquement, sont distingués les particules ou aérosols (gaz + particules) primaires qui sont rejetés directement dans l'atmosphère, et les particules ou aérosols secondaires formés par divers processus de conversion gaz-particules. De nouvelles particules sont formées par nucléation et condensation des espèces formées lors de réactions de (photo)-oxydation à partir de précurseurs volatils ou semi-volatils tels que l'ammoniac (NH_3), les oxydes de soufre (SO_x), les oxydes d'azote (NO_x) les composés volatils (COV), volatils intermédiaires (COVI) et semi-volatils (COSV) (Raes et al., 2000; Pöschl, 2005; Monks et al., 2009; Seinfeld and Pandis, 2016).

A l'échelle mondiale, les émissions naturelles dominent largement la masse totale des aérosols atmosphériques : près de 98 % des émissions primaires et secondaires, leurs sont attribuées, principalement sous forme d'embruns marins et de poussières minérales, reléguant les activités humaines à une contribution marginale (2 %), en apparence. A cette échelle, les aérosols primaires (98 %) dominent nettement les aérosols secondaires (2 %). Ce constat, rassurant à première vue, s'effondre pourtant dès que l'on resserre l'observation à l'échelle locale, où les contributions anthropiques jouent un rôle majeur dans la

composition des PM, avec comme principaux contributeurs les gaz d'échappement, les sulfate, nitrates et poussières d'origine anthropique. Bien que la quantification précise des sources à cette échelle demeure complexe et variable selon les villes et régions, l'environnement urbain européen illustre clairement cette inversion : les sources anthropiques s'imposent comme principales sources d'émission, pouvant atteindre jusqu'à 80 % des émissions locales. Le rapport entre particules primaires et secondaires s'y trouve également renversé, avec une prédominance des aérosols secondaires atteignant 64 %. Autrement dit, derrière l'illusion d'une domination naturelle globale se dissimule, à hauteur d'homme, une empreinte anthropique massive et difficilement contestable.

L'impact de l'homme sur la qualité de l'air est désormais indubitable, dans une société où la gestion de notre environnement et le besoin de connaissances à son sujet sont au cœur des discussions sociétales. Notre période, connue sous le nom d'« anthropocène », est à présent l'ère dans laquelle les activités anthropiques impactent la Terre à la plus large échelle (Crutzen and Stoermer, 2000). Aujourd'hui plus que jamais, les problématiques liées à la pollution atmosphérique sont d'un intérêt grandissant compte tenu des effets avérés sur la Terre, son climat et ses habitants (Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC), 2023).

2.1.3. Granulométrie des particules atmosphériques

La taille des particules atmosphériques constitue un paramètre fondamental qui permet de décrire leur comportement et leur durée de vie dans l'atmosphère ainsi que leurs propriétés physico-chimiques et leur dépôt dans l'arbre pulmonaire.

La distribution granulométrique détermine le nombre, la surface, le volume et la masse des particules en fonction de leur diamètre et permet de classifier les particules selon différents « modes » (Figure 2. 2.). Les principaux processus gouvernant cette distribution sont la nucléation (formation de nouvelles particules à partir de composés de faible volatilité), la condensation (transfert de composés semi-volatils vers la phase particulaire) et la coagulation (fusion de particules) La condensation entraine un grossissement des particules, tandis que la coagulation conduit à une augmentation de la taille couplée à une diminution du nombre total de particules.

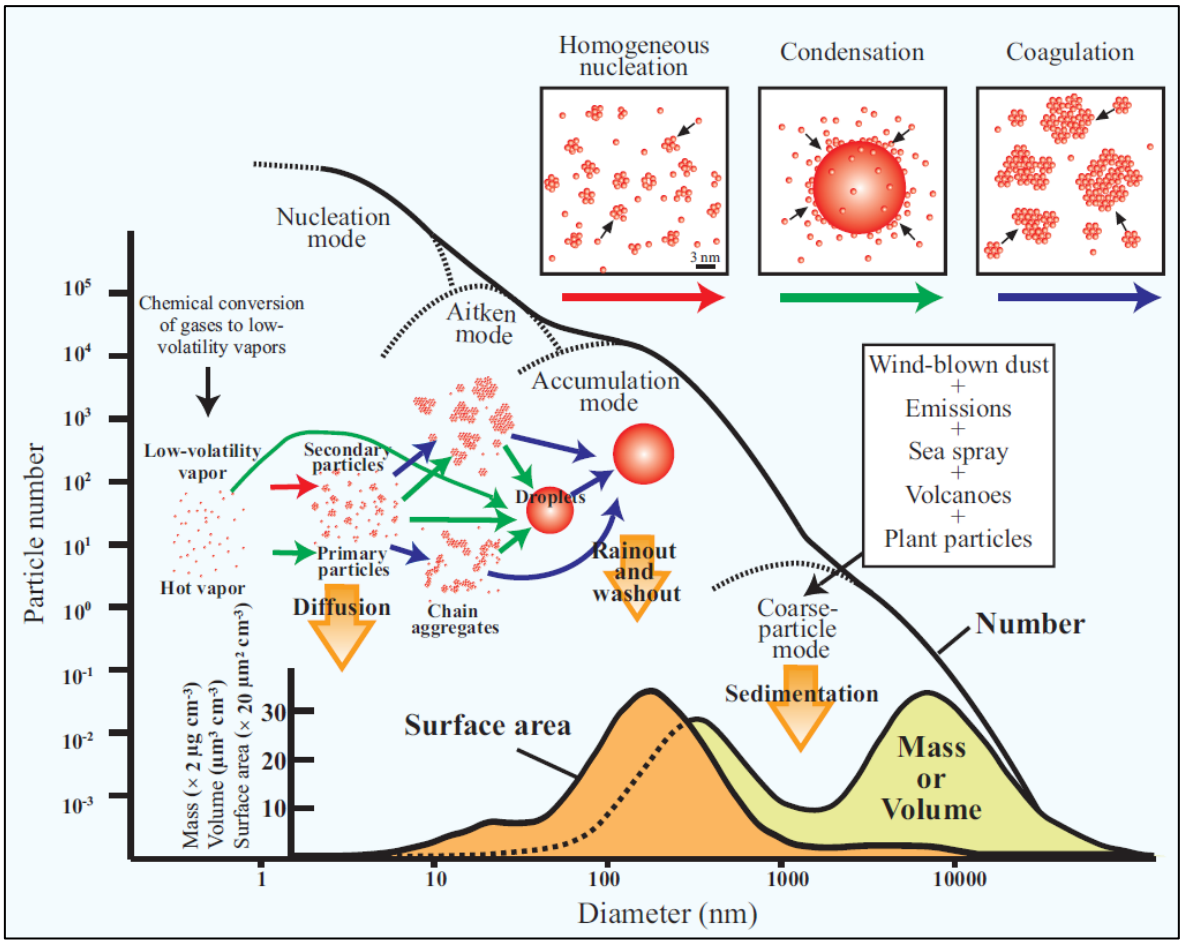


Figure 2. 2 : Schéma de la distribution granulométrique des particules d'aérosol pour divers paramètres (nombre, N; masse, M; volume, V; surface, S) dans un échantillon atmosphérique idéalisé, avec illustration de leurs mécanismes de formation (Buseck and Adachi, 2008). Adapté de Whitby (1978).

À partir de ces processus, trois grands modes granulométriques sont distingués pour les aérosols (Figure 2. 2) :

- Le mode de nucléation (D_p < 20 nm) se caractérise par un nombre très élevé d'aérosols secondaires tandis que le mode d'Aitken (D_p = 30 – 100 nm) regroupe les particules issues de la coagulation et la condensation des particules du mode de nucléation. Les particules issues de ces deux premiers modes regroupent les particules ultrafines ($PM_{0.1}$). Ces particules, nombreuses, présentent une surface spécifique élevée et ont une durée de vie très réduite dans l'atmosphère du fait de leur évolution rapide par les processus de condensation et coagulation ou par leur élimination par dissolution dans des gouttelettes d'eau.

- Le mode d'accumulation (D_p 0,1 – 2,5 µm) correspond aux particules fines ($PM_{2.5}$). Elles résultent d'une conversion gaz/particules par nucléation homogène ou par condensation d'espèces semi-volatiles sur les particules préexistantes. Elles possèdent un temps de vie relativement long (de quelques jours à quelques semaines) et subissent des processus d'élimination moins efficaces favorisant leur accumulation dans l'atmosphère et leur transport sur de longues distances.

- Le mode grossier (D_p > 2,5 µm, PM_{10}) est constitué majoritairement de particules issues de processus mécaniques tels que la remise en suspension, l'érosion des sols ou les embruns marins. Leur temps de résidence est court en raison d'une sédimentation rapide en lien avec leur masse importante.

Bien que les particules grossières contribuent fortement à la masse totale, les particules fines et ultrafines dominent en nombre et en spécificité de surface. Ces caractéristiques jouent un rôle déterminant dans leur réactivité chimique, leur impact sur le climat et leur potentiel d'interaction avec les systèmes biologiques.

Les particules atmosphériques sont ainsi classiquement définies selon leurs diamètres aérodynamiques. Sont notamment distinguées les particules grossières ($PM_{10-2.5}$), fines ($PM_{2.5}$) et ultrafines (PM_1), ces deux dernières présentant une importance particulière en raison de leur forte spécificité de surface et de leur capacité à pénétrer profondément dans l'arbre respiratoire.

2.1.4. Composition chimique des particules atmosphériques

Les particules atmosphériques présentent une composition chimique hétérogène, résultant de la diversité de leurs sources et des transformations atmosphériques qu'elles subissent. Globalement composés d'eau et d'un mélange complexe de matière organique et inorganique, les principales composantes des aérosols sont les suivantes :

- La fraction inorganique est dominée par les sulfates, nitrates, ammoniums, chlorures et certains minéraux. Elle regroupe également différents métaux et éléments traces (cuivre, fer, plomb, nickel…). Cette fraction représente une part importante de la masse des PM, pouvant atteindre 30 à 60 % de la masse sèche des

$PM_{2.5}$ selon le site étudié et les conditions climatiques (Putaud et al., 2004, 2010; Zhang et al., 2011; Bressi et al., 2021; Chebaicheb et al., 2024).

- La fraction carbonée est une composante majeure de particules atmosphériques qui contribue entre 20% et 90% de la masse totale des $PM_{2.5}$ dans les zones urbaines, péri-urbaines et industrialisées (Putaud et al., 2004; Pöschl, 2005; Zhang, Jimenez, et al., 2007; Monks et al., 2009; Putaud et al., 2010; Zanatta et al., 2016; Chebaicheb et al., 2024; Rovira et al., 2025). Cette fraction est classiquement subdivisée en deux sous-fractions, le carbone élémentaire (EC, *Elemental Carbon*), fraction réfractaire et graphitique issue principalement des combustions incomplètes, et la matière organique (OM, O*rganic Matter* ou AO pour Aérosol Organique) qui regroupe des centaines de composés organiques fonctionnalisés tels que les alcanes, alcools, aldéhydes, cétones, acides carboxyliques, composés polyaromatiques dont une très grande partie n'est pas connue formellement. La contribution de EC à la masse totale des PM est de l'ordre de 5 à 20 % (Zanatta et al., 2016; Rovira et al., 2025) alors que la fraction organique de l'aérosol peut représenter de 20 à 90 % de la masse totale de la fraction fine des PM dans la basse troposphère (Finlayson-Pitts and Pitts, 2000a; Goldstein and Galbally, 2007; Zhang, Jimenez, et al., 2007; Jimenez et al., 2009; Zhang et al., 2011; Finlayson-Pitts et al., 2020; Bressi et al., 2021).

La composition chimique des particules change au cours du cycle de vie de la formation et de la croissance des particules, reflétant les changements dans les processus qui se produisent à chaque étape. Elle varie donc fortement selon la géomorphologie, les conditions météorologiques et le degré de vieillissement atmosphérique (Figure 2. 3) (Zhang et al., 2011). Cette variabilité influence leurs propriétés physico-chimiques, notamment leur hygroscopicité, leur réactivité chimique et leur capacité d'interaction avec les systèmes biologiques.

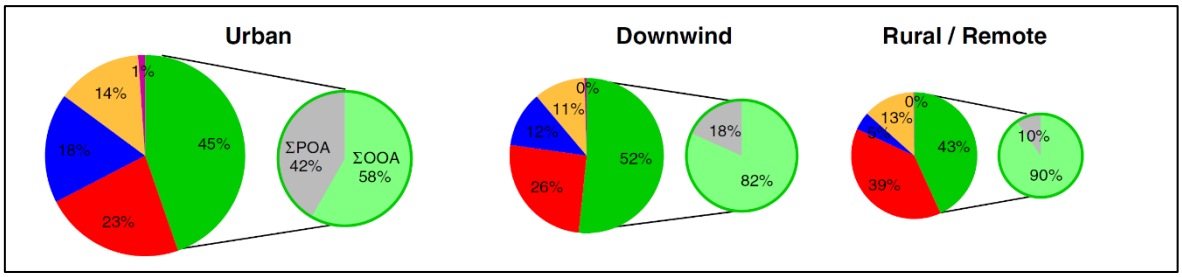


Figure 2. 3 : Composition chimique moyenne des PM_1 (particules < 1 µm) pour différentes typologies de sites. Rose : chlorure ; Jaune : ammonium, Bleu : nitrate ; Rouge : sulfate ; Vert : matière organique ; Vert clair : aérosol organique oxygéné (OOA) équivalent à l'estimation de l'AOS (aérosol organique secondaire) ; Gris : aérosol organique primaire (POA). Adapté de (Zhang et al., 2011).

2.1.5. Aérosols organiques primaires et secondaires

L'aérosol organique (AO) constitue généralement la fraction dominante de la masse des $PM_{2.5}$. Celui-ci provient de sources multiples et repose sur des processus de formation particulièrement complexes (Finlayson-Pitts and Pitts, 2000a; Raes et al., 2000; Kroll and Seinfeld, 2008; Jimenez et al., 2009). Classiquement, les AO sont distingués selon leur mode de formation. Les aérosols organiques primaires (AOP) sont directement émis dans l'atmosphère, tandis que les aérosols organiques secondaires (AOS) sont formés *in situ* à la suite de réactions d'oxydation de COV ou COSV, suivies de processus de conversion gaz-particule (Kroll and Seinfeld, 2008; Carlton et al., 2009; Hallquist et al., 2009; Jimenez et al., 2009; Ziemann and Atkinson, 2012; Heald and Kroll, 2020).

Les AOP sont émis par une large diversité de sources naturelles et anthropiques. Parmi les sources anthropiques majeures figurent les émissions véhiculaires, les activités industrielles et, de manière particulièrement marquée en saison hivernale, la combustion de biomasse (Viana et al., 2014; Seinfeld and Pandis, 2016; Chen et al., 2017; Vicente and Alves, 2018; Olsen et al., 2020). À l'échelle globale, plus de 70 % des émissions de carbone organique primaire seraient associées à la combustion de biomasse (Hallquist et al., 2009). Les sources naturelles d'AOP comprennent aussi les émissions biologiques primaires telles que le pollen et les spores fongiques, l'abrasion des feuilles libérant des cires végétales, ainsi que certaines émissions océaniques (Viana et al., 2014; Samaké, Jaffrezo, Favez,

Weber, Jacob, Albinet, et al., 2019; Samaké, Jaffrezo, Favez, Weber, Jacob, Canete, et al., 2019).

À l'inverse, les AOS ne sont pas directement émis mais résultent de transformations chimiques atmosphériques impliquant des précurseurs organiques gazeux. Ces précurseurs, constitués de COV et COSV, peuvent être d'origine biogénique ou anthropique et présentent une grande diversité chimique. Les COV biogéniques constituent la source dominante à l'échelle globale, représentant environ 90 % des émissions mondiales de COV. Ils sont majoritairement constitués d'alcènes réactifs, parmi lesquels l'isoprène représente près de 50 % des émissions biogéniques totales, suivi des monoterpènes (≈ 40 %), le reste étant constitué d'autres composés tels que les sesquiterpènes et divers COV oxygénés (Figure 2. 4.) (Guenther et al., 1995; Srivastava et al., 2018). L'isoprène constitue le composé organique non méthanique le plus abondamment émis dans l'atmosphère. Malgré un rendement relativement faible en aérosols secondaires, son importance quantitative en fait un contributeur significatif de la formation globale d'AOS. Les monoterpènes représentent une autre classe majeure de précurseurs biogéniques, contribuant de manière notable à la formation d'AOS. Puis, les sesquiterpènes, bien que moins abondants, présentent une réactivité élevée vis-à-vis des oxydants atmosphériques et donc, des rendements importants en aérosols secondaires. D'autres sources biogéniques incluent également les émissions océaniques, notamment le diméthylsulfure, dont l'oxydation conduit à la formation d'aérosols contenant de l'acide méthanesulfonique ainsi que divers composés organiques marins, tels que des acides dicarboxyliques et des sels d'ammonium organiques, illustrant l'influence marine sur la composition des aérosols atmosphériques.

Les précurseurs anthropiques d'AOS, bien que minoritaires à l'échelle globale, jouent un rôle majeur dans les environnements urbains et périurbains (Viana et al., 2014). Ils sont constitués principalement d'hydrocarbures non méthaniques, comprenant environ 40 % d'alcanes, 10 % d'alcènes et près de 20 % de composés aromatiques, tels que le toluène, les xylènes ou les triméthylbenzènes, constituant une source importante d'AOS dans les environnements urbains (Figure 2. 4.). Ces composés sont majoritairement émis par la combustion fossile et de biomasse, les émissions véhiculaires et l'utilisation de solvants (Zhao et al., 2014; Nozière et al., 2015). Dans les environnements influencés par la combustion de biomasse, notamment lors des périodes hivernales, des composés

spécifiques tels que les HAP, les phénols et les furannes peuvent constituer des précurseurs majeurs d'AOS. Ces composés présentent des rendements élevés en aérosols secondaires et contribuent significativement à la formation d'AOS en conditions urbaines et périurbaines hivernales, particulièrement dans les contextes dominés par le chauffage résidentiel au bois.

Enfin, une part non négligeable des AOS peut également provenir de l'oxydation atmosphérique de vapeurs issues d'aérosols organiques primaires semi-volatils. Ces composés peuvent subir une oxydation en phase gazeuse avant de se recondenser sur des particules préexistantes, illustrant le rôle central des processus de partage gaz-particule dans la formation et l'évolution des AOS.

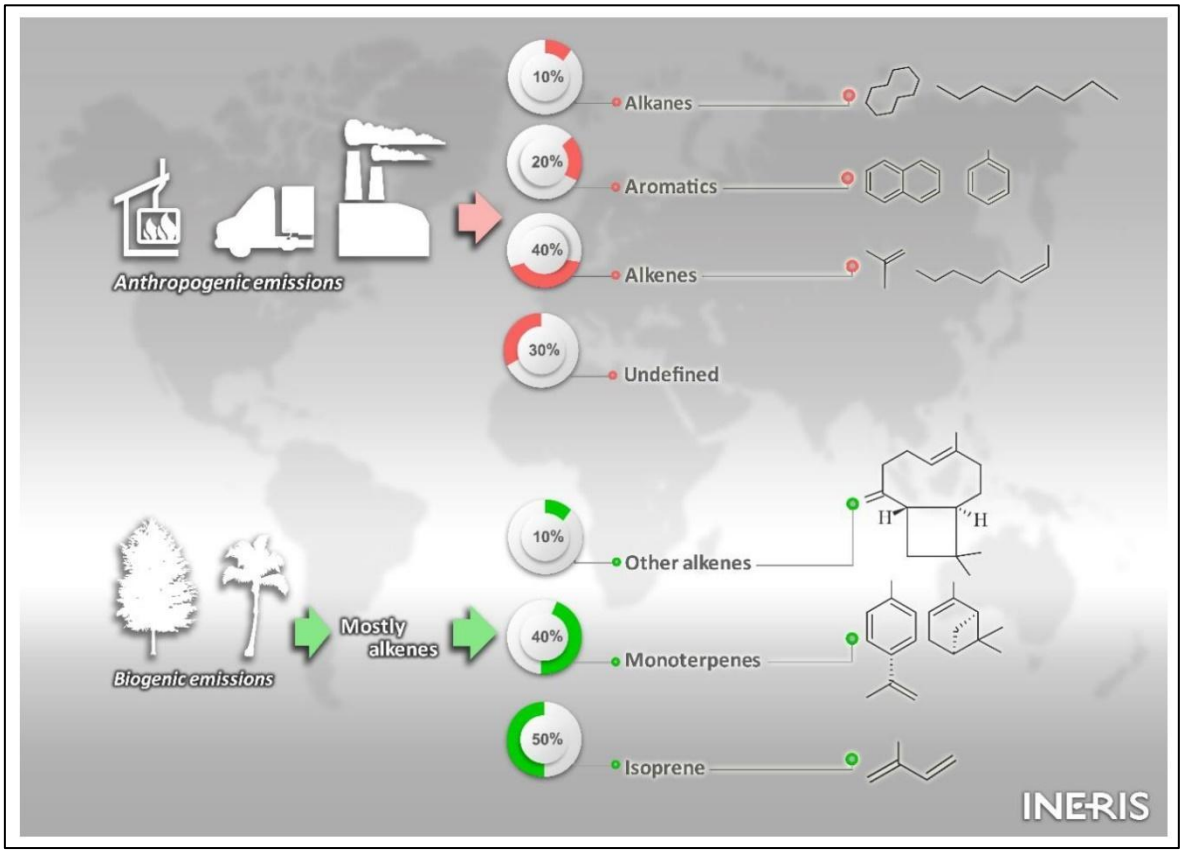


Figure 2. 4. : Principaux précurseurs biogéniques et anthropiques des aérosols organiques secondaires (Srivastava et al., 2018)

Une fois émis dans l'atmosphère, ces précurseurs subissent des réactions d'oxydation (photo-)chimiques impliquant des oxydants atmosphériques majeurs tels que le radical hydroxyle (OH), l'ozone (O_3) ou le radical nitrate (NO_3). Ces réactions peuvent se

produire en phase gazeuse (chimie homogène) ou à la surface des particules préexistantes (chimie hétérogène) après adsorption de composés gazeux, conduisant à la formation de composés organiques de plus faible volatilité (Zhang et al., 2005; Johnson et al., 2006). La diminution progressive de la volatilité favorise alors le partage gaz-particule. En fonction de leur volatilité, les composés organiques peuvent se répartir entre les phases gazeuse et particulaire selon un équilibre thermodynamique dépendant notamment de la température, de la composition chimique et de la masse particulaire disponible. Par ailleurs, une part significative des transformations chimiques peut se produire en phase aqueuse, notamment au sein des gouttelettes nuageuses, des brouillards ou des particules fortement hydratées, favorisant la formation de composés organiques fortement oxygénés et parfois oligomérisés.

La formation des AOS repose ainsi sur une succession de réactions d'oxydation conduisant à une diminution progressive de la volatilité des composés organiques. Le mécanisme général d'oxydation d'un composé organique volatil peut être décrit comme une série de transformations impliquant des radicaux libres et conduisant à la formation de produits intermédiaires puis finaux présentant une volatilité réduite (Kroll and Seinfeld, 2008). Dans un premier temps, le COV réagit avec un oxydant atmosphérique pour former des radicaux peroxyles organiques (RO_2), qui évoluent ensuite vers des composés oxygénés tels que alcools, aldéhydes, cétones ou acides organiques. L'introduction progressive de fonctions oxygénées entraîne une diminution de la pression de vapeur saturante et favorise leur transfert vers la phase particulaire. Certaines réactions secondaires peuvent également conduire à une fragmentation moléculaire, illustrant la compétition permanente entre fonctionnalisation et fragmentation au cours du vieillissement atmosphérique (Figure 2. 5.).

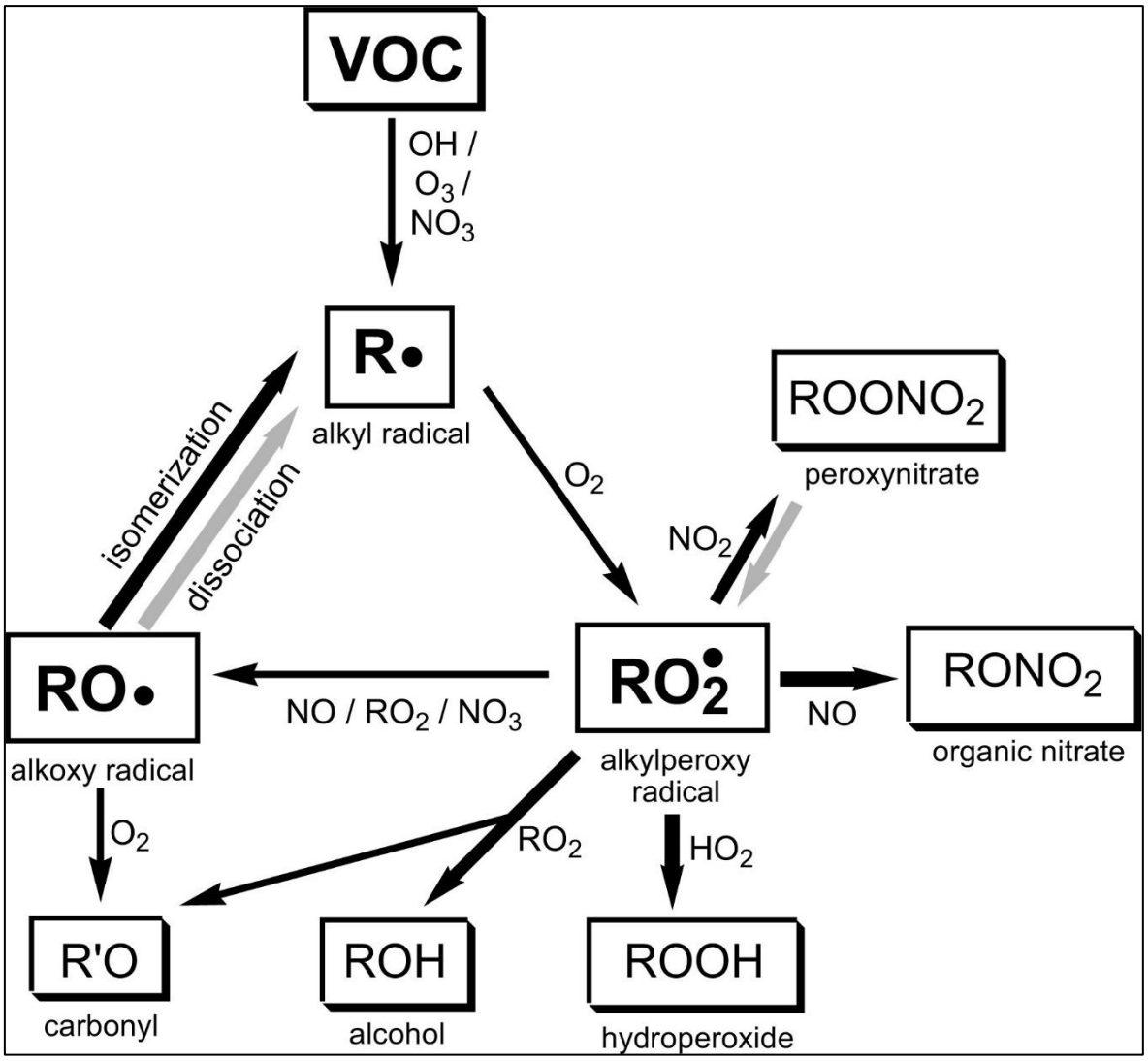


Figure 2. 5. : Mécanisme simplifié d'oxydation atmosphérique d'un COV générique conduisant à la formation de composés de faible volatilité (Kroll and Seinfeld, 2008)

Les produits d'oxydation formés peuvent se condenser sur des particules préexistantes ou participer à la formation de nouveaux noyaux particulaires par nucléation. Les processus de condensation, de coagulation et de vieillissement atmosphérique conduisent à une évolution progressive des propriétés physico-chimiques des particules, notamment leur hygroscopicité, leur réactivité et leur stabilité. Ces transformations successives conduisent généralement à la formation d'AOS plus oxygénés, plus polaires et moins volatils que leurs précurseurs initiaux.

Selon les environnements étudiés, la fraction secondaire peut représenter une part prépondérante des PM. Dans certaines conditions, les AOS peuvent contribuer jusqu'à 90

% de la masse totale d'AO, notamment dans la basse troposphère et dans les environnements urbains fortement influencés par des sources anthropiques (Zhang, Jimenez, et al., 2007; Kroll and Seinfeld, 2008; Zhang et al., 2011; Srivastava et al., 2018). Malgré leur contribution majeure à la masse des $PM_{2.5}$, la composition moléculaire détaillée des AOS demeure encore partiellement résolue en raison de leur extrême complexité chimique. Cette complexité résulte de la diversité des précurseurs et des nombreuses voies réactionnelles impliquées, rendant difficile l'établissement de relations précises entre sources, propriétés physico-chimiques et effets sur la santé humaine et le climat.

2.1.6. Impact sur le climat et la santé des aérosols et réglementation

Les aérosols atmosphériques jouent un rôle important dans le système climatique en modifiant le bilan radiatif de la Terre. Ils influencent le climat par des effets directs, en diffusant ou en absorbant le rayonnement solaire, mais également par des effets indirects, en modifiant les propriétés microphysiques des nuages, notamment leur albédo et leur durée de vie. Dans l'ensemble, les aérosols exercent un effet radiatif net majoritairement refroidissant, compensant partiellement l'effet réchauffant des gaz à effet de serre. Toutefois, l'ampleur exacte de cet effet reste associée à des incertitudes importantes, en particulier en raison de la complexité des interactions entre aérosols, rayonnement et nuages. Parmi les espèces atmosphériques influençant le bilan radiatif, le dioxyde de soufre (SO_2) contribue indirectement au refroidissement climatique dues aux interactions aérosols-rayonnement et aérosols-nuages. Les oxydes d'azote (NO_x), en interaction avec le méthane (CH_4) et d'autres composés réactifs, exercent également un effet global complexe, combinant contributions au refroidissement et effets indirects sur les gaz à effet de serre. À l'inverse, le dioxyde de carbone (CO_2) et le méthane (CH_4) constituent les principaux forçages positifs responsables du réchauffement climatique global (Figure 2. 6.) (Intergouvernemental Panel on Climate Change (IPCC), 2021).

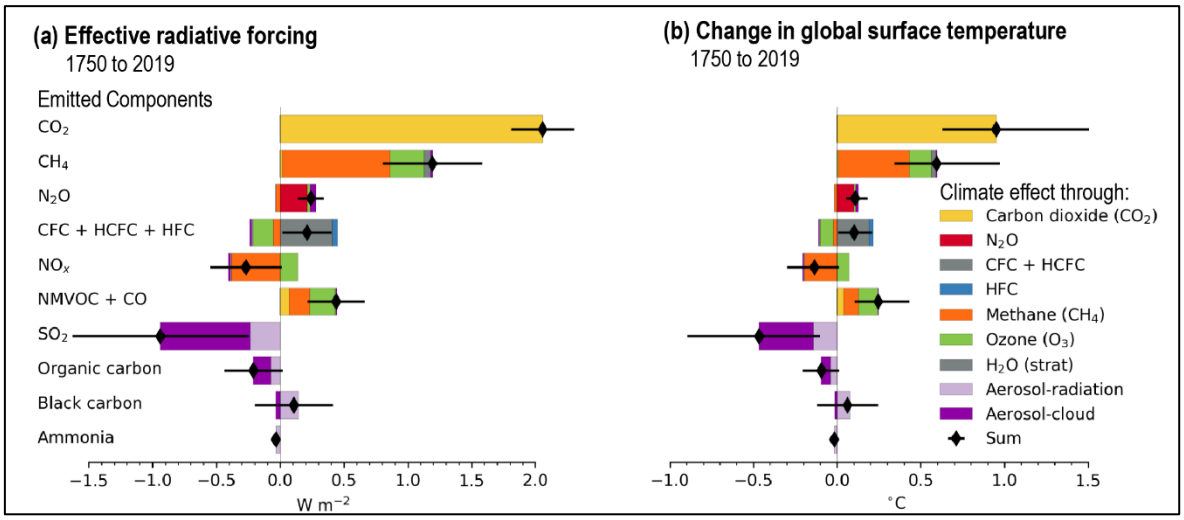


Figure 2. 6. : Contribution des différents composés atmosphériques au forçage radiatif effectif et à l'évolution de la température moyenne globale depuis 1750, mettant en évidence le rôle globalement refroidissant des aérosols et les incertitudes associées à leurs interactions avec le rayonnement et les nuages. Adaptée de (Intergouvernemental Panel on Climate Change (IPCC), 2021).

Au-delà de leurs effets climatiques, les particules atmosphériques constituent un enjeu majeur de santé publique à l'échelle mondiale. En raison de leur petite taille, les $PM_{2.5}$ peuvent pénétrer profondément dans l'arbre respiratoire et atteindre les régions alvéolaires, favorisant leur passage dans la circulation systémique et l'altération de fonctions biologiques essentielles (Heal et al., 2012; Rajagopalan et al., 2018; Kelly and Fussell, 2020; Salo et al., 2021; Holme et al., 2023; Xu et al., 2023). L'exposition chronique aux $PM_{2.5}$ est aujourd'hui reconnue comme un facteur majeur de mortalité prématurée, avec une relation bien établie entre l'augmentation des concentrations atmosphériques et le risque de décès (Atkinson et al., 2014; Burnett et al., 2018; Anita et al., 2023; Chen, Braun, et al., 2023). Les effets sanitaires associés concernent un large éventail de pathologies, notamment les maladies cardiovasculaires, respiratoires et neurologiques, incluant infarctus du myocarde, accidents vasculaires cérébraux, cancers pulmonaires et maladies respiratoires chroniques (Kim et al., 2015; Bhatnagar, 2022; de Bont et al., 2022; Liu, Zhang, et al., 2023). À l'échelle mondiale, l'exposition aux $PM_{2.5}$ ambiantes était responsable, en 2015, d'environ 17,1 % des décès liés aux cardiopathies ischémiques, 14,2 % des décès par accident vasculaire cérébral et 16,5 % des décès par cancer du poumon (Cohen et al., 2017; Burnett et al., 2018). Ces impacts sanitaires majeurs soulignent le rôle central des particules

fines dans le fardeau sanitaire global et justifient la mise en place de réglementations visant à limiter l'exposition des populations.

Face aux impacts sanitaires majeurs associés à l'exposition aux particules atmosphériques, des réglementations ont été mises en place afin de limiter les concentrations ambiantes et de protéger la santé des populations. L'Organisation mondiale de la Santé (OMS) propose des valeurs guides fondées sur des critères sanitaires, tandis que l'Union européenne définit des valeurs limites réglementaires juridiquement contraignantes pour les États membres. Malgré ces dispositifs, les concentrations en air ambiant continuent de dépasser largement les recommandations sanitaires de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) dans la quasi-totalité des agglomérations françaises (97 % des sites en 2022) (SDES, 2025). Même si les valeurs limites Européennes actuellement en vigueur (Directive Européenne 2024/2881) sont moins souvent dépassées, avec les futurs seuils européens plus stricts à venir d'ici 2030, de nombreuses zones devraient encore se trouver non conformes aux nouvelles valeurs limites de $PM_{2.5}$ si aucun changement n'est mis en place d'ici là (Directive EU - 2024/2881).

Tableau 2. 1. : Valeurs guides de l'OMS et valeurs limites réglementaires européennes actuelles et futures applicables aux particules $PM_{2.5}$ et PM_{10}. Les nouvelles valeurs européennes issues de la Directive (UE) 2024/2881 entreront en application progressive à l'horizon 2030 (Directive EU - 2024/2881).

		OMS (2021)	**Ancienne règlementation (Directive 2008/50/CE)**	**Règlementation à atteindre d'ici 2030 (Directive 2024/2881/CE)**
$PM_{2.5}$	Annuel	5 µg/m^3	20 µg/m^3	10 µg/m^3
	Journalier	15 µg/m^3	/	25 µg/m^3
PM_{10}	Annuel	15 µg/m^3	40 µg/m^3	20 µg/m^3
	Journalier	45 µg/m^3	50 µg/m^3	45 µg/m^3

Points clés : Les Aérosols atmosphériques

Source d'émission	Les aérosols proviennent de sources naturelles et anthropiques. À l'échelle globale, les sources naturelles contribuent à la majorité des émissions tandis qu'à l'échelle locale urbaine, les sources anthropiques sont majoritaires.
Formation	Les aérosols primaires sont directement émis dans l'atmosphère tandis que les aérosols secondaires sont le résultat de transformation (photo)-chimique atmosphérique.
Granulométrie	Bien que les PM_{10} contribuent fortement à la masse totale, les particules $PM_{2.5}$ et $PM_{0.1}$ dominent en nombre et en surface spécifique influençant leur réactivité chimique, leur impact sur le climat et leur d'interaction avec les systèmes biologiques.
Composition chimique	La composition chimique des particules évolue tout au long de leur cycle de vie et varie fortement selon le contexte géographique, les conditions météorologiques et les processus chimiques en jeu, influençant leurs propriétés physico-chimiques (hygroscopicité, réactivité chimique, interactions biologiques)

2.2. La combustion de biomasse et le chauffage résidentiel au bois

2.2.1. Une source majeure de $PM_{2.5}$

Dans un contexte marqué par l'augmentation de la fréquence des feux de forêt liés aux changements climatiques, ou encore le recours croissant au chauffage résidentiel au bois lié à la crise énergétique, les émissions issues de la combustion de biomasse augmentent significativement et laissent présager une contribution encore plus importante dans les années à venir (UNECE, 2021; Cunningham et al., 2024; Jiang et al., 2024; Zhao et al., 2025). La combustion de biomasse est l'une des sources majeures de particules fines dans l'air ambiant (Denier van der Gon et al., 2015; Vicente and Alves, 2018; Song et al., 2022; Tessum et al., 2022). Dans l'Union européenne (UE-27), les émissions primaires de particules proviennent majoritairement du secteur résidentiel, commercial et institutionnel, devant l'industrie, le transport et l'agriculture, comme le montrent les inventaires d'émissions officiels de l'Agence européenne pour l'environnement. Au sein du secteur résidentiel, le chauffage résidentiel au bois constitue la source prépondérante de particules (AEE, 2022) (Figure 2.4).

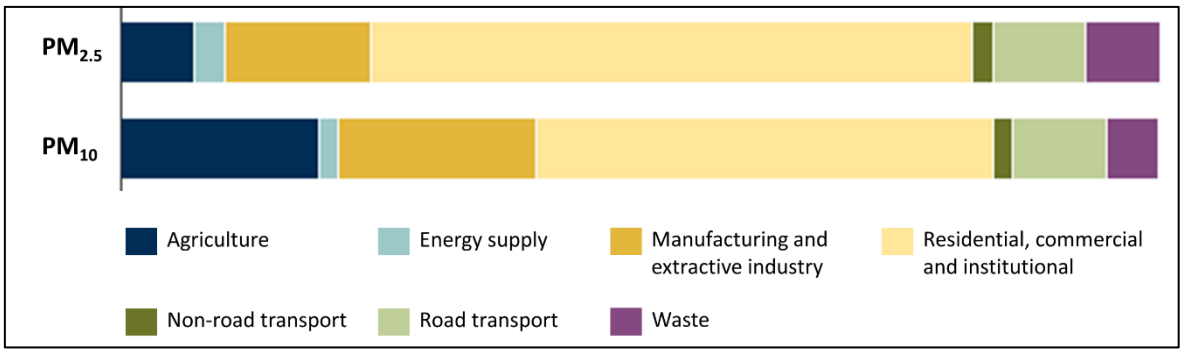


Figure 2. 4 : Contributions aux émissions primaires de $PM_{2.5}$ et PM_{10} des principaux secteurs d'activités dans les 27 Etats membres de l'Union Européenne en 2020. Adapté de (AEE, 2022).

En France, la prédominance du secteur résidentiel dans les émissions des $PM_{2.5}$ est également en lien avec l'usage du bois-énergie (CITEPA, 2025). Ces observations sont cohérentes avec plusieurs études démontrant la contribution majeure de la combustion de

biomasse aux concentrations des particules dans l'air ambiant notamment en lien avec le chauffage résidentiel au bois (Herich et al., 2014; Weber et al., 2019; Zhang et al., 2020; Chen, Canonaco, et al., 2022; Chebaicheb et al., 2026).

2.2.2. Une source prépondérante d'AOP et d'AOS

En plus d'être une source majeure de $PM_{2.5}$, la combustion de biomasse constitue une source importante d'aérosols carbonés (somme d'aérosol organique et carbone suie), en particulier durant la saison hivernale. Elle est responsable de plus de 70 % des aérosols organiques primaires (AOP) émis lors des périodes froides, notamment en lien avec le chauffage résidentiel au bois (Crippa et al., 2013; Denier van der Gon et al., 2015; Vicente and Alves, 2018; Zhang et al., 2020; Chen, Hoek, et al., 2022). Cette source émet également une large quantité de COV et COSV susceptibles d'alimenter les processus de transformation physico-chimique atmosphérique pouvant conduire à la formation d'AOS (Kroll and Seinfeld, 2008; Carlton et al., 2009; Hallquist, et al., 2009; Jimenez et al., 2009; Ziemann and Atkinson, 2012; Heald and Kroll, 2020) et à la concentration des $PM_{2.5}$ dans l'air ambiant (Kelly et al., 2018; Olsen et al., 2020).

Dans le cadre des émissions résidentielles, les informations disponibles sur la formation d'aérosols secondaires restent limitées, malgré que plusieurs études aient démontré le fort potentiel de formation d'AOS des émissions des poêles à bois (Heringa et al., 2012; Bertrand et al., 2017). Aujourd'hui, des expériences menées en conditions contrôlées sur bancs d'essais commencent à mieux caractériser les émissions primaires issues de différents types d'appareils domestiques et évaluer leur potentiel de formation d'AOS (Degrendele et al., 2022; Albinet et al., 2023; El Mais et al., 2023). Bien que les émissions primaires de combustion de biomasse soient assez bien documentées, à ce jour, seul un nombre limité d'études se sont portées sur le devenir atmosphérique de leurs précurseurs organiques (Grieshop et al., 2009; Bruns et al., 2015, 2016; Czech et al., 2017; Keller and Burtscher, 2017; Hartikainen et al., 2020; Kodros et al., 2020; Fang et al., 2024; Georgopoulou et al., 2025) et les propriétés toxicologiques des AOS formés restent encore très partiellement élucidés (Lima de Albuquerque et al., 2021; Pardo et al., 2022; Wang et al., 2023; El Mais et al., 2025).

2.2.3. Précurseurs d'AOS émis par la combustion de biomasse

Certains COV et COSV émis lors de la combustion de biomasse, tels que les hydrocarbures aromatiques (toluène, benzène …), les composés phénoliques, les furanes ou encore les HAP ont été identifiés comme des précurseurs majeurs d'AOS (Yee et al., 2013; Bruns et al., 2016; Tiitta et al., 2016; Ahern et al., 2019; Akherati et al., 2020; Růžičková et al., 2022). La réactivité homogène (en phase gazeuse ou hétérogène (en phase gaz/particules) de ces composés avec différents oxydant est bien documenté dans la littérature (Volkamer et al., 2001; Berndt and Böge, 2003; Sato et al., 2007, 2012; Chan et al., 2009; Kautzman et al., 2010; Zhou and Wenger, 2013; Bruns et al., 2016; Riva et al., 2017; Jiang et al., 2019; Srivastava et al., 2022). Outre les radicaux hydroxyle (OH) et nitrate (NO_3), d'autres processus atmosphériques tels que l'oxydation par l'ozone (O_3), les radicaux halogénés (par exemple Cl) ou encore la photolyse peuvent également contribuer à la transformation de ces précurseurs, bien que OH et NO_3 constituent généralement les oxydants dominants respectivement en conditions diurnes et nocturnes.

La majorité des études expérimentales ont exploré ces processus d'oxydation diurne initiée par OH et O_3, tandis que les processus nocturnes impliquant le NO_3 restent moins investigués pour de nombreux précurseurs (Chan et al., 2009; Kautzman et al., 2010; Zhou and Wenger, 2013; Yu et al., 2014, 2016; Riva et al., 2017; Finewax et al., 2018; Miersch et al., 2019; Mayorga et al., 2021; El Mais et al., 2023; Fang et al., 2024; Lannuque and Sartelet, 2024; Zhang, Liu, et al., 2025). Cette question est particulièrement pertinente dans le contexte des émissions liées au chauffage au bois, majoritairement utilisées en période hivernale et durant les heures nocturnes, conditions favorisant l'implication du radical NO_3. Or, les processus d'oxydation influencent fortement la composition chimique des AOS formés, notamment leur degré d'oxydation, leur fonctionnalisation, leur composition chimique susceptibles d'induire des réponses biologiques différentielles (Akherati et al., 2020; El Mais et al., 2023; Georgopoulou et al., 2025). L'étude comparative des voies d'oxydation diurne et nocturne apparaît ainsi particulièrement pertinente.

L'oxydation atmosphérique de ces composés conduit à la formation de produits plus oxygénés ou nitrés, incluant notamment des dérivés oxy-aromatiques et nito-aromatique comme les nitrophénols ou les oxy-HAP susceptibles de contribuer à la formation d'AOS et

de présenter une toxicité accrue par rapport aux précurseurs initiaux (Bolzacchini et al., 2001; Volkamer et al., 2001; Atkinson and Arey, 2007; Perraudin et al., 2007; Sato et al., 2007; Ziemann and Atkinson, 2012; Zhou and Wenger, 2013; Riva et al., 2017; Akherati et al., 2020; El Mais et al., 2023). Toutefois, les mécanismes de formation d'AOS associés à ces précurseurs, ainsi que leurs rendements et leurs propriétés physico-chimiques, restent encore partiellement compris (Bruns et al., 2016) (Figure 2. 5.).

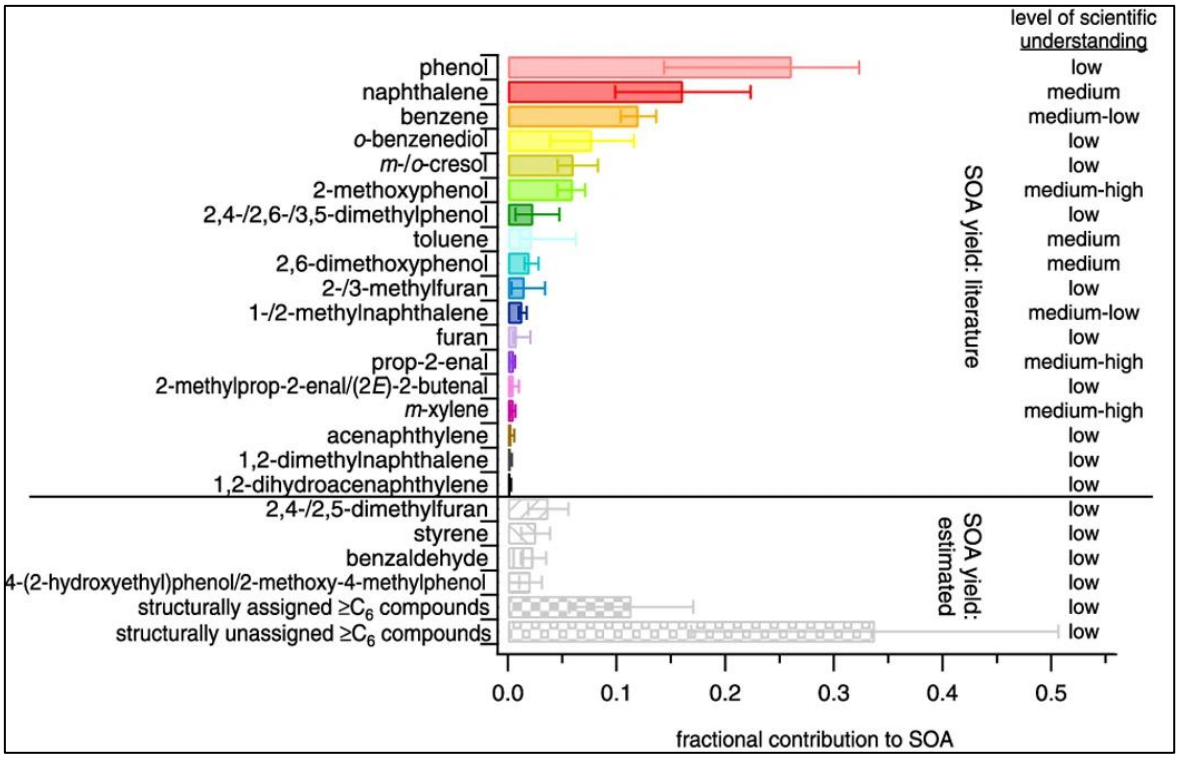


Figure 2. 5 : Niveaux de contribution fractionnel moyen des AOS observés et niveau de compréhension scientifique de 22 précurseurs majoritairement émis par la combustion de biomasse (Bruns et al., 2016).

Malgré l'abondance documentée de ces précurseurs dans les émissions de combustion de biomasse, les mécanismes cellulaires et moléculaires induits par les AOS correspondants demeurent insuffisamment caractérisés (Bruns et al., 2016; Chen et al., 2017; Vicente and Alves, 2018). Dans ce contexte, l'évaluation toxicologique d'AOS formés à partir de précurseurs représentatifs de la combustion de biomasse en conditions d'exposition réalistes, constitue un enjeu scientifique majeur pour mieux comprendre leur contribution aux effets sanitaires associés au $PM_{2.5}$.

Points clés : La combustion de biomasse

Contribution significative aux $PM_{2.5}$	La combustion de biomasse constitue une source majeure de $PM_{2.5}$ et contribue significativement à la dégradation de la qualité de l'air, en particulier en période hivernale.
Source prépondérante d'AOP et AOS	C'est un contributeur majeur d'aérosols carbonés dont de carbone suie et de nombreux COV et COSV (ex : HAP, phénol …) qui contribuent fortement à la formation d'AOS.
Transformation atmosphérique	Ces précurseurs subissent des transformations par différents oxydants atmosphériques (OH, NO_3, O_3, halogènes) et processus photochimiques conduisant à la formation de produits oxygénés et nitrés participant à la formation d'AOS.
Chimie diurne et nocturne	Les oxydants OH (diurne) ou NO_3 (nocturne) vont conditionner la physico-chimie et potentiellement la toxicité des AOS formés.
Manque de connaissance	Malgré de nombreuses études, les mécanismes de formation, les rendements et les propriétés physico-chimiques des AOS issus de nombreux précurseurs restent encore partiellement compris.

2.3. L'appareil respiratoire et la pénétration des particules

2.3.1. Rappel anatomique de la structure de l'appareil respiratoire

Le poumon est un organe complexe dont la fonction première est d'assurer les échanges de dioxygène (O_2) et de dioxyde de carbone (CO_2) entre l'air inhalé et la circulation systémique. En moyenne, un individu sédentaire en bonne santé inhale entre 10 et 12 m^3 d'air par jour. L'air suit un trajet précis à travers les voies aériennes supérieures (VAS) puis inférieures (VAI) pour finalement, arriver au niveau du siège des échanges gazeux, les alvéoles pulmonaires.

2.3.1.1. La respiration

Les poumons possèdent une structure complexe unique qui n'a eu de cesse d'évoluer au cours du temps dans le but d'assouvir les besoins vitaux constants du corps humain. Situé dans la cage thoracique, leur face interne est tapissée d'une membrane séreuse continue appelée le feuillet pariétal thoracique. Leur face externe est tapissée d'un second feuillet viscéral pulmonaire. Ensemble, les deux feuillets pleuraux forment une cavité remplie d'un liquide pleural. Le tout forme la plèvre qui permet le contact étroit entre le poumon et la cage thoracique (Figure 2. 6). Cette connexion permet aux deux entités de suivre ensemble les mouvements de respiration résultant de la contraction du diaphragme.

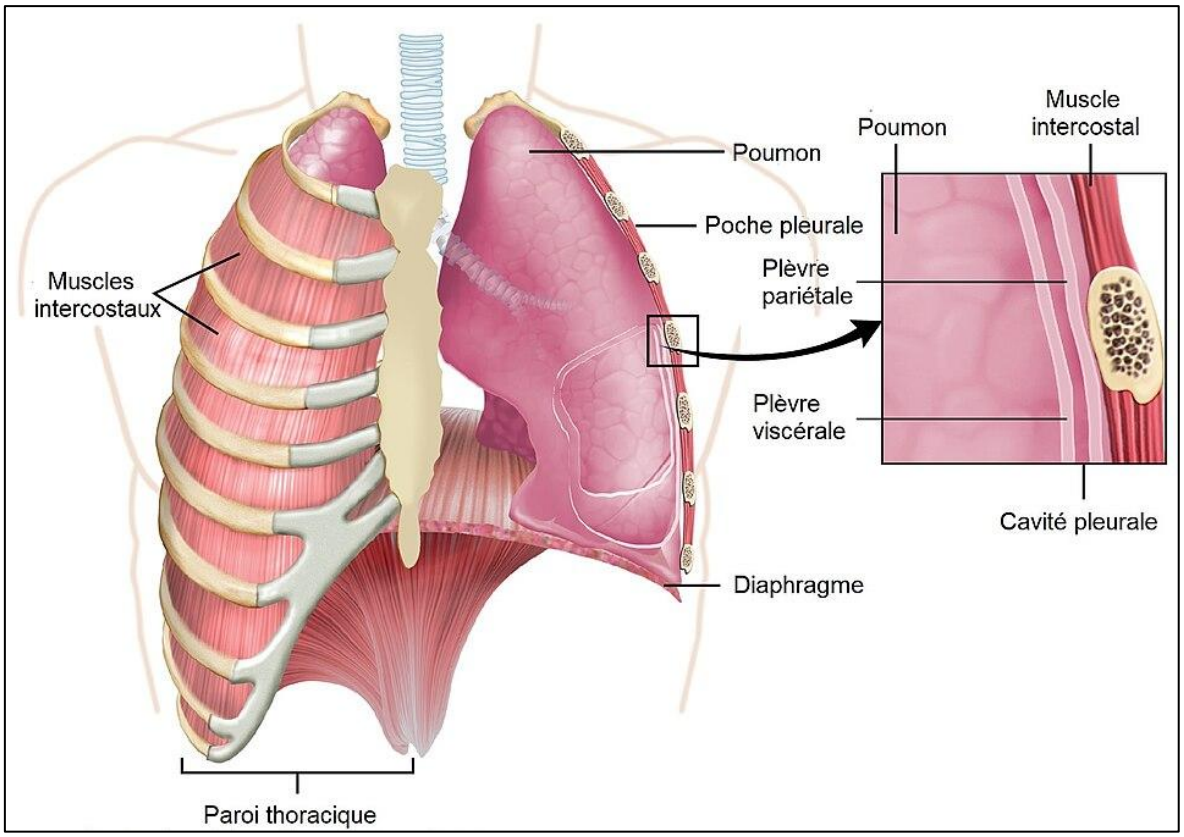


Figure 2. 6 : Schéma fonctionnel des deux feuillets pariétaux et viscéraux constituant la plèvre pulmonaire humaine. Adapté de Wikipédia.

2.3.1.2. Les voies aériennes supérieures et inférieures

Le système respiratoire est un empilement de plusieurs structures complexes regroupées en deux grandes catégories : les VAS et VAI. Les VAS, ou extra thoracique, correspondent à la partie haute des poumons. Elles sont composées successivement de la cavité nasale, du pharynx puis du larynx. Les VAI, commencent par la trachée puis se divisent au niveau de la carène en deux bronches principales qui distinguent les deux poumons. Chacune des deux bronches (Division 1) se divise successivement en bronches de plus en plus petites (Divisions 2 à 13), puis bronchioles (Division 14), elles-mêmes subdivisées en bronchioles respiratoires puis alvéolaires (Divisions 1 à 22) pour aboutir à la formation des sacs alvéolaires (Division 23) qui mettent fin à la zone de conduction de l'air et entament la zone des échanges gazeux (Fung, 1988). Cette dernière zone contient les alvéoles pulmonaires, siège des échanges gazeux (Figure 2. 7). A elle seule, la région alvéolaire représente près de 99 % de la surface pulmonaire soit une surface d'échanges gazeux de 75 à 100 m² (Guillot et al., 2013; Weibel, 2015).

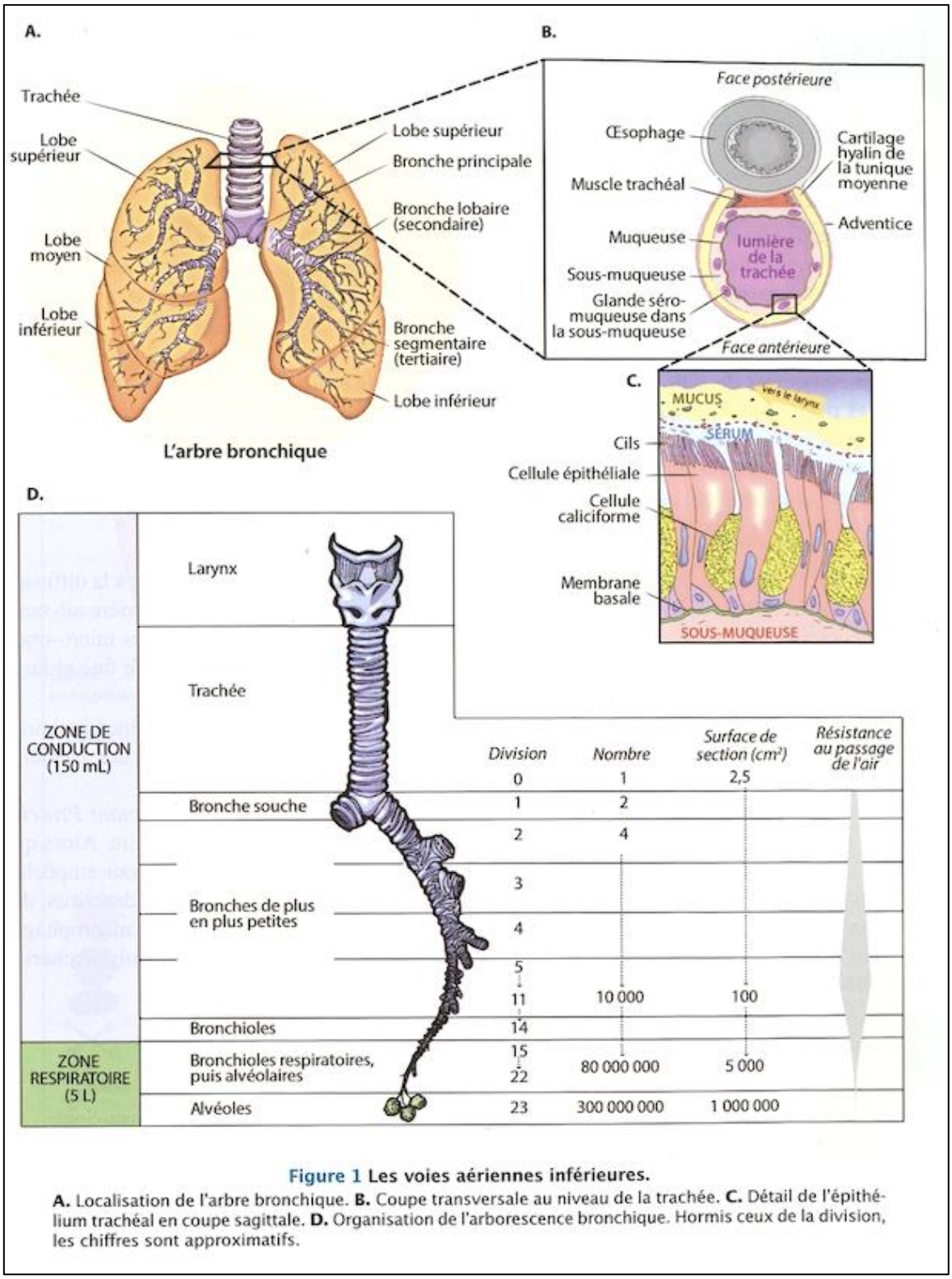


Figure 1 Les voies aériennes inférieures.
A. Localisation de l'arbre bronchique. **B.** Coupe transversale au niveau de la trachée. **C.** Détail de l'épithélium trachéal en coupe sagittale. **D.** Organisation de l'arborescence bronchique. Hormis ceux de la division, les chiffres sont approximatifs.

Figure 2. 7 : Anatomie des voies aériennes inférieures. (A) Localisation de l'arbre bronchique. (B) Coupe transversale au niveau de la trachée. (C) Détail de l'épithélium trachéal en coupe sagittale. (D) Organisation de l'arborescence bronchique. Hormis ceux de la division, les nombres sont approximatifs. Figure adaptée du site SCRIBD.

2.3.2. Rappel physiologique des épithéliums pulmonaires

2.3.2.1. L'épithélium bronchique

L'épithélium respiratoire s'étend de la trachée aux bronchioles. Il constitue la première barrière cellulaire entre l'air inhalé et l'organisme. Cet épithélium présente une organisation qui évolue progressivement des VAS aux VAI tant en épaisseur qu'en composition cellulaire (Mason and Crystal, 1998; Garcia, 2018; Hiemstra et al., 2019). Dans la trachée et les bronches, l'épithélium est généralement décrit comme pseudostratifié cylindrique cilié composé de différents types cellulaires spécialisés, notamment des cellules ciliées, des cellules caliciformes sécrétrices de mucus et des cellules basales. Les cellules ciliées assurent le transport mucociliaire grâce aux battements coordonnés de leurs cils, permettant l'élimination des particules inhalées et des micro-organismes piégés dans le mucus. Les cellules caliciformes produisent ce mucus riche en mucines qui forme une couche protectrice à la surface de l'épithélium, tandis que les cellules basales jouent un rôle de progéniteurs et participent au renouvellement et à la réparation de l'épithélium respiratoire (Velden and Versnel, 1998; Coraux et al., 2005; Rawlins and Hogan, 2006; Chakir, 2009; Whitsett, 2018). Au niveau des bronchioles, l'épithélium devient progressivement plus simple et tend vers une organisation monostratifiée. La proportion de cellules caliciformes diminue, tandis que les cellules sécrétrices non-ciliées, appelées cellules club deviennent plus abondantes. Ces cellules ont pour fonction de protéger et de détoxifier l'environnement par la sécrétion de mucus, notamment la protéine CCSP (Club Cell Secretory Protein) impliquée dans les mécanismes anti-inflammatoires et antimicrobiens des voies aériennes (Coraux et al., 2005; Rawlins and Hogan, 2006; Kelly et al., 2012; Hiemstra et al., 2015).

Ainsi, l'épithélium trachéal et bronchique constitue un système dynamique assurant à la fois des actions de barrière physique, de clairance mucociliaire et de défense immunitaire innée grâce aux macrophages bronchiques, jouant un rôle central dans la protection de l'arbre respiratoire contre les xénobiotiques inhalés.

2.3.2.2. L'épithélium alvéolaire

L'appareil respiratoire est tapissé d'une couche de cellules épithéliales continue jouant un rôle crucial dans le maintien de l'homéostasie pulmonaire, notamment au niveau des alvéoles pulmonaires. L'épithélium alvéolaire est constitué de trois principaux types cellulaires : les pneumocytes de type I, de type II (PT1 et PT2, respectivement), et les macrophages alvéolaires (MA). Les PT1 sont des cellules fines et très larges représentant environ 40 % de la population cellulaire et recouvrant 95 % de la surface alvéolaire. Ce sont les cellules qui permettent les échanges gazeux entre l'air inhalé et le sang (Stone et al., 1992; Williams, 2003). Les PT2, de forme cuboïde, à noyau rond et à cytoplasme granuleux, constituent le deuxième type cellulaire prédominant dans les alvéoles (60 %). Ils interrompent périodiquement la continuité des PT1 et servent de progéniteurs à ces derniers (Fehrenbach, 2001; Mason, 2006). Leur particularité réside dans la présence de corps lamellaires responsables de la production de surfactant. Cet agent tensioactif recouvre l'épithélium alvéolaire et forme un film mince, continu et bio-physiquement actif. Composé à 90 % de lipides et 10 % de protéines tensioactives A, B, C et D, (respectivement SP-A, SP-B, SP-C, SP-D, en anglais pour « surfactant protein »), le surfactant est essentiel à la fonction pulmonaire car il stabilise les proportions des alvéoles et prévient leur collapsus (Figure 2. 8) (Gregory et al., 1991; Fehrenbach, 2001; Parra and Pérez-Gil, 2015; Alcorn, 2017; Olmeda et al., 2017).

2.3.2.3. La barrière alvéolo-capillaire

L'épithélium alvéolaire est étroitement associé à l'endothélium des capillaires sanguins pour former la barrière alvéolo-capillaire (BAC). Ces capillaires irriguent les alvéoles pulmonaires et sont disposés en regard de celles-ci, séparés par une matrice extracellulaire fine appelée interstitium (Figure 2. 8.). Ensemble, cet interstitium et l'empilement des cellules épithéliales et endothéliales atteignent souvent moins d'un micron d'épaisseur, permettant ainsi des échanges rapides de part et d'autre de la barrière (Stone et al., 1992). Cette structure hautement spécialisée assure les échanges gazeux entre l'air inhalé et la circulation sanguine, mais participe également aux échanges de nutriments et à la limitation du passage de corps étrangers vers la circulation systémique (Crandall and Matthay, 2001; Weibel, 2015). Ainsi, la barrière alvéolo-capillaire représente l'interface

fonctionnelle majeure du poumon et constitue une zone particulièrement sensible à l'exposition aux polluants atmosphériques(Pre et al., 1979).

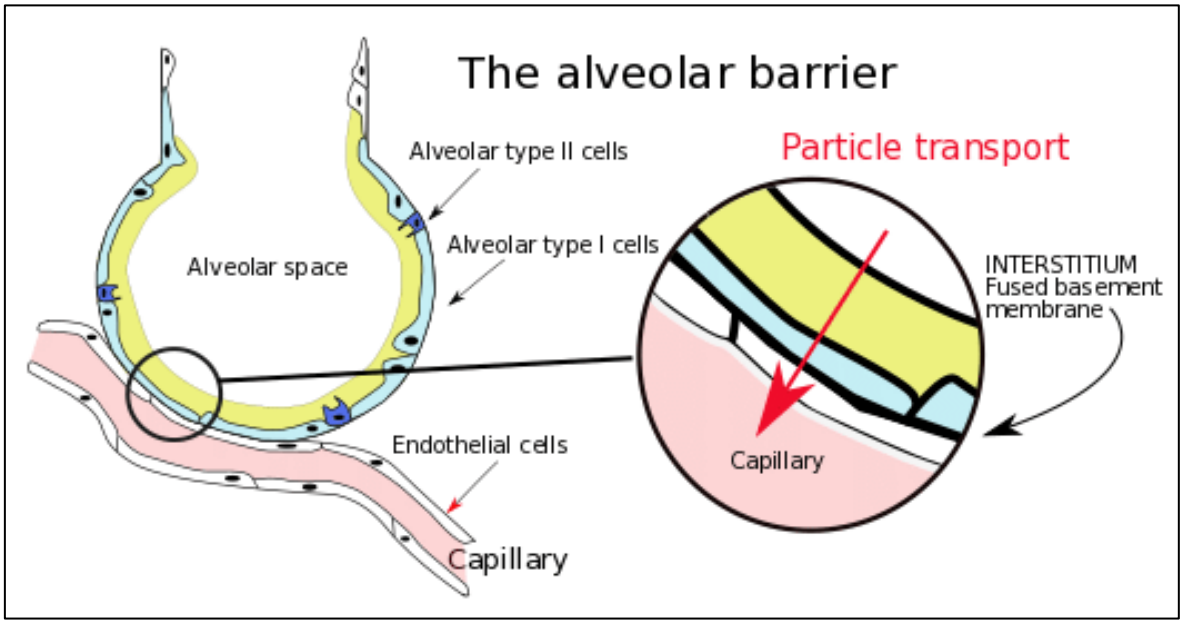


Figure 2. 8 : Schéma de la barrière alvéolo-capillaire comprenant l'épithélium alvéolaire et les cellules endothéliales constituant les capillaires sanguins (Lanièce, 2018).

La barrière alvéolo-capillaire est soumise en continu à des stimulations mécaniques importantes (Maina and West, 2005; Grotberg et al., 2025). Des forces de cisaillement sont exercées par la circulation sanguine au niveau des capillaires, tandis que des contraintes de déformation résultant des cycles respiratoires entraînent une expansion linéaire des parois alvéolaires estimée entre 8 et 12 % (Birukov et al., 2003). Ces forces mécaniques jouent un rôle important, mais encore partiellement compris, dans le développement cellulaire et dans l'expression des différentes fonctions cellulaires. Il a notamment été suggéré que la déformation cyclique des alvéoles pourrait influencer l'internalisation des particules en contact avec l'épithélium alvéolaire (Huh et al., 2012; Jia et al., 2022; Olesiejuk and Chałubiński, 2023). Le devenir des particules en contact avec la barrière alvéolo-capillaire demeure encore difficile à prédire. En fonction de la dose inhalée, de la taille, de la composition chimique ou encore de la charge électrique des particules, celles-ci peuvent former des agrégats avec le surfactant pulmonaire (Wang, Liu, et al., 2020). Ces interactions peuvent conduire à différentes réponses biologiques, incluant une toxicité cellulaire affectant les cellules épithéliales ou endothéliales, une internalisation cellulaire avec

exocytose possible vers le compartiment alvéolaire ou vasculaire, ou encore une translocation active ou passive à travers la barrière (Wang, Liu, et al., 2020).

En conditions physiologiques, l'épithélium respiratoire constitue une barrière hautement spécialisée, assurée notamment par la présence de jonctions intercellulaires étanches qui limitent le passage des PM vers les tissus sous-jacents (Velden and Versnel, 1998; Crandall and Matthay, 2001; Guillot et al., 2013). Toutefois, lors de situations d'inflammation chronique, l'intégrité de cette barrière peut être compromise (Wittekindt, 2017). Les processus de réparation épithéliale deviennent alors insuffisants pour compenser les dommages cellulaires répétés, entraînant l'apparition de lésions, de desquamations et d'une augmentation de la perméabilité épithéliale (Schlingmann et al., 2015; Godbole et al., 2022; Wang et al., 2024). Ces altérations structurelles et fonctionnelles perturbent les mécanismes de défense locales, en particulier la clairance mucociliaire, et favorisent l'apparition de manifestations respiratoires telles que l'irritation des voies aériennes, la toux, des lésions aiguës, une altération des échanges gazeux et une diminution de l'efficacité de la réponse immunitaire pulmonaire (Verma et al., 2025).

Les différents épithéliums de l'arbre respiratoire constituent, par leur organisation structurale et leurs fonctions spécifiques, une barrière physique et biochimique contre les polluants atmosphériques. La clairance mucociliaire et la sécrétion de substances protectrices telles que le mucus, les protéines tensioactives et les peptides antimicrobiens participent activement aux mécanismes de défense pulmonaire (Mason and Crystal, 1998; Fehrenbach, 2001; Williams, 2003; Mason, 2006). Cette couche protectrice, notamment le mucus au niveau des voies aériennes conductrices et le surfactant pulmonaire au niveau du tissu alvéolaire, peuvent agir comme barrière finale capable de piéger certaines particules ou composés gazeux inhalés (Siebert and Rugonyi, 2008; Alcorn, 2017). Cependant, les mécanismes d'élimination diffèrent selon les régions de l'arbre respiratoire. Dans les voies aériennes conductrices, le mucus et les particules qu'il retient sont rapidement évacuées par clairance mucociliaire et le phénomène d'expectoration. A l'inverse, dans les alvéoles, les particules ou autres composés ayant atteint ce compartiment sont piégés dans la couche de surfactant et éliminés par d'autres mécanismes de défense pulmonaire.

2.3.3. Distribution, mécanismes d'élimination et absorption des polluants inhalés

En contact permanent avec l'air inhalé, les épithéliums pulmonaires sont particulièrement vulnérables aux polluants atmosphériques, plus particulièrement aux particules ayant la capacité de pénétrer profondément dans le poumon. La déposition, le temps de rétention et les mécanismes d'élimination des particules dépendent de la nature de la région pulmonaire et de son architecture.

2.3.3.1. Comportement des flux pulmonaires aériens et mécanisme de déposition des particules.

Le système respiratoire est organisé en un ensemble de voies aériennes dont le diamètre diminue progressivement depuis les VAS jusqu'aux régions plus profondes du poumon (Lippmann et al., 1980; Fung, 1988). Lors d'une inspiration, le flux d'air prend de la vitesse dans les premiers conduits respiratoires. Plus l'air va entrer profondément dans l'appareil respiratoire, plus il va rencontrer de ramifications et donc, de bifurcations et de diminutions du diamètre des voies aériennes. La vitesse de l'air ainsi inhalé est diminuée (Dong et al., 2022). La dynamique des fluides respiratoires va suivre quasiment le même schéma (Chhabra and Prasad, 2011). Ainsi, plus une particule aura la capacité de pénétrer profondément dans l'arbre pulmonaire, plus son temps de résidence et d'élimination sera élevé (Sznitman et al., 2009). Le temps de contact entre les particules et le tissu pulmonaire sera aussi, d'autant plus important. Cette architecture pulmonaire conditionne fortement le trajet des particules inhalées, faisant de leur diamètre aérodynamique un déterminant majeur de leur dépôt, pénétration et rétention dans les différentes régions pulmonaires (Newman et al., 1982) (Figure 2. 9.).

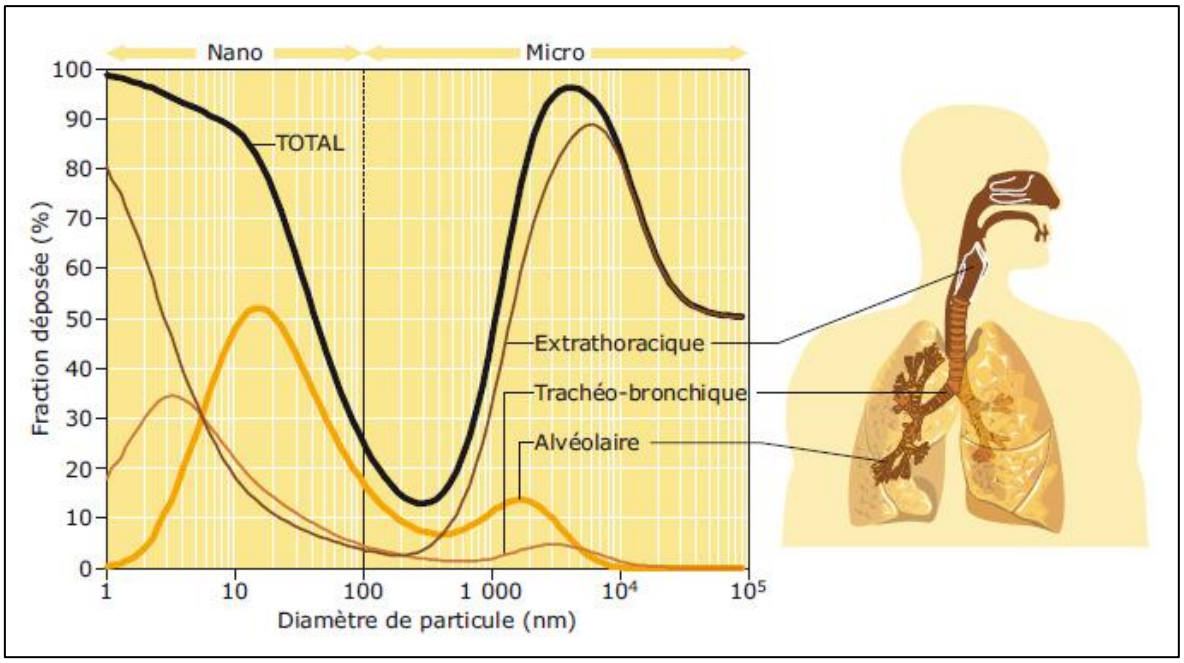


Figure 2. 9 : Dépôt total et régional chez l'homme, en fonction du diamètre des particules inhalées. Adapté de l'INRS.

2.3.3.2. Niveaux de déposition des particules selon leurs tailles

Favorisées par la diminution brutale de la vitesse de l'air inhalé lors des premières ramifications, les grosses particules, d'un diamètre aérodynamique supérieur à 10 µm (> PM_{10}), sont principalement déposées dans les voies aériennes supérieures par impaction inertielle (Tsuda et al., 1994). Les particules de tailles intermédiaires (entre $PM_{2.5}$ et PM_{10}) se déposent préférentiellement dans la région trachéo-bronchique par sédimentation gravitationnelle lorsque le flux respiratoire perd de la vitesse (Sznitman et al., 2009). A l'inverse, les $PM_{2.5}$ et $PM_{0.1}$ peuvent pénétrer profondément dans l'arbre respiratoire et ainsi, atteindre les alvéoles pulmonaires, où leur dépôt est principalement gouverné par la diffusion brownienne (Lippmann et al., 1980; Newman et al., 1982; Sznitman et al., 2009; Chhabra and Prasad, 2010). Les particules d'un diamètre inférieur ainsi que les gaz en contact avec l'épithélium alvéolaire peuvent être piégés par le surfactant pulmonaire, absorbés par les cellules épithéliales, voire traverser l'épithélium pour atteindre la circulation systémique. En conclusion, le diamètre aérodynamique des particules détermine le type et le lieu de déposition dans l'appareil respiratoire et chaque niveau de l'appareil respiratoire met en place des mécanismes d'éliminations différents pour palier à cette exposition (Figure 2. 10.) qui sont détaillés dans la partie suivante (2.3.3.3.).

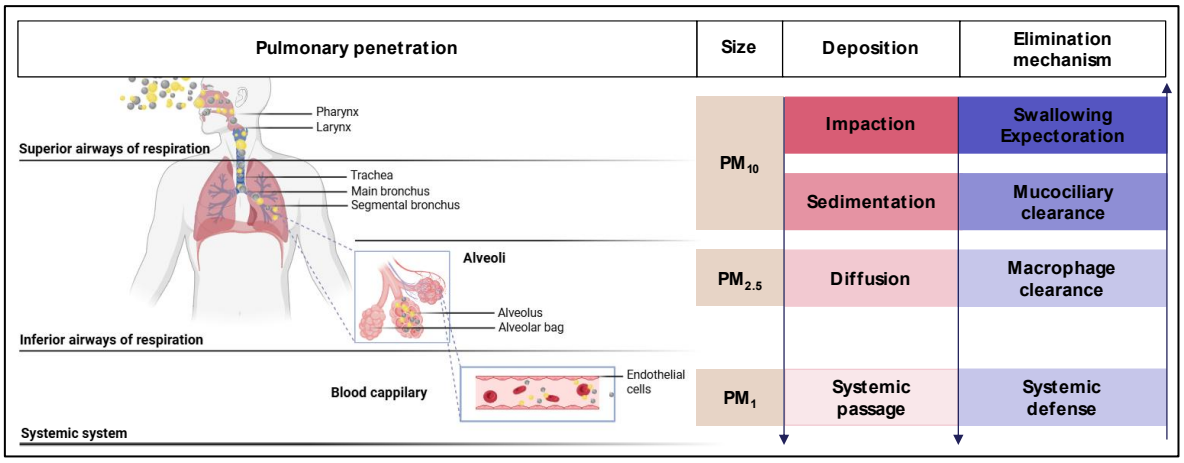


Figure 2. 10 : Trajet de l'air et des particules inhalées selon leur taille, à travers les voies aériennes supérieure et inférieure du système respiratoire humain.

2.3.3.3. Mécanismes d'élimination des particules

Dans la cavité nasopharyngée, l'élimination des particules inhalées repose essentiellement sur des mécanismes physiques. Les particules déposées par impaction sur les poils nasaux et la muqueuse sont majoritairement évacuées par déglutition, éternuement ou mouchage, limitant ainsi leur transfert vers les voies respiratoires inférieures et réduisant leur temps de rétention (Lippmann et al., 1980; Newman et al., 1982; Estimates, 1991). A la suite du conduit nasopharyngé, les cellules ciliées et muco-sécrétrices associées aux glandes sous-muqueuses de l'épithélium pseudostratifié spécialisé assurent une défense efficace par la clairance mucociliaire, piégeant et éliminant des particules inhalées (Thornton et al., 2008; Cone, 2009; Ma et al., 2018). Bien que protecteur, ce système peut être altéré en cas d'exposition répétée à des polluants, entraînant une obstruction locale et une inflammation chronique des voies aériennes (Whitsett, 2018; Raby et al., 2023). Au niveau des bronchioles, l'épithélium se simplifie et les capacités de clairance diminuent, favorisant la rétention accrue des particules de faible diamètre et donc, une exposition prolongée et plus importante des cellules épithéliales aux composés adsorbés à leur surface (Velden and Versnel, 1998; De Grove et al., 2018).

Les régions alvéolaires constituent le compartiment le plus sensible du système respiratoire du point de vue toxicologique. Elles se caractérisent par un épithélium extrêmement fin, optimisé pour les échanges gazeux, mais dépourvu de mécanismes de

clairance mucociliaire (Mason and Crystal, 1998; Williams, 2003; Guillot et al., 2013). L'élimination des particules inhalées y repose principalement sur la phagocytose par les macrophages alvéolaires, un processus lent et rapidement saturable lors d'expositions importantes, répétées ou chroniques (Bowden, 1984; Joshi et al., 2018; Wei et al., 2021). Cette capacité d'épuration limitée favorise la persistance des particules fines et ultrafines, leurs interactions prolongées avec les cellules alvéolaires et, pour les plus petites d'entre elles, une possible translocation vers la circulation systémique (Figure 2. 9.) (Oberdörster et al., 2004; Elder and Oberdörster, 2006; Shimada et al., 2006).

Points clés : L'appareil respiratoire et la pénétration des particules

Structure de l'appareil respiratoire	L'appareil respiratoire est constitué de voies aériennes supérieures et inférieures formant un arbre bronchique hautement ramifié, se terminant par la région alvéolaire.
Les alvéoles pulmonaires	Les alvéoles, lieu des échanges gazeux, représentent une région sensible en raison de leur grande surface d'échange et de la finesse de la barrière alvéolo-capillaire.
Organisation des voies respiratoires	La ramification progressive des voies aériennes entraîne une diminution du diamètre des conduits et une augmentation de la surface d'échange, favorisant le dépôt différentiel des particules inhalées selon leur taille.
Déposition des particules	Le dépôt des particules dépend principalement de leur diamètre aérodynamique : les PM_{10} se déposent dans les voies aériennes supérieures puis sont expectorées ou dégluties, les $PM_{2.5}$ et $PM_{0.1}$ atteignent les bronchioles puis les alvéoles, où leur élimination est plus lente.

2.4. Impact sanitaire et toxicité induite par les particules fines

2.4.1. Impact sanitaire des particules fines

2.4.1.1. Lien entre exposition aux PM et mortalité prématurée

En raison de leur effets systémiques et de leur capacité à affecter simultanément plusieurs organes vitaux, les $PM_{2.5}$ sont reconnues comme un facteur majeur de mortalité prématurée à l'échelle mondiale (Gamble, 1998; Atkinson et al., 2014; Huang et al., 2017; Chen, Hoek, et al., 2022; Anita et al., 2023; Chen, Braun, et al., 2023; Khomenko et al., 2023; Brauer et al., 2024). La mortalité prématurée correspond à un décès survenant avant l'âge moyen attendu dans une population donnée et constitue un indicateur majeur de l'espérance de vie non réalisée. Selon l'OMS, environ 4,2 million de décès prématurés chaque année à l'exposition à la pollution de l'air ambiant, dont une majorité liée à des pathologie cardiovasculaire et respiratoire (OMS, 2024). A l'échelle Européenne, l'impact sanitaire demeure particulièrement marqué, avec des estimations variant entre 182 000 à 904 000 décès prématurés attribuables annuellement aux $PM_{2.5}$ (Tarín-Carrasco et al., 2021; OMS, 2024; European Environment Agency, 2025)

Les relations dose-réponse établies entre l'exposition aux $PM_{2.5}$ et la mortalité ont été intégrées dans de nombreux modèles épidémiologiques globaux, montrant qu'une augmentation des concentrations de particules fines s'accompagne d'une élévation proportionnelle du risque de décès prématurés, aussi bien dans des zones faiblement polluées que dans des zones fortement polluées (Apte et al., 2015; Weichenthal et al., 2022; Sangkham et al., 2024). Ces observations confirment que l'impact sanitaire des $PM_{2.5}$ ne se limite pas aux environnements fortement pollués mais concerne également des populations exposées à des concentrations modérées.

Par ailleurs, les analyses récentes de la charge mondiale de morbidité indiquent que la pollution par les $PM_{2.5}$ constitue l'un des principaux facteurs de risque environnementaux pour la santé humaine (Brauer et al., 2024). En 2021, la pollution atmosphérique liée aux particules fines représentait le premier facteur de risque individuel contribuant à la charge mondiale de morbidité, responsable d'environ 8,0 % des années de vie ajustées sur

l'incapacité (disability-adjusted life-years, DALY), devant d'autres facteurs majeurs tels que l'hypertension artérielle systolique (7,8 %), le tabagisme (5,7 %) ou encore l'hyperglycémie à jeun (5,4 %). Ces résultats soulignent le poids sanitaire considérable des particules fines comparativement à d'autres déterminants majeurs de santé publique (Brauer et al., 2024).

Une exposition de courte durée à des pics de $PM_{2.5}$ peut entraîner des effets aigus sur la santé, notamment une augmentation des symptômes respiratoires et des événements cardiovasculaires (Dockery et al., 1993; Nhung et al., 2017). À plus long terme, une exposition chronique aux $PM_{2.5}$ est associée au développement de nombreuses pathologies, incluant des maladies cardiovasculaires et cérébrovasculaires, ainsi que des maladies respiratoires chroniques (de Bont et al., 2022; Holtjer et al., 2023). Ces pathologies contribuent de manière significative à la mortalité attribuable à la pollution atmosphérique à l'échelle mondiale (Cohen et al., 2017; Burnett et al., 2018; Chen and Hoek, 2020).

Par ailleurs, les données épidémiologiques actuelles indiquent qu'aucun seuil d'exposition aux $PM_{2.5}$ ne peut être considéré comme totalement sûr. Même à de faibles concentrations, les particules en suspension dans l'air ambiant sont associées à une augmentation mesurable des risques pour la santé, soulignant l'importance de limiter l'exposition de la population à ces polluants atmosphériques (Pinault et al., 2016; Cohen et al., 2017; Brunekreef et al., 2021; Strak et al., 2021; Dominici et al., 2022; Brauer et al., 2024).

2.4.1.2. Altérations des fonctions physiologiques essentielles

Les $PM_{2.5}$ contribuent à un large éventail de maladies hépatiques, cardiovasculaires et neurologiques telles que l'augmentation significatif du nombre d'infarctus, d'accidents vasculaires cérébraux, de démences et de cancers (Anderson et al., 2012; Heal et al., 2012; Kim et al., 2015; Rajagopalan et al., 2018; Fu et al., 2019; Tsai et al., 2019; Sharma et al., 2020; Bhatnagar, 2022; de Bont et al., 2022; Thangavel et al., 2022; Yang et al., 2022; Hassanipour et al., 2023; Krittanawong et al., 2023; Liu, Zhang, et al., 2023; Xu et al., 2023; Portugal et al., 2024; Sangkham et al., 2024; Feng et al., 2025). Plus particulièrement, les $PM_{2.5}$ sont fortement associées au développement d'affections pulmonaires, allant de troubles respiratoires bénins à des pathologies chroniques susceptible d'altérer durablement la fonction respiratoire et d'entraîner des conséquences majeures pour la

santé pulmonaire (Oberdörster, 2000; Kim et al., 2015; Leclercq et al., 2016; Sharma et al., 2020; Hoffmann et al., 2022; Pyo et al., 2022; Holme et al., 2023; Tran et al., 2023; Wang et al., 2025; Xu et al., 2025). À l'échelle mondiale, l'exposition à long terme aux $PM_{2.5}$ ambiantes était responsable de 17,1 % des décès par cardiopathie ischémique, de 14,2 % des décès par AVC, de 16,5 % des décès par cancer du poumon, de 24,7 % des décès par infections respiratoires basses et de 27,1 % des décès par BPCO en 2015 (Cohen et al., 2017; State of Global Air, 2017; Burnett et al., 2018). Par ailleurs, l'exposition à ces particules est également associée à 5 à 10 millions de consultations annuelles aux urgences pour asthme dans le monde (Anenberg et al., 2018).

2.4.2. Impacts sanitaires des émissions de la combustion de biomasse

Parmi les sources anthropiques de $PM_{2.5}$, les émissions résidentielles restent particulièrement impactantes pour la santé humaine, représentant de 15 à 64 % des décès prématurés, dont une proportion importante est liée aux maladies respiratoires (Kocbach Bølling et al., 2009; Kelly and Fussell, 2020; Karanasiou et al., 2021; Chowdhury et al., 2022; Khomenko et al., 2023; Gould et al., 2024).

Diverses études ont établi une corrélation positive entre les émissions issues de la combustion de biomasse et l'augmentation de la fréquence de la toux, des sifflements respiratoires, de l'hypersécrétion de mucus, de l'inflammation et des infections respiratoires telles que la bronchite chronique ou la BPCO (Zelikoff et al., 2002; Orozco-Levi et al., 2006; Naeher et al., 2007; Sigsgaard et al., 2015; Wardoyo, 2019; Karanasiou et al., 2021; Kamal et al., 2022; Koval et al., 2022). Des études compilées dans la revue de Naeher et al. (2007) montrent un accroissement de symptômes respiratoires chez les enfants résidant à proximité de poêles à bois tels qu'une respiration sifflante, de la toux, des réveils nocturnes, des congestions avec une diminution de la fonction pulmonaire et une augmentation de la prévalence de bronchiolites et pneumonies. D'autres études réalisées sur des femmes vivant dans des foyers dotés de cheminées ont rapporté divers symptômes respiratoires comme des maux de gorge, une oppression thoracique ou encore une augmentation des expectorations (Naeher et al., 2007).

Des analyses plus récentes de Karanasiou en 2021, compilant plus de soixante études épidémiologiques, a mis en évidence une association positive entre l'exposition aux émissions issues de la combustion de biomasse et l'augmentation des consultations aux urgences et des hospitalisations pour affections respiratoires telles que l'asthme, la bronchite, la pneumonie ou la BPCO. Plus spécifiquement, les résultats de méta-analyses indiquent qu'une augmentation de 10 $\mu g \cdot m^{-3}$ des concentrations de $PM_{2.5}$ issues de la combustion de biomasse est associée à une augmentation moyenne d'environ 4 % des admissions hospitalières pour affections respiratoires. Ces résultats confirment le rôle significatif des émissions de biomasse dans l'aggravation des pathologies respiratoires et renforcent les observations issues d'études antérieures (Karanasiou et al., 2021).

Une autre étude de 2015, a démontré la corrélation positive entre les particules de combustion de biomasse et la diminution de la fonction pulmonaire, l'augmentation des hospitalisations pour affections respiratoires et les consultations aux urgences pour asthme ou encore les hospitalisations chez les jeunes enfants issus de régions du monde où la combustion de biomasse demeure la première source de pollution atmosphérique (Sigsgaard et al., 2015). Cette étude a aussi permis d'analyser l'impact sanitaire de plusieurs stratégies d'intervention visant à réduire l'exposition aux émissions issues de la combustion du bois aux États-Unis, au Canada et en Australie. Dans une ville des États-Unis, à Libby (Montana), le remplacement des poêles à bois a conduit à une diminution significative des symptômes respiratoires chez les enfants. Ces améliorations cliniques sont cohérentes avec une réduction de l'exposition aux $PM_{2.5}$. En Australie, à Launceston, une politique de transition énergétique ayant entraîné une baisse de l'utilisation du bois comme combustible domestique de 66 % à 30 % s'est traduite par une diminution significative de la mortalité, avec une réduction de 18 % des décès d'origine cardiovasculaire et de 28 % des décès liés à des causes respiratoires (Sigsgaard et al., 2015).

2.4.3. Impacts sanitaires des aérosols organiques secondaires

Dans le prolongement des effets sanitaires associés aux $PM_{2.5}$ et aux émissions issues de la combustion de biomasse, une attention croissante est portée aux contributions spécifiques des AOS, qui constituent une fraction importante et variable de la masse des particules atmosphériques. À l'échelle mondiale, la concentration moyenne de AOS a été

estimée à environ 2,2 µg/m^3, avec des niveaux particulièrement élevés en Asie du Sud (4 à 5 µg/m^3), notamment au Népal, en Inde et au Bangladesh (Chowdhury et al., 2022). Cette exposition contribuerait à environ 260 000 décès supplémentaires par an, représentant environ 61 décès pour 1 000 décès attribués aux $PM_{2.5}$, avec une contribution particulièrement importante en Inde et en Chine avec respectivement 30 % et 24 % du total mondial (Chowdhury et al., 2022). Les AOS issus de la combustion de biomasse sont le deuxième contributeur le plus important, représentant 12 % du total des décès liés aux AOS anthropiques. Il est le principal contributeur en Afrique de l'Ouest, en Amérique du Sud et en Asie du Sud-Est.

D'autres travaux confirment l'importance sanitaire des AOS anthropiques, estimant que 340 000 à 370 000 décès prématurés par an pourraient être attribués à cette seule fraction des $PM_{2.5}$, en particulier dans les grandes zones urbaines où les émissions de COV, notamment aromatiques, favorisent leur formation (Nault et al., 2021). Ces observations soulignent le rôle central des sources urbaines, incluant le trafic routier et certaines activités industrielles, dans la formation des AOS et leur contribution aux impacts sanitaires liés à la pollution atmosphérique (Nault et al., 2021). Par ailleurs, plusieurs analyses épidémiologiques ont mis en évidence une association robuste entre l'exposition aux AOS et l'augmentation de la mortalité cardiorespiratoire, indépendamment de la masse totale de $PM_{2.5}$, suggérant un rôle spécifique de ces composés dans les effets sanitaires observés (Pye et al., 2021).

Au-delà des estimations globales de mortalité, plusieurs études réalisées suggèrent que les fractions organiques des particules, incluant les AOS, pourraient présenter une toxicité intrinsèque plus élevée que certains constituants inorganiques des $PM_{2.5}$, en raison notamment de leur potentiel oxydant et de leur capacité à induire des réponses inflammatoires et oxydatives (Baumgartner et al., 2014; Verma et al., 2015; Park et al., 2018; Bates et al., 2019; Daellenbach et al., 2020; Puthussery et al., 2020; Chowdhury et al., 2022). Ces effets biologiques sont étroitement associés à l'augmentation des pathologies cardiorespiratoires, incluant des maladies respiratoires chroniques telles que l'asthme ou la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO), ainsi qu'à l'aggravation de pathologies pulmonaires préexistantes (Verma et al., 2015; Park et al., 2018; Bates et al., 2019; Daellenbach et al., 2020).

Toutefois, l'attribution d'effets sanitaires spécifiques aux AOS demeure complexe dans les études épidémiologiques, car les populations sont exposées simultanément à un ensemble de polluants atmosphériques constituant un exposome complexe. Ainsi, bien que plusieurs travaux aient montré une association entre l'augmentation des concentrations d'AOS et celle de la mortalité cardiorespiratoire, il reste difficile d'isoler précisément la contribution propre des AOS par rapport aux autres constituants particulaires ou gazeux (Nault et al., 2021; Pye et al., 2024). Dans ce contexte, le recours à des approches expérimentales contrôlées, notamment *in vitro*, apparaît essentiel pour étudier les effets biologiques spécifiques des AOS et mieux comprendre les mécanismes cellulaires impliqués dans leur toxicité pulmonaire et leur potentielle association avec les affections cardiovasculaires.

2.4.4. Toxicité pulmonaire et mécanismes cellulaires

2.4.4.1. Réaction en cascades

Le potentiel toxique des particules dépend de nombreuses propriétés physico-chimiques, telles que leur composition chimique, leur solubilité, leur réactivité de surface, leur capacité à s'agréger, leur surface spécifique ou encore leur diamètre aérodynamique (Valavanidis et al., 2008; Araujo and Nel, 2009; Kelly and Fussell, 2012). Ces caractéristiques, incluant notamment la charge, l'hydrophobicité, la taille et la forme des particules, conditionnent leur comportement après dépôt dans les régions profondes du poumon.

Au niveau alvéolaire, les particules fines peuvent interagir avec la couche de surfactant pulmonaire, soit individuellement soit sous forme d'agrégats, avec ou sans enrobage lipidique. Ces interactions peuvent modifier leurs propriétés physico-chimiques et influencer leur devenir biologique. Elles peuvent notamment perturber l'organisation des structures lipidiques du surfactant, entraîner une séquestration partielle de ses constituants et altérer son métabolisme. Certaines particules peuvent être éliminées par les mécanismes de clairance associés au surfactant, tandis que d'autres peuvent traverser cette interface et atteindre la barrière alvéolo-capillaire, influençant ainsi leur internalisation cellulaire ou leur translocation vers la circulation systémique (Figure 2. 11.) (Wang et al., 2020).

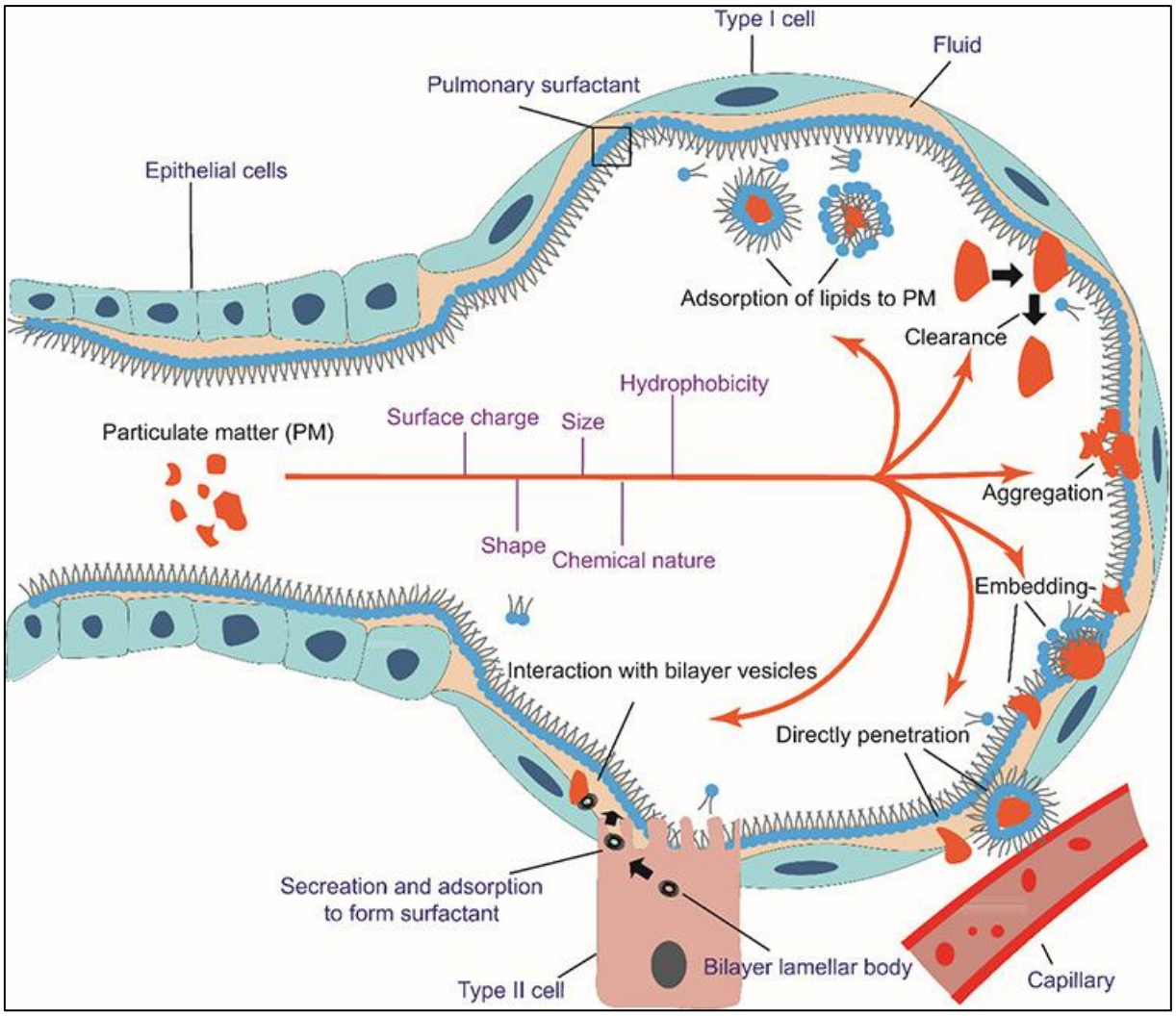


Figure 2. 11. : Inhalation, comportement et élimination des particules fines dans les alvéoles. Adaptée de (Wang et al., 2020).

L'ensemble de ces mécanismes contribue à la vulnérabilité particulière des régions profondes du poumon et participe au potentiel toxique accru des particules fines et ultrafines inhalées. Ces particules interagissent notamment avec les PT1, qui recouvrent la majeure partie de la surface alvéolaire, ainsi qu'avec le surfactant pulmonaire, dont l'altération est impliquée dans le développement de nombreuses pathologies respiratoires (Hall et al., 1990; Veldhuizen et al., 1995; Kuroki et al., 1998; Beers et al., 1999; Bridges et al., 2000; Cole, 2003; Bai et al., 2016; Alcorn, 2017; Sorensen, 2018; Mousseau, 2019).

Ces interactions initient les premières étapes des mécanismes de toxicité alvéolaire, déclenchant fréquemment des réactions en cascade, telles que l'activation de réponses (pro-)inflammatoires, de stress oxydatif et de dommages mitochondriaux contribuant à

l'amplification des effets cytotoxiques et à l'installation de réponses pathologiques locales et systémiques (Deng et al., 2013; Bai et al., 2016; Peixoto et al., 2017; Wei et al., 2021; Salana and Verma, 2024).

Rapidement, les $PM_{2.5}$ atteignant l'épithélium entraînent une surproduction d'espèces réactives de l'oxygène (ROS, *Reactive Oxygen Species*) et une inflammation locale (Kelly, 2003; Mudway et al., 2020; Hou et al., 2024). Le stress oxydant et l'inflammation constituent deux processus étroitement interconnectés qui participent à l'amplification des réponses cellulaires (Traboulsi et al., 2017). Lorsque ces mécanismes persistent, les capacités de défense peuvent être dépassées, conduisant à une dérégulation des fonctions cellulaires. La génotoxicité induite et les désordres mitochondriaux qui en résultent peuvent alors aboutir à l'activation des voies de mort cellulaires programmées (Figure 2. 12.) (Kelly, 2003; Peixoto et al., 2017; Wei et al., 2021; Salana and Verma, 2024).

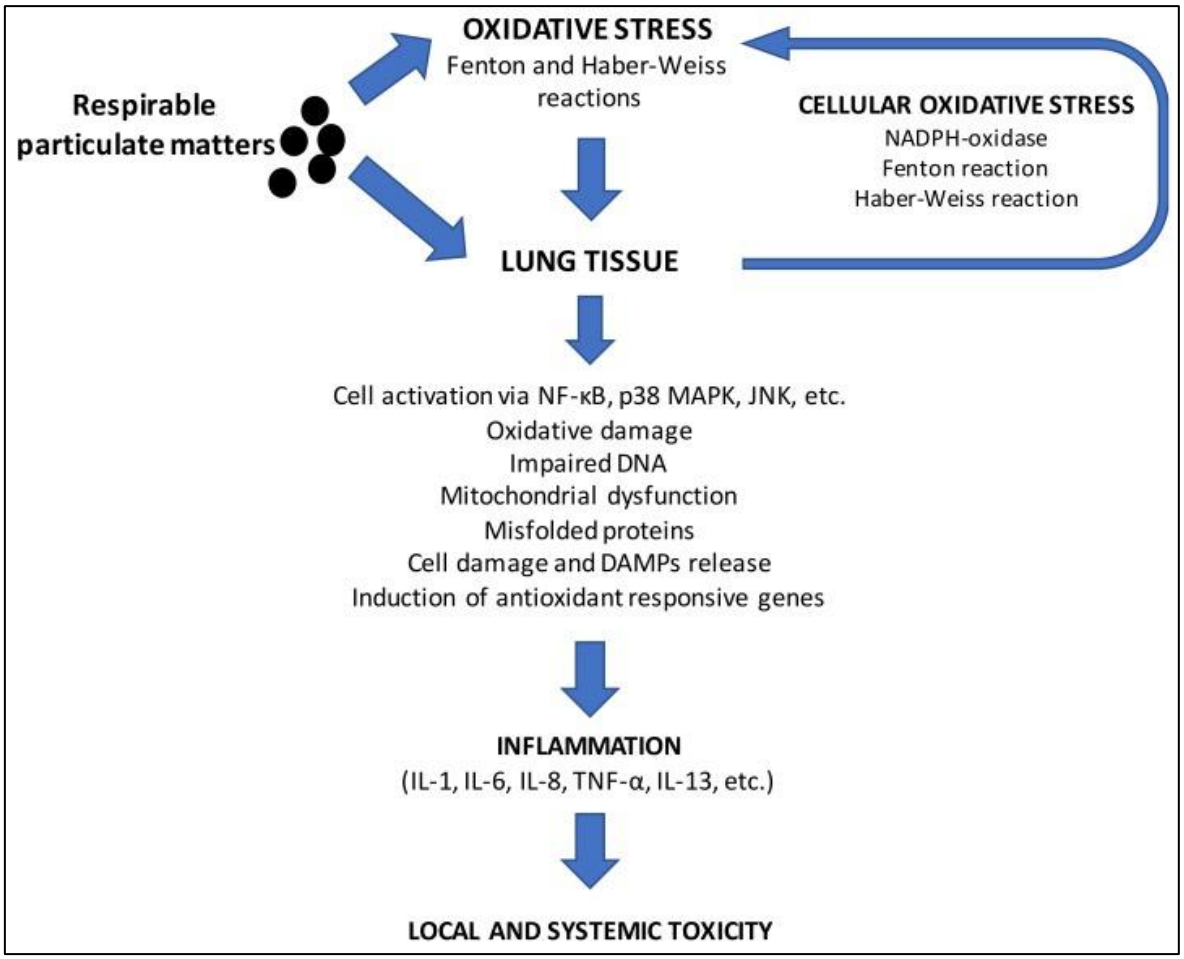


Figure 2. 12. : Voies biologiques reliant le stress oxydatif induit par les particules atmosphériques et leurs effets subséquents au niveau pulmonaire et systémique. Issus de (Corsini et al., 2019).

2.4.4.2. Mécanismes spécifiques

Le stress oxydatif constitue l'un des mécanismes centraux de la toxicité induite par les particules inhalées. Il résulte d'une production excessive d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), générées à la fois directement à la surface des particules et indirectement après leur internalisation cellulaire et leur biotransformation intracellulaire (Kelly, 2003; Risom et al., 2005; Baeza and Marano, 2007; Mazzoli-Rocha et al., 2010; Gangwar et al., 2020; Mudway et al., 2020; Hou et al., 2024). Certains métaux de transition (Fe, Cu, Mn) peuvent catalyser des réactions d'oxydo-réduction, notamment *via* les réactions de Fenton et de Haber-Weiss, conduisant à la formation d'intermédiaires réactifs comme les radicaux OH et HOCl, à

l'altération mitochondriale et à l'augmentation du stress oxydant (Kelly, 2003; Ding, Guan, et al., 2020; Samet et al., 2020; Su, Ma, et al., 2020; Zhai et al., 2022; Hou et al., 2024).

L'action des ROS qui en résulte peut entraîner des dommages oxydatifs affectant l'ADN et l'ARN, la peroxydation lipidique, la carbonylation des protéines et altérer plusieurs fonctions mitochondriales (Horton et al., 1987; Risom et al., 2005; Møller et al., 2013; Lai et al., 2016; Ding, Guan, et al., 2020; Gangwar et al., 2020; Su, Jin, et al., 2020; Thimmulappa et al., 2020; An et al., 2024). L'augmentation du stress oxydatif altère l'homéostasie du calcium intracellulaire, le potentiel de membrane mitochondrial et la dynamique mitochondriale, conduisant à une diminution de l'efficacité respiratoire et de la production d'ATP (Pardo et al., 2019; Ding, Guan, et al., 2020; Su, Jin, et al., 2020). Par ailleurs, des composés organiques tels que les HAP ont été associés à une augmentation de la production de ROS mitochondriales, à une réduction de la respiration cellulaire et à une altération de la production d'ATP (Pardo et al., 2019; Qi et al., 2019; Duan et al., 2020). Par ailleurs, des composés organiques tels que les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) ont été associés à une augmentation de la production de ROS mitochondriales, à une réduction de la respiration cellulaire et à une altération de la production d'ATP (Pardo et al., 2019). Ces ROS mitochondriaux peuvent être partiellement régulés par le facteur de transcription NRF2, impliqué dans la réponse cellulaire au stress oxydatif (Pardo et al., 2019; Ding, Guan, et al., 2020; Duan et al., 2020).

En réponse à ces agressions, les cellules activent des mécanismes de défense antioxydante principalement régulés par le facteur de transcription NRF2, considéré comme un régulateur central de l'homéostasie redox(Kaspar et al., 2009; Ma, 2013; Gao et al., 2021). NRF2 contrôle l'expression de nombreuses enzymes impliquées dans la neutralisation des ROS et les processus de détoxification (superoxyde dismutase, catalase, glutathion péroxydase, glutathion réductase, glucose-6-phosphate déshydrogénase), ainsi que des mécanismes non enzymatiques impliquant les vitamines A, C et E ou la ferritine (Kaspar et al., 2009; Deng et al., 2013; Ma, 2013; Pardo et al., 2019; Pardo, Qiu, et al., 2020; Gao et al., 2021). Lorsque la production de ROS dépasse les capacités de ces systèmes de protection, un état de stress oxydatif s'installe, favorisant l'activation de réponses inflammatoires et contribuant à l'altération des fonctions cellulaires et tissulaires (Figure 2. 13.) (Kelly, 2003; Gurjar et al., 2010; Mazzoli-Rocha et al., 2010; Mudway et al., 2020; Zhai

et al., 2022; Hou et al., 2024). Ce stress oxydatif persistant est impliqué dans le développement et la progression de pathologies respiratoires chroniques telles que la BPCO, l'asthme ou certaines pathologies tumorales pulmonaires (Bowler and Crapo, 2002; Kelly and Fussell, 2012; Mudway et al., 2020; Sierra-Vargas et al., 2023).

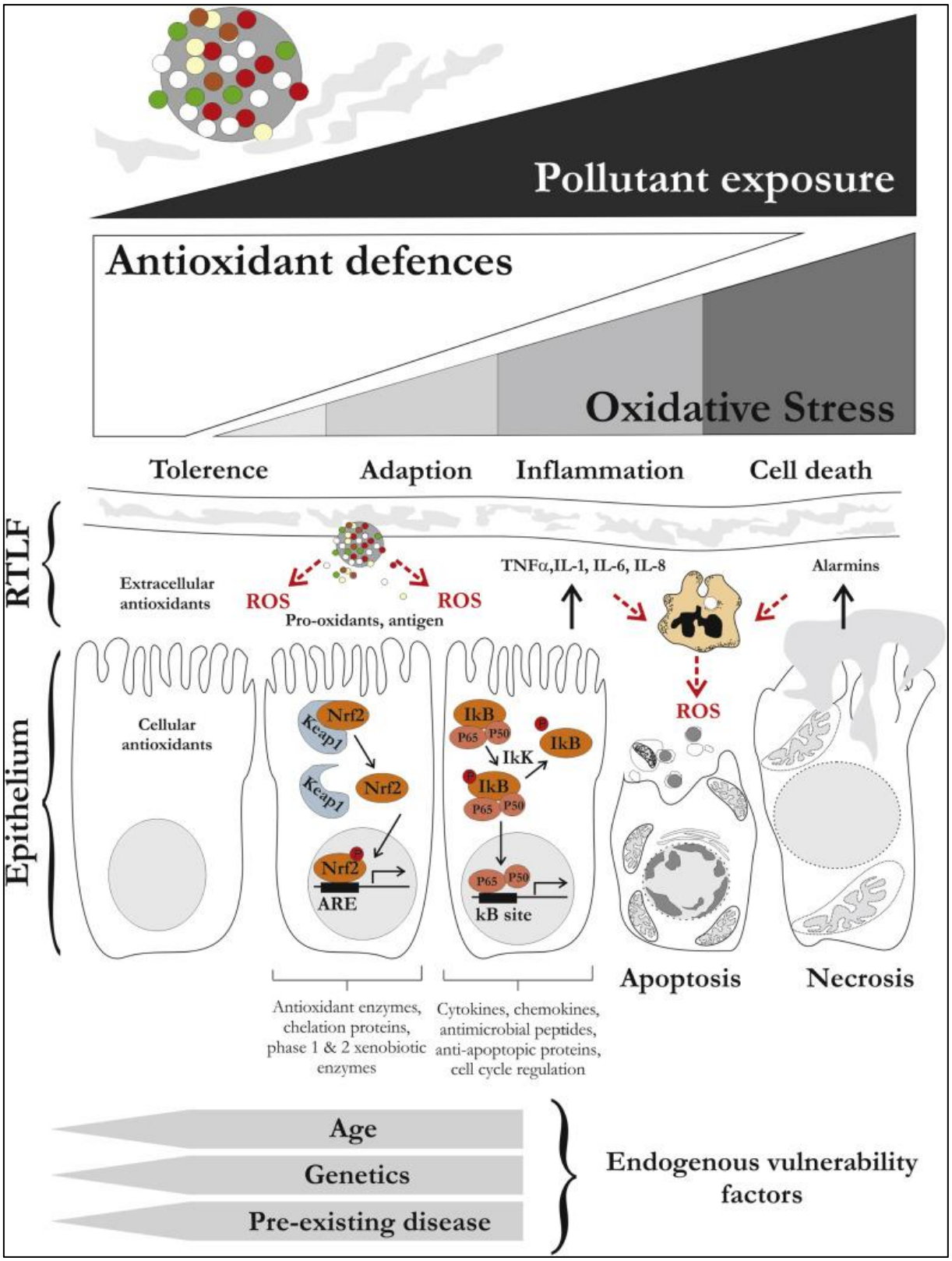


Figure 2. 13. : Modèle de réponse hiérarchique illustrant les étapes séquentielles proposées de la réponse au stress oxydatif induit par les polluants à l'interface air-poumon. Adapté de (Mudway et al., 2020).

Le stress oxydatif constitue également un signal majeur d'activation des voies inflammatoires, établissant un lien étroit entre déséquilibre redox et réponse immunitaire pulmonaire. La réaction inflammatoire directement induite ou subséquente au stress oxydant constitue une réponse majeure aux expositions au $PM_{2.5}$ (Tsai et al., 2012; Øvrevik et al., 2017; Wang et al., 2017; de Oliveira Alves et al., 2020; Leikauf et al., 2020). Elle repose sur l'activation de voies de signalisation intracellulaire, notamment la voie NF-κB, conduisant à la production et à la libération de médiateurs inflammatoires tels que les cytokines et les chimiokines, qui assurent la communication cellulaire et le recrutement des cellules immunitaires (Figure 2. 13.) (King, 2007; Turner et al., 2014; Ray et al., 2016; Mudway et al., 2020).

Au niveau alvéolaire, les macrophages, mais aussi les PT1 et PT2 participent au déclenchement de la réponse inflammatoire en produisant des cytokines (pro)-inflammatoires et des ROS. Une boucle d'amplification entre stress oxydatif et inflammation peut alors s'installer : la production de ROS active des voies inflammatoires, qui en retour stimulent une production supplémentaire d'espèces réactives *via* les mitochondries, contribuant à l'accumulation de médiateurs dans les zones lésées et à l'induction de dommages cellulaires (Baeza and Marano, 2007; Tsai et al., 2012; Peixoto et al., 2017; de Oliveira Alves et al., 2020; Mudway et al., 2020; Salana and Verma, 2024).

La régulation de cette réponse repose notamment sur l'équilibre entre les voies NF-κB, associées à des réponses (pro)-inflammatoires, et NRF2, impliquée dans l'induction de mécanismes antioxydants et anti-inflammatoires. L'existence d'un crosstalk fonctionnel entre ces deux voies constitue un élément clé dans le contrôle de l'intensité et de la durée de la réponse inflammatoire et un déséquilibre peut favoriser l'amplification des réponses inflammatoires et l'installation d'un état inflammatoire persistant (Gao et al., 2021). Lorsque ces mécanismes de régulation sont dépassés, l'inflammation peut devenir chronique et s'étendre à l'échelle systémique, contribuant au développement ou à l'aggravation de pathologies respiratoires et cardiovasculaires, telles que l'asthme, BPCO ou certaines maladies cardiovasculaires (Schwarze et al., 2006; Bhatt and Dransfield, 2013; Corsini et al., 2019; Arias-Pérez et al., 2020; Duan et al., 2020).

Dans la continuité du stress oxydatif, de l'inflammation et des dommages moléculaires induits par les particules atmosphériques, les cellules peuvent engager différents mécanismes de mort cellulaire. Ces processus incluent plusieurs formes de morts cellulaires régulées, telles que l'apoptose, la nécroptose, la pyroptose ou la ferroptose, qui participent au maintien de l'homéostasie tissulaire mais peuvent également contribuer au développement de pathologies lorsqu'ils sont dérégulés (Figure 2. 14.) (Fink and Cookson, 2005; Martin et al., 2005; Dagher et al., 2006; King, 2007; Peixoto et al., 2017; Traboulsi et al., 2017; Lee et al., 2023).

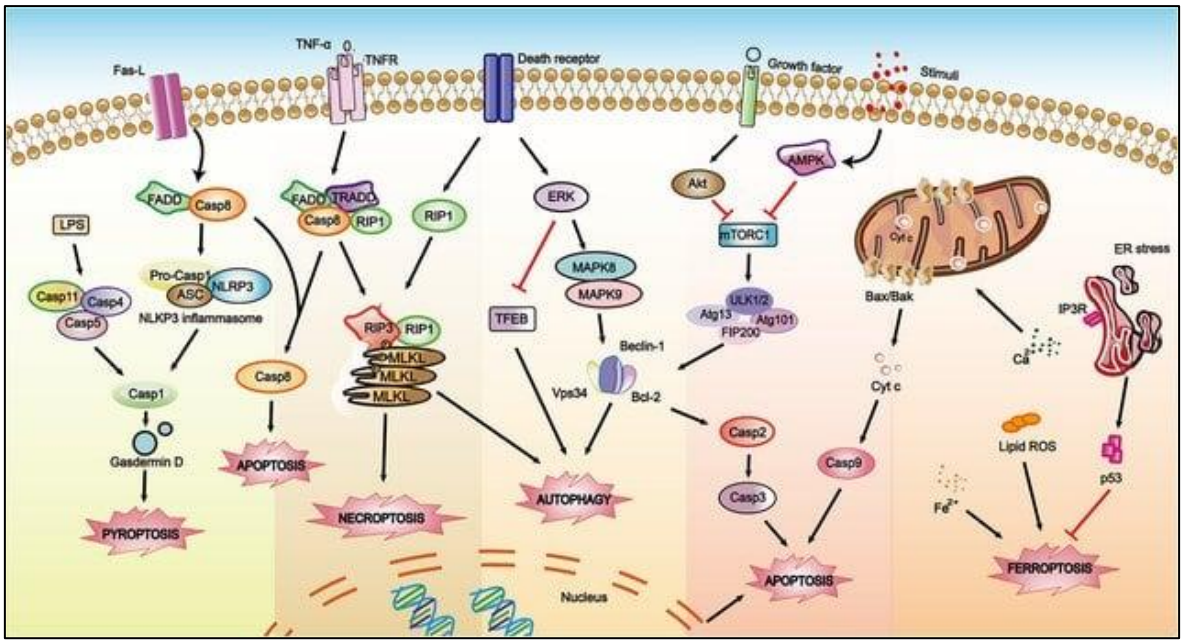


Figure 2. 14. : Biomarqueurs impliqués dans les RCD (voies de mort programmées) et les régulations croisées entre différentes voies de signalisation. Les flèches pleines indiquent les interactions activatrices, tandis que les lignes en forme de T indiquent les interactions inhibitrices. Adapté de (Hu et al., 2021).

L'apoptose constitue l'une des formes les mieux caractérisées de mort cellulaire programmée (Fink and Cookson, 2005; Martin et al., 2005; Dagher et al., 2006; Kiraz et al., 2016; Land, 2018; Wang and Tang, 2020; Lee et al., 2023; Wang, Wang, et al., 2023). Elle implique l'activation de caspases, conduisant au bourgeonnement puis à une fragmentation cellulaire sans relargage du contenu extracellulaire. Ce processus peut être initié par l'activation de récepteurs de mort cellulaire, tels que TNF ou Fas (CD95), ou par des signaux intrinsèques liés à la mitochondrie, notamment la libération de cytochrome c consécutive

à une altération du potentiel mitochondrial, en lien direct avec le stress oxydatif précédemment décrit (Powell et al., 1999; Matsuno et al., 2001; Thome and Tschopp, 2001; Peixoto et al., 2017). Lors de leur internalisation dans les cellules, les $PM_{2.5}$ peuvent induire l'apoptose en altérant l'activité mitochondriale par l'intermédiaire du stress oxydatif ou d'un stress du réticulum endoplasmique (Liu, Zhang, et al., 2019; Wang and Tang, 2020).

À l'inverse, la nécrose et certaines formes apparentées telles que la nécroptose sont caractérisées par une perte d'intégrité membranaire et une libération non contrôlée du contenu cytoplasmique, contribuant à l'amplification des réponses inflammatoires. Bien que classiquement associée à des conditions d'ischémie ou d'hypoxie, des contraintes mécaniques telles que le cisaillement (« shear stress ») ou la surdistension alvéolaire peuvent également provoquer une rupture directe des membranes épithéliales et induire une nécrose locale (Dos Santos and Slutsky, 2000; Plötz et al., 2004). Ce phénomène, est accompagné de l'activation des voies de signalisation AhR et de remodelage cellulaire (Han et al., 2008; Milovanova et al., 2008; Conway et al., 2009; Lano et al., 2020).

En parallèle, l'autophagie constitue un mécanisme adaptatif permettant l'élimination des constituants cellulaires endommagés, notamment en réponse au stress oxydatif. L'exposition aux $PM_{2.5}$ peut moduler l'activité autophagique, soit en l'induisant *via* des voies de signalisation telles que PI3K/AKT/mTOR dépendantes du stress oxydatif, soit en perturbant le flux autophagique, conduisant à une accumulation de vacuoles intracellulaires et à une altération de l'homéostasie cellulaire (Su et al., 2017; Wang and Tang, 2020; Wang, Wang, et al., 2023; Ebrahimi et al., 2025). Selon l'intensité et la durée de l'exposition, l'autophagie peut ainsi jouer un rôle protecteur ou contribuer à la mort cellulaire. Un dysfonctionnement du flux autophagique, ou une autophagie défectueuse, favorise l'apoptose cellulaire (Wang 2020). L'exposition aux PM2.5 induit la production de ROS qui stimule l'autophagie et favorise le comportement malin des cellules cancéreuses pulmonaires (Deng et al., 2017).

Plus récemment, la ferroptose a été identifiée comme une forme spécifique de mort cellulaire régulée dépendante du fer, caractérisée par une accumulation de produits de peroxydation lipidique (Lee et al., 2023; Yu and Sun, 2023; Wang et al., 2024). Ce mécanisme apparaît particulièrement pertinent dans le contexte de l'exposition aux $PM_{2.5}$

riches en métaux, qui favorisent la production de ROS et la dérégulation du métabolisme du fer et des lipides, contribuant ainsi à l'apparition de lésions cellulaires et tissulaires (Yue et al., 2023; Liu et al., 2024; Gong et al., 2025).

Finalement, ces mécanismes de mort cellulaire participent à l'élimination des cellules endommagées au sein de l'épithélium pulmonaire et permettent d'initier les mécanismes de réparation et de régénération des cellules (Yu and Sun, 2023; Wang et al., 2024). Toutefois, leur activation excessive ou dérégulée contribue à l'altération des fonctions tissulaires et au développement de processus pathologiques, notamment dans les contextes tumoraux (Zagryazhskaya et al., 2015; Liu et al., 2022; Peng, Liao, et al., 2022; Gong et al., 2023; Wei et al., 2023; He, Liu, et al., 2024; Mao et al., 2024; Meng et al., 2025).

En parallèle des mécanismes de mort cellulaire, les dommages moléculaires induits par les particules atmosphériques peuvent également affecter directement l'intégrité du matériel génétique, conduisant à des effets génotoxiques. Selon leur taille et leur composition chimique, les particules atmosphériques peuvent induire des effets génotoxiques par des mécanismes directs et indirects(Schins and Knaapen, 2007; Gminski et al., 2010). Certains constituants chimiques, notamment certains métaux, HAP, leurs dérivés nitrés, ainsi que certains composés organiques réactifs tels que les quinones ou composés carbonylés, sont capables de générer des ROS ou de former des métabolites électrophiles susceptibles d'interagir avec l'ADN (Schins and Knaapen, 2007; Dizdaroglu, 2012; Di Bucchianico et al., 2018; Holme et al., 2023). Ces mécanismes peuvent conduire à la formation de lésions oxydatives et structurales de l'ADN, incluant la formation d'adduits à l'ADN, des cassures simple ou double brin, ainsi que des mutations ponctuelles, délétions ou insertions aléatoires de paires de bases, susceptibles d'initier des processus de mutagenèse et de cancérogenèse (Knaapen et al., 2004; Dizdaroglu, 2012; Saks et al., 2017).

Face à ces altérations, les cellules activent plusieurs mécanismes de défense incluant les systèmes de réparation de l'ADN, l'arrêt du cycle cellulaire ou l'induction de voies de mort cellulaire programmée (Land, 2018; Hu et al., 2021). Toutefois, lorsque ces mécanismes deviennent insuffisants ou inefficaces, l'accumulation d'erreurs génétiques favorise l'instabilité génomique et peut conduire, à long terme, au développement de processus

tumoraux (Knaapen et al., 2004; Monks et al., 2009; Gurjar et al., 2010; Peixoto et al., 2017; do Nascimento et al., 2023; Holme et al., 2023).

2.4.5. Toxicité pulmonaire spécifique des AOS et verrous scientifiques

Les AOS peuvent être issus de sources biogéniques ou anthropiques, et leur formation dépend fortement de la présence de polluants gazeux anthropiques tels que SO_2, NO_x et O_3 (Monks et al., 2009; Rattanavaraha et al., 2016; Shrivastava et al., 2019; Zhang et al., 2019). Leur composition chimique est particulièrement complexe et comprend une large gamme de composés organiques oxygénés tels que des alcools, cétones, aldéhydes, peroxydes organiques et esters, dont la nature dépend à la fois de l'abondance des précurseurs et des conditions environnementales rencontrées lors de leur formation (Déméautis et al., 2022; Salana and Verma, 2024). Cependant, peu de travaux portent sur leur toxicité.

Des études expérimentales indiquent que les AOS peuvent induire des effets délétères sur les cellules pulmonaires. Il a notamment été montré que l'exposition à des AOS entraîne une diminution de la viabilité cellulaire ainsi qu'une production accrue de ROS, et plus particulièrement d'H_2O_2, susceptibles d'induire des effets cytotoxiques et inflammatoires (Lin et al., 2016, 2017; Chowdhury et al., 2018, 2019; Ito et al., 2019; Liu et al., 2020; Li, Misovich, et al., 2022; Liu, Xu, et al., 2023). La toxicité des AOS dépend fortement de leurs propriétés physico-chimiques, elles-mêmes influencées par les conditions environnementales. Des facteurs tels que la température, l'humidité relative, l'hygroscopicité, la composition du mélange gazeux ou la présence d'aérosols organiques de fond modulent les processus gaz-particule et la composition chimique finale des particules (Lim et al., 2010; Faust et al., 2017; Rao and Vejerano, 2018; Ren et al., 2019; Salana and Verma, 2024). En particulier, la teneur en eau liquide des particules peut modifier leur acidité, favoriser la dissolution de métaux de transition et ainsi influencer leur potentiel oxydant et leur toxicité (Fang et al., 2017). Ces transformations physico-chimiques liées au vieillissement atmosphérique peuvent altérer significativement les réponses biologiques induites par les AOS (Weitekamp et al., 2020; Salana and Verma, 2024). Par ailleurs, certaines études suggèrent que le vieillissement atmosphérique des AOS peut accroître leur potentiel oxydant et la production de ROS, bien que des résultats contradictoires persistent selon les conditions expérimentales (Tuet, Chen, Xu, et al., 2017;

Chowdhury et al., 2018, 2019; Han et al., 2020; Fushimi et al., 2021; Offer, Hartner, Di Bucchianico, et al., 2022).

Le vieillissement atmosphérique par oxydation s'accompagne généralement d'une augmentation du degré d'oxydation des composés organiques et de la formation de groupements fonctionnels oxygénés, tels que les fonctions cétoniques, carboxyliques et quinoniques (George et al., 2007; Antiñolo et al., 2015; Liu, Xu, et al., 2023). Certains de ces composés, notamment les quinones, sont capables de promouvoir la formation de ROS et d'induire un stress oxydatif susceptible d'altérer l'intégrité cellulaire (Bolton et al., 2000; Arashiro et al., 2016; Tuet, Chen, Xu, et al., 2017; Chowdhury et al., 2018, 2019; Mudway et al., 2020). Toutefois, l'augmentation des réponses cellulaires associées au vieillissement n'est pas systématique et peut varier selon les conditions expérimentales, les types cellulaires utilisés ou les concentrations testées (Holder et al., 2012; An et al., 2017, 2019; Kong et al., 2019; Liu et al., 2019; Ge et al., 2021).

Le stress oxydatif apparaît ainsi comme l'un des principaux mécanismes impliqués dans la toxicité des AOS (Chowdhury et al., 2018, 2019; Li, Misovich, et al., 2022). Plusieurs études ont montré que l'exposition à des AOS active des voies cellulaires antioxydantes, notamment la voie dépendante du facteur de transcription Nrf2, conduisant à l'augmentation de l'expression de gènes tels que *HMOX1* (*Heme oxygenase 1*) et *NQO1* (*NAD(P)H quinone dehydrogenase 1*) (Lin et al., 2016, 2017; Chowdhury et al., 2018, 2019; Ito et al., 2019). Des modifications des profils transcriptomiques cellulaires ont également été observées après exposition à certains AOS, incluant l'activation de la voie de signalisation dépendante de la protéine p53, impliquée dans l'arrêt du cycle cellulaire, l'apoptose et l'autophagie témoignant de la mise en place de système de défense visant à limiter les dommages induits (Ahmed et al., 2019; Eaves et al., 2020; Gonzalez-Rivera et al., 2020). Les AOS peuvent également induire des réponses inflammatoires pulmonaires en ciblant des signaux de danger cellulaire, tels que HMGB1 (High mobility group box 1) et Hsp70 (Heat shock protein 70), conduisant à l'activation de récepteurs membranaires et de la voie NF-κB, ainsi qu'à la production de cytokines (pro-)inflammatoires, notamment IL-1, TNF-α, IL-6 et IL-8 (Becker et al., 2005; Bellussi et al., 2013; Sancini et al., 2014; Ding et al., 2017; Hulina et al., 2018; Wang, et al., 2020). Plusieurs études ont rapporté une augmentation de l'expression de médiateurs inflammatoires (TNF-α et IL-8) (Sunil et al.,

2007; Win-Shwe et al., 2015; Arashiro et al., 2016; Niu et al., 2017; Tuet et al., 2017; Chowdhury et al., 2018; Ito et al., 2019) alors que d'autres ont montré, une diminution d'IL-4 et IL-13, suggérant un déséquilibre favorisant l'accumulation de neutrophiles et l'aggravation de l'inflammation pulmonaire (Seki et al., 2012; Ahmed et al., 2019). Néanmoins, certaines études ont rapporté des réponses inflammatoires limitées ou des effets anti-inflammatoires selon la nature des AOS et les conditions expérimentales, soulignant la complexité des mécanismes impliqués (Niu et al., 2017; Ye et al., 2017; Han et al., 2020).

La comparaison *in vitro* entre les AOS d'origine anthropique et biogénique montre une toxicité plus élevée de la part des AOS anthropiques avec notamment, une production plus importante de ROS et de la sécrétion de cytokines (pro)-inflammatoire telles qu'IL-6, IL-8 et TNF-α (Gaschen et al., 2010; Tuet, et al., 2017; Chowdhury et al., 2019; Ito et al., 2019; Lovett et al., 2019). Cette différence pourrait être liée à la présence plus importante de composés aromatiques et fortement oxydés dans les AOS anthropiques, bien que cette hypothèse nécessite encore des investigations complémentaires (Figure 2. 15.) (Offer et al., 2022).

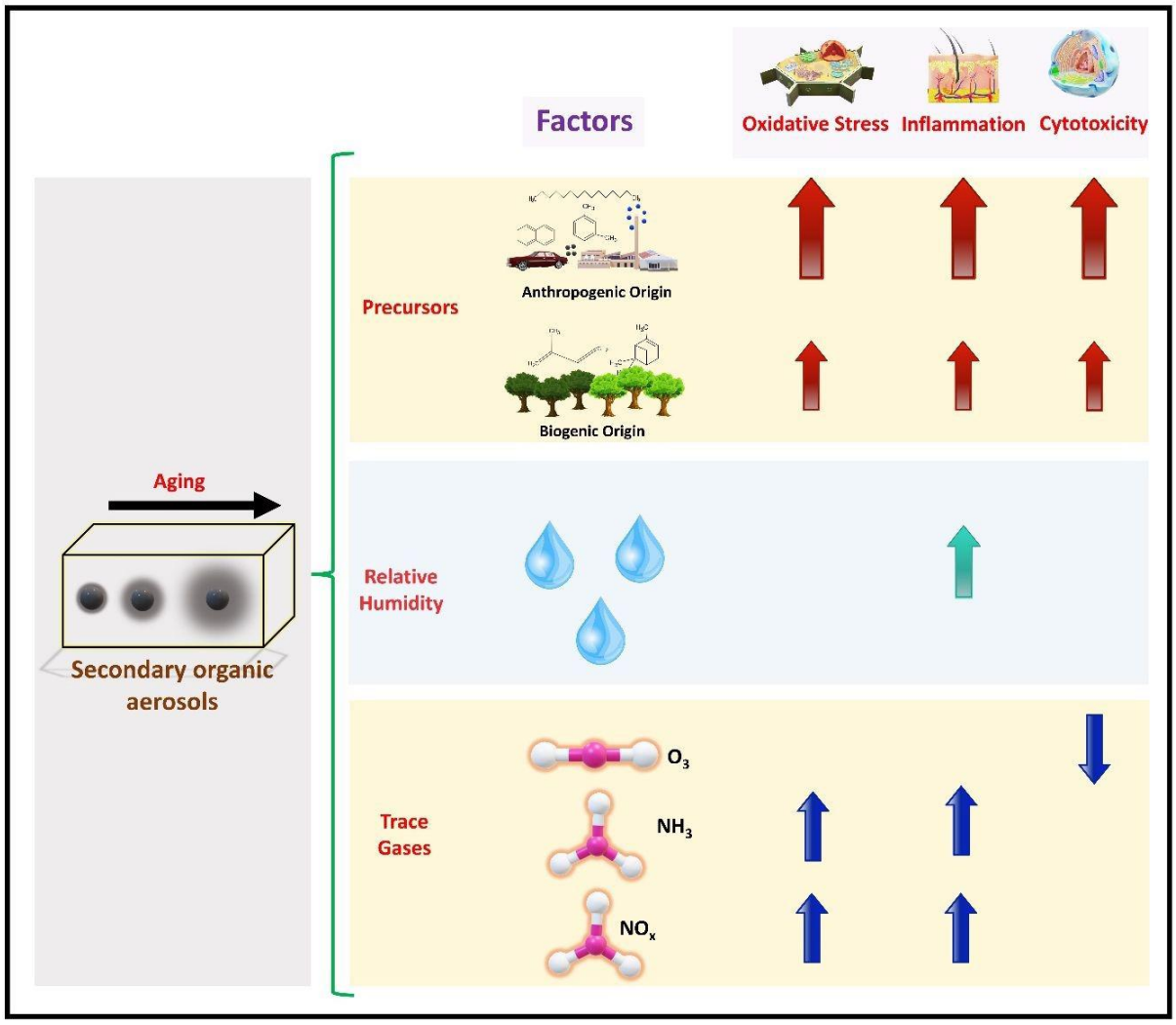


Figure 2. 15. : Effets de certains facteurs importants influençant la toxicité des AOS générés dans des chambres environnementales et des réacteurs à flux continu, observés lors des études réalisées jusqu'à présent. La flèche vers le haut indique que l'effet s'accroît avec le niveau du facteur, tandis que la flèche vers le bas indique qu'il diminue. La différence de taille relative des flèches pour les effets des précurseurs biogéniques et anthropiques indique un effet plus marqué des AOS d'origine anthropique que des AOS d'origine biogénique. L'effet de l'humidité relative présenté sur cette figure est basé sur une seule étude (Offer et al., 2022).

La composition chimique des AOS anthropiques dépend fortement des précurseurs impliqués dans leur formation ainsi que des conditions d'oxydation atmosphérique. Les aérosols issus d'une chimie diurne, dominée par les radicaux OH, contiennent majoritairement des composés oxygénés, tandis que ceux issus d'une chimie nocturne,

dominée par les radicaux NO_3, présentent une proportion plus importante de composés nitrés. Ces derniers, tels que les nitro-aromatiques, sont reconnus pour leurs propriétés fortement oxydantes, inflammatoires, carcinogènes et mutagènes (Pederson and Siak, 1981; Kovacic and Somanathan, 2014; Misaki et al., 2016; Tuet, Chen, Xu, et al., 2017; Zhou et al., 2019; Khan et al., 2022). Plusieurs travaux ont ainsi montré une toxicité plus élevée des AOS issus d'une oxydation nocturne comparativement à ceux formés par oxydation diurne, suggérant un rôle déterminant des processus atmosphériques dans la modulation de leurs effets biologiques.

L'oxydation progressive des composés aromatiques primaires, tels que les HAP, conduit à la formation de dérivés oxygénés et nitrés, notamment des quinones, reconnues pour leur capacité à générer des ROS et induire un stress oxydatif pouvant porter atteinte à l'intégrité cellulaire (Bolton et al., 2000; Arashiro et al., 2016; Tuet, Chen, Xu, et al., 2017; Chowdhury et al., 2018, 2019; Mudway et al., 2020). Ces composés peuvent également participer à l'induction d'une génotoxicité en formant des adduits à l'ADN, comme la 8-OHdG, interférer avec les processus de réparation de l'ADN ou encore induire des mutations (Abbas et al., 2018; Clergé et al., 2019; EHC 229, 2003, 2026; Idowu et al., 2019). Ainsi, en possédant des fonctions oxygénées et nitrées, ces dérivés acquièrent une réactivité importante et donc, une capacité toxique, notamment génotoxique, plus importante que leurs précurseurs (Durant et al., 1998; EHC 229, 2003, 2026; Misaki et al., 2016; Pedersen et al., 2005).

Ces composés sont fréquemment émis lors de processus de combustion incomplète, notamment lors de la combustion de carburants fossiles et de biomasse. Leur transformation atmosphérique conduit à la formation d'une large variété de produits secondaires susceptibles d'induire des réponses cellulaires multiples, incluant le stress oxydatif, l'inflammation et la génotoxicité (Herich et al., 2014; Bruns et al., 2016; do Nascimento et al., 2023; Pardo, Li, et al., 2023; Fang et al., 2024; Salana and Verma, 2024). Cependant, malgré l'identification de ces mécanismes généraux, les connaissances restent encore limitées concernant la toxicité spécifique des AOS issus de certains précurseurs aromatiques, en particulier ceux associés à la combustion de biomasse. Le vieillissement atmosphérique de ces émissions joue un rôle déterminant dans la modulation de leur toxicité, en favorisant la formation de composés hautement oxydés associés à une augmentation du potentiel oxydant et des réponses biologiques cellulaires (Park et al.,

2018; Miersch et al., 2019; Zhang et al., 2019; Lei et al., 2023; El Mais et al., 2025; Georgopoulou et al., 2025). Des études ont notamment montré une augmentation de la cytotoxicité et des réponses inflammatoires dans des macrophages exposés à des aérosols issus de combustion de biomasse vieillis, effet attribué à l'oxydation des HAP en dérivés plus réactifs (Nordin et al., 2015).

Parmi les composés aromatiques contribuant à la formation d'AOS issus de la combustion de biomasse, certains précurseurs tels que le naphtalène et le phénol occupent une place importante en raison de leur abondance (Bruns et al., 2016). Plusieurs études toxicologiques ont montré que ces AOS issus du naphtalène présentent un potentiel inflammatoire marqué, caractérisé par une libération significative de cytokines pro-inflammatoires telles que TNF-α et IL-8, ainsi qu'une augmentation de la production intracellulaire de ROS dans les macrophages (Tuet, Chen, Xu, et al., 2017; Offer, Hartner, Di Bucchianico, et al., 2022; Pardo et al., 2022). D'autres recherches ont rapporté une importante cytotoxicité, l'activation des voies de signalisation redox-sensibles de NRF2, AhR, et MAPK, ainsi que des dommages mitochondriaux et un important stress oxydatif accompagnés d'effets génotoxiques (Han et al., 2020; Lima de Albuquerque et al., 2021; Offer, Hartner, Di Bucchianico, et al., 2022; Pardo et al., 2022; Liu, Xu, et al., 2023; El Mais et al., 2025). Une récente étude a démontré un remodelage des voies respiratoires accompagné d'effets systémiques généralisés résultant de l'activation de gènes de réponse précoce (Offer et al., 2024). Toutes ces études montrent que les AOS issus du NAPH induisent la formation de ROS expliquant l'activation des voies de signalisation dépendante du stress oxydant et des effets subséquents tels que la génotoxicité, la peroxydation lipidique et la cytotoxicité (Tong et al., 2018; Wang et al., 2018; Lima de Albuquerque et al., 2021; Offer, Hartner, Di Bucchianico, et al., 2022).

Le phénol constitue un autre précurseur aromatique majeur impliqué dans la formation d'AOS issus de la combustion de biomasse (Bruns et al., 2016). Les rares études portant sur la toxicité d'inhalation de ces AOS rapportent que la production de ROS est fortement dépendante de la cytotoxicité induite et surtout, du temps de vieillissement de l'aérosol (Khan et al., 2022; Fang et al., 2024). Cela suggère qu'une augmentation du degré d'oxydation atmosphérique pourrait être associée à une diminution de la production de ROS et, par conséquent, à une réduction de la toxicité observée. Cependant, une étude

indique que le stress oxydant n'est certainement pas la seule voie induisant la cytotoxicité de ces AOS issu de phénol (Fang et al., 2024). En effet, de nombreux composés phénoliques sont formés lors de la réaction, comme les nitrophénols dont le potentiel toxique est reconnu (Harrison et al., 2005; ATSDR, 2023). Ces composés déclenchent un stress oxydant important, impactant la capacité de croissance des cellules, suivi de l'activation des voies cellulaires liées à l'apoptose (Majewska et al., 2021; Khan et al., 2022). La diversité des produits secondaires formés lors de l'oxydation du phénol suggère ainsi l'existence de mécanismes toxiques multiples, encore insuffisamment caractérisés à l'heure actuelle.

D'autres précurseurs aromatiques présents dans les émissions de combustion de biomasse, tels que l'acénaphtène (ACE) et l'acénaphtylène (ACY), contribuent également à la formation d'AOS atmosphériques. Récemment, une étude a démontré que ces AOS influencent l'activité de AhR (El Mais et al., 2025).Cependant, les données disponibles concernant la toxicité des AOS dérivés de ces composés restent encore très limitées, ce qui constitue un verrou scientifique important pour l'évaluation globale des risques associés aux AOS issus de combustion de biomasse.

Malgré l'abondance de données décrivant la formation et la composition chimique des AOS, en particulier ceux issus de la combustion de biomasse, les connaissances relatives à leur toxicité pulmonaire demeurent encore fragmentaires. Les émissions issues du chauffage résidentiel au bois contiennent une grande diversité de précurseurs organiques, incluant notamment des composés aromatiques, mono-aromatiques, des HAP, des furannes ainsi que divers composés phénoliques. Ces familles chimiques contribuent au potentiel toxique des aérosols atmosphériques en raison de leur capacité à former des produits secondaires réactifs et biologiquement actifs (Kovacic and Somanathan, 2014; Park et al., 2018; Fushimi et al., 2021). Toutefois, la majorité des études toxicologiques se concentre sur un nombre limité de précurseurs modèles et ne reflète qu'imparfaitement la complexité des émissions réelles issues de la combustion de biomasse.

Par ailleurs, les travaux existants portent majoritairement sur des AOS formés par oxydation diurne impliquant le radical hydroxyle, tandis que la toxicité des AOS issus de la chimie nocturne gouvernée par le radical nitrate demeure encore peu documentée. Or, ces conditions favorisent la formation de composés nitrés, notamment des nitro-aromatiques

reconnus pour leur forte réactivité et leur potentiel toxique élevé (Harrison et al., 2005; Brown and Stutz, 2012; Kovacic and Somanathan, 2014; Fry et al., 2018; Lammel et al., 2020; ATSDR, 2023). Des travaux récents ont notamment montré que les AOS formés à partir de précurseurs aromatiques tels que le naphtalène ou l'acénaphtène/acénaphtylène peuvent induire une activation significative du récepteur des hydrocarbures aromatiques (AhR), suggérant une activité biologique accrue par rapport aux composés précurseurs (El Mais et al., 2025). Néanmoins, ces études restent limitées à un nombre restreint de précurseurs et ne couvrent qu'une fraction des composés représentatifs des émissions réelles.

Enfin, une limite majeure concerne les modèles biologiques utilisés pour évaluer la toxicité des AOS. De nombreuses études reposent sur des modèles cellulaires non pulmonaires ou sur culture *in vitro* standard, qui ne reproduisent que partiellement les conditions physiologiques d'exposition par inhalation. Dans ce contexte, le développement de modèles *in vitro* pulmonaires pertinents constitue un enjeu essentiel pour mieux caractériser les effets biologiques des AOS issus de la combustion de biomasse. Ces approches permettent notamment d'évaluer la toxicité des particules dans des conditions contrôlées et constituent une étape clé vers la mise en œuvre de modèles plus physiologiquement représentatifs, tels que les cultures cellulaires en interface air-liquide.

Points clés : Impact sanitaire et toxicité des aérosols

Impacts sanitaires	Les $PM_{2.5}$ sont fortement associées à une augmentation de la mortalité prématurée et à des effets multi-systémiques. Aucun seuil d'exposition sans effet n'a été identifié.
Mécanismes de toxicité des $PM_{2.5}$	Les $PM_{2.5}$ induisent des réponses en cascade incluant stress oxydatif, inflammation, génotoxicité et mort cellulaire. Ces mécanismes sont fortement interconnectés et s'amplifient mutuellement.
Toxicité des AOS	Leur toxicité est dépendante de leur type de vieillissement diurne (OH) et nocturne (NO_3) qui influence leur composition chimique. Les HAP et autres précurseurs de SOA peuvent générer de nombreux dérivés potentiellement plus toxiques que les composés parents.
Limites des connaissances	La caractérisation physico-chimique des AOS ne suffit pas pour en évaluer les risques. Les connaissances toxicologiques restent limitées en raison de modèles expérimentaux simplifiés et peu représentatifs de l'exposition réelle.

2.5. Approches pour l'étude *in vitro* de la toxicité des PM et des AOS

2.5.1. L'interface air-liquide (ALI) : définition, avantages et inconvénients

2.5.1.1. L'interface air-liquide (ALI)

L'ALI constitue un outil essentiel pour le développement de modèles *in vitro* mimant plus fidèlement, entre autres, l'environnement pulmonaire, à l'interface entre le compartiment sanguin et aérien (Lacroix et al., 2018; Chen and Schoen, 2019). Ce système de culture permet l'exposition directe de la face apicale des cellules épithéliales à l'air, tandis que leur face basale reste en contact avec un milieu nutritif liquide, reproduisant ainsi les conditions physiologiques du tissu pulmonaire distal (Paur et al., 2011; Lacroix et al., 2018; Baldassi et al., 2021; Cao et al., 2021; Jaber and Billet, 2024; Salana and Verma, 2024; Gutleb et al., 2025; Navarrete-Aliaga et al., 2025). Dans les modèles d'épithélium alvéolaire, cette configuration favorise la différenciation et la polarisation cellulaire, ainsi que l'expression de marqueurs spécifiques, tels que la production de surfactant par les PT2 (Cooper et al., 2016; Jacob et al., 2017; Wu et al., 2018; Barosova et al., 2021; Abo et al., 2022; Silva et al., 2023). Les modèles ALI présentent ainsi une pertinence accrue pour l'étude des effets toxiques de polluants atmosphériques, notamment des particules fines, dont la capacité à atteindre les alvéoles profondes du poumon soulève d'importantes préoccupations sanitaires.

2.5.1.2. Les avantages de la culture et exposition à l'interface air-liquide (ALI)

L'utilisation des modèles cellulaires pulmonaires en ALI permet une évaluation physiologiquement plus pertinente des réponses biologiques que les approches *in vitro* classiques en milieu submergé, en reproduisant plus fidèlement l'environnement alvéolaire exposé à l'air (Figure 2. 16.) (Voisin et al., 1977; Baldassi et al., 2021; Cao et al., 2021). Cette approche constitue par ailleurs une alternative robuste à l'expérimentation animale et s'inscrit pleinement dans la démarche 3R, en favorisant le remplacement et la réduction de

l'utilisation des modèles *in vivo* (Paul Flecknell, 2002; Tannenbaum and Bennett, 2015; Hubrecht and Carter, 2019).

Au-delà de cet aspect éthique, les cultures à l'ALI offrent la possibilité unique d'exposer directement les modèles cellulaires pulmonaires à des aérosols complexes et réalistes, comprenant les phases gazeuse et particulaires, dans des conditions proches de l'inhalation atmosphérique (Lacroix et al., 2018; Upadhyay and Palmberg, 2018; Guénette et al., 2022; Jaber and Billet, 2024; Gutleb et al., 2025). Plusieurs études ont montré que les cellules épithéliales cultivées à l'ALI présentent des morphologies, des profils biochimiques et des réponses toxicologiques distincts de ceux observés en culture submergée, traduisant une différenciation cellulaire plus avancée (Ghio et al., 2009; Mills-Goodlet et al., 2020; Baldassi et al., 2021; Cao et al., 2021; Boulé et al., 2025; Zhang et al., 2026).

En comparaison, les expositions réalisées en milieu submergé tendent à surestimer la toxicité des polluants atmosphériques en raison d'interactions cellules-cellules et cellules-polluants moins représentatives des conditions physiologiques réelles (Mills-Goodlet et al., 2020; Wang et al., 2020; Allouche et al., 2025; Tsyupa et al., 2026). Dans la lignée alvéolaire A549, fréquemment utilisée comme modèle représentatif des PT2, plusieurs travaux rapportent une sensibilité moindre aux xénobiotiques en conditions ALI par rapport aux cultures immergées (Wang, Zhang, et al., 2020; Bessa et al., 2021; Boulé et al., 2025; Tsyupa et al., 2026). Cette différence est attribuée à l'adaptation des cellules à l'ALI, caractérisée par une diminution de la prolifération, une meilleure différenciation et une augmentation de la production de surfactant pulmonaire (Wu et al., 2018; Öhlinger et al., 2019; Boulé et al., 2025). Ainsi, l'ALI favorise une organisation cellulaire plus proche de l'épithélium pulmonaire *in vivo*, limite la prolifération anarchique de la lignée cancéreuse A549 et permet la présence du surfactant pulmonaire, une protection face aux xénobiotiques, rendant ces modèles plus représentatifs et mieux adaptés à l'étude de la toxicité des substances inhalées.

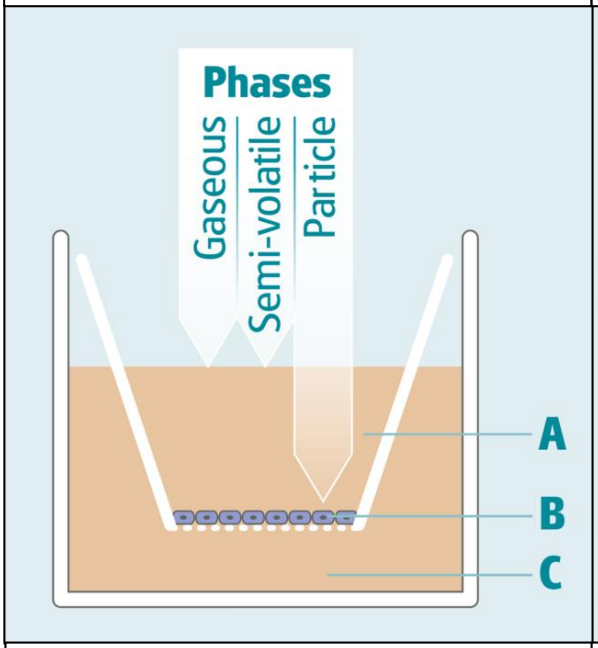
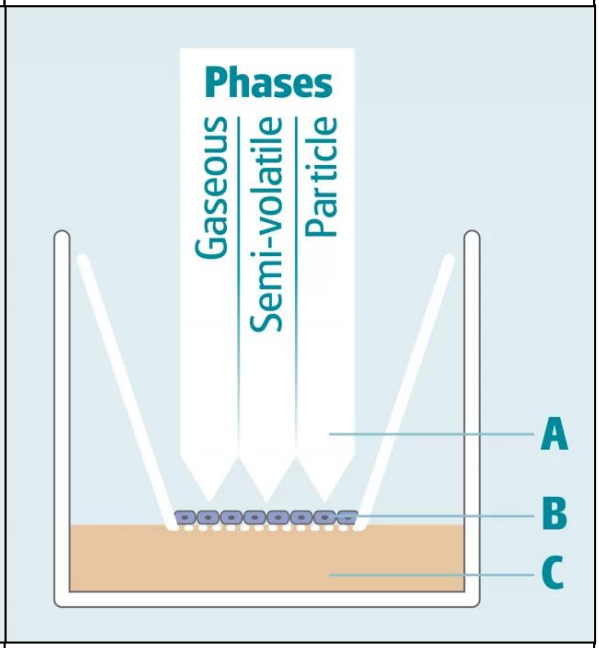
Submerge exposure	ALI exposure
	
A – Incomplete particles sedimentation and no gas and VOCs exposure B – Submerged cell C – Cell culture media	A – Direct and controlled exposure to particles, gas and VOCs B – Cell on insert at ALI C – Basal supply of cell culture media

Figure 2. 16. : Comparaison de l'exposition *in vitro* en submergée et à l'interface air/liquide (ALI).

2.5.1.3. Les limites de culture et exposition à l'interface air-liquide (ALI)

Malgré ses nombreux avantages, l'ALI présente quelques limites méthodologiques qui compliquent l'interprétation et la comparaison des données toxicologiques. À ce jour, il n'existe pas de réelle harmonisation des pratiques expérimentales, notamment en ce qui concerne la durée de culture à l'ALI, qui influence les conditions de différenciation, ou les paramètres d'exposition. Ces facteurs peuvent fortement influencer la physiologie cellulaire, en particulier pour certaines lignées épithéliales alvéolaires comme A549, pour lesquelles le temps passé à l'ALI conditionne la différenciation, la prolifération, la viabilité et la sensibilité aux xénobiotiques (Wu et al., 2018; Öhlinger et al., 2019; Boulé et al., 2025).

Par ailleurs, la mise en place de cultures à l'ALI demeure techniquement exigeante. Plusieurs contraintes peuvent limiter la viabilité des modèles, notamment la qualité et la composition des membranes constituant les supports de culture (inserts), indispensables à

une croissance cellulaire optimale, ainsi que les étapes de mise en ALI, le maintien du tapis cellulaire en contact avec l'air et la gestion de la mortalité cellulaire (Tsoutsoulopoulos et al., 2016; Wu et al., 2018; Silva et al., 2023). À cela s'ajoutent des temps de culture parfois longs, notamment liés aux phases d'habituation à l'interface air-liquide (ALI), nécessaires à l'adaptation et à la stabilisation des cellules, ainsi que des durées d'exposition pouvant être importantes et peu compatibles avec des expérimentations à grande échelle. Dans ce contexte, de nombreux travaux, reposent sur l'utilisation de lignées cellulaires cancéreuses robustes, telles que les cellules A549 ou BEAS-2B, largement employées en raison de leur facilité de culture, de leur reproductibilité et de leur résistance aux conditions expérimentales (Selo et al., 2021; Salana and Verma, 2024; Navarrete-Aliaga et al., 2025). Toutefois, ces modèles monocellulaires ne permettent pas, à eux seuls, de reproduire la complexité structurale et fonctionnelle de l'environnement alvéolaire humain (Mason and Crystal, 1998; Mason, 2006; Murray, 2010; Guillot et al., 2013).

Ainsi, bien que l'ALI représente une avancée majeure pour les études toxicologiques par inhalation, ces limitations soulignent la nécessité de développer et de raffiner des modèles cellulaires pulmonaires plus complexes et plus physiologiquement pertinents, capables de mieux reproduire la structure et les fonctions spécifiques de l'épithélium des voies respiratoires humaines.

2.5.2. Modèles alvéolaires en interface air-liquide (ALI) : vers une représentation plus physiologique de la toxicité inhalée

Les modèles *in vitro* simulant l'environnement alvéolaire sont extrêmement variés et s'étendent depuis l'utilisation d'essais acellulaires jusqu'à des systèmes cellulaires reposant sur des lignées cellulaires immortalisées ou des cultures primaires, organisées en monoculture ou en coculture, et allant jusqu'à des modèles organoïdes mimant la complexité de l'organe pulmonaire (Petpiroon et al., 2023; Loncarevic et al., 2024; Wallace et al., 2025; Yin et al., 2025). Les modèles cellulaires les plus récents et les plus avancés cultivés à ALI représentent une opportunité unique de se rapprocher le plus fidèlement du microenvironnement alvéolaire, en permettant l'utilisation combinée de lignées cellulaires ou de cellules primaires humaines présentant un phénotype plus physiologique (Upadhyay and Palmberg, 2018; Hiemstra et al., 2019; Baldassi et al., 2021; Cao et al., 2021; Graf et al.,

2023; Rothen-Rutishauser et al., 2023; Jaber and Billet, 2024; Salana and Verma, 2024; Navarrete-Aliaga et al., 2025; Gutleb et al., 2026).

2.5.2.1. Sources de cellules pour les modèles in vitro alvéolaire

Actuellement, les modèles dérivés de cellules épithéliales alvéolaires humaines suscitent un intérêt particulier. Les principales sources de cellules épithéliales alvéolaires comprennent les lignées cellulaires immortalisées ou dérivées de tumeurs, les cellules primaires isolées de tissus pulmonaires et les cellules souches pluripotentes induites (iPSC, *induced pluripotent stem cell*) différenciées (Selo et al., 2021). Toutefois, la plupart des lignées cellulaires établies ne reproduisent que partiellement les caractéristiques des cellules épithéliales *in vivo* et présentent généralement des profils de différenciation incomplets. À l'inverse, les cellules primaires conservent l'avantage de ne pas être modifiées pour la prolifération, ce qui leur permet d'adopter un comportement physiologique plus représentatif de l'épithélium alvéolaire humain.

En parallèle, des approches plus avancées telles que les systèmes « organe-sur-puce » (*organ on a chip*, OOC) et les modèles commerciaux d'épithélium alvéolaire humain cultivés en ALI ont été développés afin de reproduire de manière très fidèle l'architecture et les contraintes dynamiques du microenvironnement alvéolaire. Bien que ces modèles offrent une pertinence physiologique élevée, leur utilisation reste limitée à cause des coûts importants, d'une mise en œuvre techniquement complexe et de contraintes expérimentales liées à la microfluidique, auxquelles s'ajoutent les défis associés à leur exposition à l'ALI (Gutleb et al., 2026).

2.5.2.2. Les modèles issus de cellules primaires alvéolaires

Historiquement, la durée de vie limitée des cellules primaires, leur coût élevé et la variabilité inter-donneur ont favorisé l'utilisation de lignées immortalisées ou dérivées de tumeurs, plus pratiques et économiques (Hiemstra et al., 2019; Selo et al., 2021). Cependant, les progrès récents en matière de culture et de propagation de cellules souches alvéolaires humaines primaires ou dérivées de cellules iPSC permettent désormais d'obtenir des populations stables et fonctionnelles pour les études *in vitro* (Jacob et al., 2017; Hurley et al., 2020; Abo et al., 2022; Kathiriya et al., 2022). Les modèles iPSC génèrent

facilement des cellules de type PT2, tandis que la production de phénotypes de type PT1 reste plus complexe, la maturité et la stabilité diminuant souvent avec le temps (Barosova et al., 2021; Bluhmki et al., 2021). Les organoïdes primaires dérivés de cellules souches constituent également des modèles pertinents, mais ils n'ont pas encore été adaptés aux conditions de culture ALI (Barkauskas et al., 2013, 2017; Kathiriya et al., 2022; Yin et al., 2025).

Ainsi, les modèles basés sur des cellules primaires ou des cellules souches humaines représentent une nouvelle génération de cultures alvéolaires physiologiquement pertinentes malgré d'importantes contraintes techniques. Ces systèmes sont plus adaptés aux études physiologiques qu'aux études toxicologiques et leur mise en œuvre demeure complexe, longue et coûteuse. Bien que des modèles plus complexes, stables et compatibles avec l'ALI soient susceptibles d'émerger prochainement, les lignées cellulaires restent à l'heure actuelle une alternative plus rapide à mettre en place, moins coûteuse et surtout, facilement applicable dans tout laboratoire.

2.5.2.3. Les modèles issus de lignées cellulaires en monoculture

Contrairement aux cellules primaires, l'utilisation de lignées cellulaires, plus faciles à mettre en œuvre, permet une étude toxicologique préliminaire des polluants atmosphériques tout en préservant la pertinence physiologique. Elle peut être validée ultérieurement à l'aide de modèles basés sur des cellules primaires ou des cellules souches humaines adaptés à la culture ALI. Il existe deux types de lignées cellulaires, les lignées cancéreuses et les lignées immortalisées.

<u>Les lignées alvéolaires immortalisées</u>

Les lignées immortalisées sont obtenues par transformation d'une culture cellulaire saine, la plupart du temps, des PT2 isolés de tissu pulmonaire sain. Généralement, l'expérimentation consiste à transfecter un agent oncogénique viral ou cellulaire aux cellules dans le but qu'elles acquièrent un potentiel de division infinie *in vitro*. L'oncogène le plus utilisé est l'adénovirus SV40 (Virus Samien 40) grâce à l'expression de l'antigène T. Cet antigène inactiverait les protéines cellulaires oncosuppressives p53 et pRb. Les cellules échappent ainsi à la sénescence cellulaire naturelle (Bryan and Reddel, 1994).

En 2009, Van Bogaard et son équipe ont immortalisé des PT2 primaires humaines isolés de tissu pulmonaire sain (van den Bogaard et al., 2009). Les cellules ont été transfectées avec l'adénovirus SV40 et une sous-unité catalytique de la télomérase. Une fois immortalisées, les cellules ont adopté un phénotype de type 1 en culture d'où leur appellation TT1 pour « transformed type-1 ». Cependant, la faible expression de la protéine ZO-1 (zona occludin 1) n'a pas permis la formation d'une barrière étanche par (van den Bogaard et al., 2009). De ce fait, la lignée n'a pas fait pas l'œuvre de beaucoup d'études biopharmaceutiques (Selo et al., 2021).

La lignée hAELVi (human alveolar epithelial lentivirus-immortalised) a été développée plus récemment, par immortalisation lentivirale de PT2 humains, avec un maintien de stabilité rapporté jusqu'au passage 75 (Kuehn, 2016). Bien que dérivée de PT2, cette lignée présente plusieurs caractéristiques proches des PT1, notamment la présence de cavéoles intracytoplasmiques, l'expression de la cavéoline-1 et la formation de jonctions serrées fonctionnelles. En condition submergée comme en interface air-liquide, les hAELVi forment une monocouche épithéliale hautement restrictive, avec des valeurs de TEER (résistance transépithéliale, en anglais « transepithelial electrical resistance ») supérieures à 1500 $\Omega \cdot cm^2$, comparables à celles observées pour les cultures primaires (Kuehn, 2016; Selo et al., 2021). Si plusieurs travaux confirment leurs caractéristiques de type PT1, notamment par l'observation de microvillosités apicales et d'un glycocalyx développé, d'autres études ont montré, en conditions ALI, l'expression des protéines du surfactant SP-A, SP-B et SP-C, suggérant des caractéristiques de PT2, en particulier après un stress mécanique (Brandt et al., 2020; Joelsson et al., 2020; Mills-Goodlet et al., 2020). Malgré ces controverses, la lignée hAELVi est aujourd'hui largement utilisée pour des études de toxicologie inhalée, de dépôt et de translocation particulaire, ainsi que dans des modèles de coculture visant à améliorer la pertinence physiologique de l'épithélium alvéolaire *in vitro* (Kletting et al., 2018; Heck et al., 2019; Leibrock et al., 2019; Thanki et al., 2019; Metz et al., 2020; Mills-Goodlet et al., 2020; Sakagami, 2020; Brookes et al., 2021; Visigalli et al., 2022; Weiss et al., 2022; Bateman et al., 2025; Boulé et al., 2025; Fredoc-Louison et al., 2025).

Très récemment, dans le but de proposer une alternative plus robuste au modèle hAELVi, une nouvelle lignée cellulaire alvéolaire humaine, dénommée Arlo, a été développée (Carius et al., 2023). Cette lignée, dérivée de cellules épithéliales alvéolaires

humaines et immortalisées, présente de fortes similarités fonctionnelles avec les hAELVi. Cultivée à l'ALI, la lignée Arlo montre toutefois un phénotype plus proche des cellules PT1, notamment par la formation d'une barrière épithéliale très restrictive et des valeurs élevées de TEER. À ce jour, l'utilisation de la lignée Arlo reste encore limitée et sa caractérisation biologique demeure incomplète. Néanmoins, les premières données suggèrent qu'elle pourrait constituer une alternative prometteuse aux hAELVi pour l'étude de la barrière alvéolaire humaine en conditions ALI, en particulier pour les approches de transport et de dépôt particulaire.

Les lignées alvéolaires cancéreuses

Les lignées cellulaires cancéreuses sont dérivées de tissus tumoraux prélevés chez des patients atteints de cancer, généralement à partir de biopsies. Leur principal avantage réside dans leur capacité à se diviser de manière quasi illimitée, avec une stabilité génétique relative au cours des passages, ce qui permet leur culture et leur utilisation sur le long terme. Dans le contexte de l'étude de l'épithélium alvéolaire, les lignées NCI-H441 et A549 figurent parmi les modèles les plus couramment employés.

La lignée NCI-H441 a été isolée en 1982 à partir du liquide péricardique d'un patient atteint d'un adénocarcinome pulmonaire. Elle présente un phénotype mixte, partageant des caractéristiques des PT1, PT2 et des cellules Club en fonction de l'ajout de dexaméthasone, un anti-inflammatoire (Gazdar et al., 1990; Neuhaus et al., 2012; Sakamoto et al., 2015; Ren et al., 2016; Togami et al., 2017). Les cellules expriment des marqueurs associés aux PT1, ainsi que plusieurs protéines de jonctions serrées, traduisant une capacité à former une barrière épithéliale fonctionnelle (Togami et al., 2017). Par ailleurs, la présence de corps lamellaires et l'expression des protéines du surfactant témoignent de caractéristiques propres aux PT2 (Salomon et al., 2014; Selo et al., 2021). En condition submergée, les NCI-H441 développent une résistance électrique transépithéliale (TEER) proche de celle observée dans des cultures primaires, mais celle-ci diminue fortement en conditions ALI. Ces propriétés font de la lignée NCI-H441 un modèle pertinent pour l'étude de la barrière alvéolaire, du transport transépithélial et de la déposition des particules fines en ALI. Néanmoins, la nécessité d'ajouter des suppléments pour optimiser

la différenciation, ainsi que leurs effets biologiques potentiels encore mal caractérisés, constitue une limite à prendre en compte.

La lignée A549 a été isolée en 1972 à partir d'un adénocarcinome alvéolaire humain (Giard et al., 1973). Sur les plans morphologique et biochimique, elle présente majoritairement des caractéristiques de PT2, notamment la présence de corps lamellaires et l'expression des protéines du surfactant (Foster et al., 1998; Cooper et al., 2016; Cui et al., 2018; Wu et al., 2018; Selo et al., 2021). Les A549 expriment également certains marqueurs des PT1, tels que l'occludine, la E-cadhérine et différentes claudines. Toutefois, elles forment une barrière épithéliale peu fonctionnelle, caractérisée par une faible résistance électrique transépithéliale (TEER ≤ 250 Ω·cm²), traduisant des jonctions serrées immatures et une perméabilité élevée (Cooper et al., 2016; Ren et al., 2016; Wu et al., 2018; Selo et al., 2021; Boulé et al., 2025). Cette propriété limite leur pertinence pour les études de perméabilité transépithéliale, mais reste totalement cohérente avec un phénotype de PT2. Néanmoins, l'origine cancéreuse de la lignée constitue une limite majeure pour l'extrapolation à un épithélium pulmonaire sain, en raison de sa prolifération anarchique, ses dérégulations intrinsèques des voies de signalisation, du stress oxydant et des mécanismes de réparation de l'ADN (Foster et al., 1998; de Miranda Ramos et al., 2019). Malgré ces limites, cette lignée demeure la lignée alvéolaire la plus utilisée pour l'étude des aérosols atmosphériques en ALI. Ces limites justifient le recours à des modèles alternatifs, tels que des lignées immortalisées ou des modèles multicellulaires plus complexes, afin d'améliorer la pertinence physiologique des études *in vitro*.

2.5.2.4. Cocultures mimant l'épithélium alvéolaire

Malgré les avancées réalisées grâce aux cultures cellulaires en ALI, la majorité des études consacrées à la toxicité alvéolaire induite par les polluants atmosphériques reposent encore sur des monocultures, principalement la lignée A549 (Salana and Verma, 2024; Navarrete-Aliaga et al., 2025). Si ces monocultures présentent des avantages indéniables en termes de robustesse expérimentale et de facilité de mise en œuvre, ils ne permettent pas de reproduire fidèlement la complexité structurelle et fonctionnelle de l'épithélium alvéolaire humain. *In vivo*, cette barrière est constituée d'une organisation étroite et dynamique de PT1 et PT2, en interaction constante avec des cellules immunitaires

résidentes, notamment les macrophages alvéolaires, jouant un rôle central dans la réponse aux agressions inhalées (voir section 2.3.2.1). Pourtant, différents modèles de coculture développés à l'ALI ont été décrits dans la littérature, reposant sur des associations variées des lignées cellulaires précédemment présentées (Tableau 2. 1) auxquelles se rajoute la lignée THP1.

Cette dernière est une lignée tumorale hématopoïétique humaine dérivée du sang périphérique d'un patient atteint de leucémie aiguë (Tsuchiya et al., 1980). Elle est largement utilisée comme modèle de macrophage humain après différenciation, le plus souvent induite par le phorbol-12-myristate-13-acétate (PMA) (Tsuchiya et al., 1980; Daigneault et al., 2010). Une fois différenciées, les cellules THP-1 acquièrent des caractéristiques morphologiques et fonctionnelles proches des macrophages alvéolaires, incluant des capacités phagocytaires, la production de cytokines (pro)-inflammatoires (TNF-α, IL-6, IL-8) et l'activation de voies de signalisation associées au stress oxydatif et à l'inflammation (Park et al., 2007; Chanput et al., 2014). En toxicologie inhalée, les THP-1 sont rarement utilisées seules mais constituent un modèle de choix pour les cocultures, notamment avec des cellules épithéliales pulmonaires en ALI, afin de reproduire les interactions épithélio-immunitaires présentes dans l'alvéole humaine (Klein et al., 2013; Loret et al., 2016; Kletting et al., 2018; Mitchell et al., 2024; Yadav and Yadav, 2024; Ashrin et al., 2025; Bateman et al., 2025). Leur intégration dans des modèles multicellulaires permet d'améliorer la pertinence physiologique des études *in vitro*, en tenant compte du rôle central des macrophages alvéolaires dans la reconnaissance, la phagocytose et la réponse inflammatoire aux aérosols atmosphériques.

Tableau 2. 1. : Modèle *in vitro* de coculture de lignées cellulaires mimant l'épithélium alvéolaire développé à l'interface air-liquide.

Modèles	Applications	Habituation à l'ALI	Avantages	Inconvénients	Références
NCI-H441/hAELVi	Recherche pharmaco-toxicologique	14 jours	Formation d'une barrière étanche Expression de gènes et protéines spécifiques des PT1 et PT2	Utilisation de DMEM non adaptée pour des hAELVi Utilisation de dexaméthasone Pas d'évaluation à l'exposition ALI	(Brookes et al., 2021)
NCI-H441/HPMEC-ST1.6R/THP1	Etude des interactions des nanovecteurs avec la barrière air-sang	6 jours	Représentation des PT2, de l'endothélium et des macrophages alvéolaires	Pas de PT1 Pas d'évaluation à l'exposition ALI	(Costa et al., 2019)
hAELVi/THP-1	Études de sécurité et de perméabilité des produits chimiques, des médicaments et des nanoparticules inhalés	14 jours	Formation d'une barrière étanche Représentation des macrophages alvéolaires	Pas de PT2 Pas d'évaluation à l'exposition ALI	(Kletting et al., 2018)
A549/THP-1	Impact toxicologique des nanoparticules, réponses inflammatoires	24 h ou 48 h	Forte résistance du modèle à l'exposition Forte réponse inflammatoire	Pas de PT1 Pas d'évaluation à l'exposition ALI (Yadav and Yadav, 2024)	(Loret et al., 2016; Yadav and Yadav, 2024)
A549/THP-1/EA.hy 926	Etude des effets toxiques potentiels des particules sur les poumons	24 h	Représentation des PT2, de l'endothélium, des mastocytes et des macrophages alvéolaires	Pas de PT1 30 min d'exposition ALI maximum	(Klein et al., 2013)
TT1/THP1/NCI-H441 **hAELVi/THP1/NCI-H441**	Étude toxicologique des agents exogènes inhalés.	24 h et 48 h	Modèle le plus représentatif de l'épithélium alvéolaire avec PT1/PT2/macrophage Modèle testé au VitroCell Cloud®	Pas de production de surfactant Pas d'évaluation à l'exposition continue en ALI	(Mitchell et al., 2024; Bateman et al., 2025)

Le Tableau 2.1, met en évidence le nombre limité de modèles d'épithélium alvéolaire pertinents actuellement disponibles à l'ALI. Une coculture des lignées hAELVi, considérées comme PT1, et NCI-H441, présentant des caractéristiques PT1 ou PT2, a été évaluée pour ses fonctions de barrière, sans que l'exposition à l'ALI ne soient étudiées (Brookes et al., 2021). De plus, la lignée hAELVi nécessite l'utilisation d'un milieu de culture spécifique qui n'a pas été employé dans ce modèle de coculture, ce qui pourrait avoir modifié le phénotype cellulaire observé pouvant expliquer la perte de phénotype en coculture (diminution de la protéine Caveolin-1, CAV-1) (Kuehn, 2016; Brookes et al., 2021). Plus récemment, Mitchell et al. (2024) ont développé un modèle de coculture associant des cellules TT1 comme PT1, des cellules NCI-H441 comme PT2 et des cellules THP-1 comme macrophages (Mitchell et al., 2024). Bien que ce modèle ait fait l'objet d'une caractérisation approfondie, aucune donnée concernant la production de surfactant n'a été rapportée. Une meilleure caractérisation de l'exposition a été réalisée en utilisant un toxique reconnu, la suie. Cependant, l'exposition ALI consistait à exposer les particules de suie par sédimentation et non, en incluant un flux d'air, potentiellement incommodant. Par ailleurs, la lignée TT1 demeure insuffisamment caractérisée et reste peu utilisée dans les études toxicologiques, rendant difficile l'interprétation de son comportement en conditions d'exposition (van den Bogaard et al., 2009; Jarvis et al., 2018; Selo et al., 2021).

Plus largement, la majorité des modèles de coculture alvéolaire disponibles sont rarement, voire jamais, caractérisés directement en conditions d'exposition ALI, par l'application d'un flux d'air directement au contact du tapis cellulaire, alors même que ce dernier constitue l'objectif principal de ces approches. Toutefois, ces expositions soulèvent d'importants défis techniques, en particulier en ce qui concerne le suivi et le contrôle rigoureux des conditions d'exposition, ainsi que le maintien de la viabilité et des fonctions cellulaires. Bien que de nombreuses approches d'exposition basées sur l'ALI aient été développées, la normalisation et l'harmonisation de ces méthodes demeurent indispensables afin d'améliorer la fiabilité, la reproductibilité des résultats et leur acceptation réglementaire (Lacroix et al., 2018). Ces constats soulignent ainsi la nécessité de développer des modèles de coculture alvéolaire non seulement physiologiquement pertinents, mais également spécifiquement caractérisés lors d'expositions à l'ALI.

2.5.3. Comment simuler au mieux l'exposition aux aérosols ?

2.5.3.1. Les systèmes d'expositions ALI

Les dispositifs d'exposition *in vitro* à l'ALI ont été développés afin d'étudier les effets biologiques des polluants atmosphériques dans des conditions se rapprochant de l'inhalation humaine. Ces systèmes reposent sur différentes approches technologiques, classiquement regroupées en trois grandes catégories : les dispositifs d'exposition statique à partir d'un « nuage » d'aérosols (« Cloud »), les systèmes d'exposition dynamique à flux horizontal et ceux à flux perpendiculaire (Figure 2. 17.) (Aufderheide and Mohr, 1999; Lenz et al., 2009; Aufderheide et al., 2013; Zavala et al., 2014). Le développement des systèmes d'exposition en ALI s'est considérablement intensifié au cours des dernières années, donnant lieu à une grande diversité de dispositifs. Une synthèse non-exhaustive des différents systèmes existants et de leurs caractéristiques est présentée dans le Tableau 2. 2.

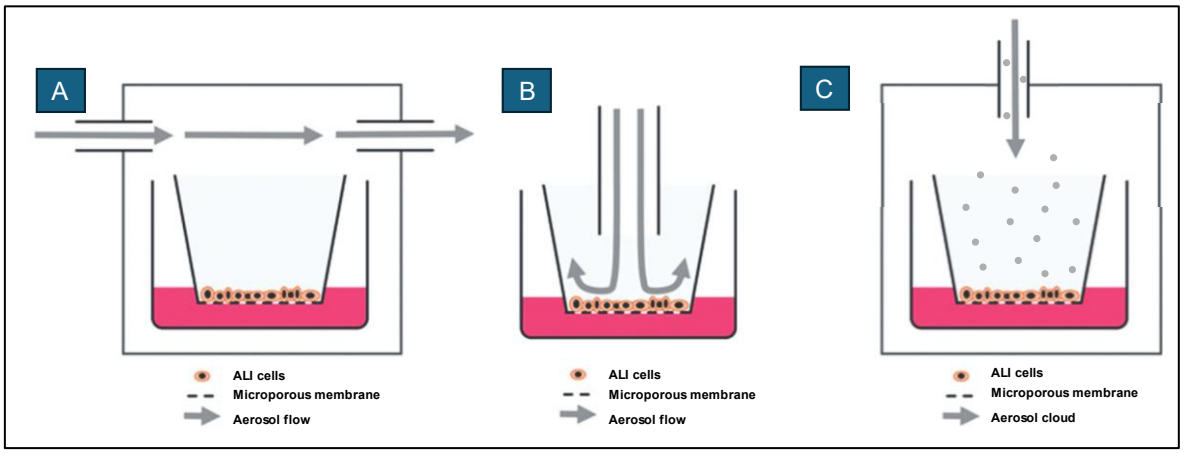


Figure 2. 17. : Principaux dispositifs d'exposition à l'ALI. (A) Dispositif de type « incubateur/boîte » avec un flux horizontal, une exposition cellulaire « lisse ». Il en résulte une exposition simultanée de cultures avec une dynamique des fluides moins bien définie. (B) Dispositif à « flux par point de stagnation » avec exposition individuelle de cultures, offrant une dynamique des fluides optimisée et un contact efficace entre les cellules et le gaz. (C) Dispositif à « nuage », reposant sur la génération d'un aérosol sous forme de microgouttelettes déposées sur les cellules, permettant une exposition contrôlée et homogène des cultures aux particules en suspension. Adapté de (Lacroix et al., 2018).

Les dispositifs type Cloud comme ALICE ou VitroCell® Cloud génèrent des nuages de particules qui se déposent sur les cellules par gravité (Lenz et al., 2009; VITROCELL®). La dose déposée dépend surtout de type d'aérosol et de sa sédimentation car il n'y a pas de flux d'air permettant une déposition par impaction (Baldassi et al., 2021; Gutleb et al., 2025). Ces système statiques ou stationnaires sont donc particulièrement adaptés à l'exposition de suspension liquide ou de nanomatériaux mais sont peu adaptés à l'exposition aux aérosols dans leur totalité (phases gazeuse et particulaire).

Les systèmes dynamiques à flux horizontal acheminent l'air ou l'aérosol parallèlement à la surface cellulaire et intègrent généralement un système d'augmentation de déposition des particules. Parmi eux, le système EAVES (Electrostatic Aerosol In Vitro Exposure System), puis sa version améliorée, l'échantillonneur Gillings à deux étages, intègre un système d'augmentation de déposition électrostatique. Ils ont été utilisés pour des expositions à des émissions de véhicules diesel ou à des particules ambiantes, avant d'être adaptés commercialement sous le nom de CelTox Sampler® (de Bruijne et al., 2009; Volckens et al., 2009; Zavala et al., 2014; CelTox Sampler®).

Les systèmes dynamiques à flux perpendiculaire, aujourd'hui largement répandus, dirigent le flux d'air ou l'aérosol verticalement vers le pôle apical des cellules cultivées sur inserts, permettant une déposition plus homogène et mieux contrôlée (Aufderheide and Mohr, 1999). Des plateformes commerciales telles que P.R.I.T.®, CelTox Sampler®, Cultex® ou VitroCell® reposent sur ce principe et sont largement utilisées pour l'étude de la toxicité des particules atmosphériques, des AOS, des émissions de combustion ou des composés gazeux (Aufderheide et al., 2013; Majeed et al., 2014; Tsoutsoulopoulos et al., 2016; Barkauskas et al., 2017; Steiner et al., 2017; Chowdhury et al., 2018, 2019; Offer et al., 2022; Pardo, Czech, et al., 2023; Buckley et al., 2024; Offer et al., 2024; Allouche et al., 2025; CelTox Sampler®; Cultex®; VITROCELL®). Certains de ces systèmes permettent l'exposition simultanée de plusieurs conditions expérimentales et intègrent des paramètres essentiels tels que le contrôle du débit, de la température et de l'humidité relative, éléments indispensables au maintien de la viabilité cellulaire (Aufderheide et al., 2013; Tsoutsoulopoulos et al., 2016; Zavala et al., 2017).

Tableau 2. 2. : Liste non exhaustive des systèmes d'exposition à l'interface air-liquide existant.

Mécanisme de déposition	Système ALI	Débit d'exposition*	Durée de l'exposition*	Augmentation du dépôt	Déposition des aérosols**	Références et utilisateurs
Cloud – Sédimentation gravitationnelle	ALICE (Air-liquid Interface Cell Exposure)	5 L/min	5 à 10 min	Non	**Débit d'exposition :** 5 L/min **Durée d'exposition :** 5 à 10 min **Aérosol utilisé :** Nébulisation d'une solution de NaCl + NP (nanoparticules) de ZnO, black carbon et Au **Méthode dosimétrique utilisée :** QCM (microbalance à cristal de quartz) **Efficacité de déposition :** 7,2 % inserts 6-puits, 3,1 % inserts 12-puits, 2,1 % inserts 24-puits	(Lenz et al., 2009)
	VitroCell® Cloud / Cloud Alpha	0 L/min	< 5 min	Non	**Débit d'exposition :** 0 L/min **Durée d'exposition :** < 5 min **Aérosol utilisé :** Nébulisation d'une solution aqueuse de NP de TiO_2 et DQ_{12} **Méthode dosimétrique utilisée :** QCM **Efficacité de déposition :** 83,6 %	(Lenz et al., 2014; Bannuscher et al., 2022, VITROCELL®)
	Aeroneb	0 L/min	Quelques min	Non	**Débit d'exposition :** 0 L/min **Durée d'exposition :** Quelques min **Aérosol utilisé :** Nébulisation d'une solution de NP **Méthode dosimétrique :** MEB (microscopie à balayage) **Efficacité de déposition :** 50 – 90 %, dépendant de la masse nominale des NP	(Zhang, David, et al., 2007; Kletting et al., 2018)
	MicroSprayer® IA-1C	0 L/min	Quelques secondes	Non	**Débit d'exposition :** 0 L/min **Durée d'exposition :** Quelques secondes **Aérosol utilisé :** FluoSpheres (polystyrène) de ∅ 20, 40, 100 et 200 nm, fluorescine, nanotube de carbone (NTC) **Méthode dosimétrique :** MET **Efficacité de déposition :** Fluorescine : 27 ± 3 % ; FluoSphere : 28 ± 1,96% ;NTC : 25 ± 2,5%	(Fröhlich et al., 2013)

Mécanisme de déposition	Système ALI	Débit d'exposition*	Durée de l'exposition*	Augmentation du dépôt	Déposition des aérosols**	Références et utilisateurs
Flux perpendiculaire - Diffusion et sédimentation	VitroCell® Continuous Flow	5 mL/min	Jusqu'à 6 h	Chargeur de particules possible, è dilutions simultanée possible avec la gamme VitroCell® 24/48	**Débit d'exposition :** 5 mL/min **Durée d'exposition :** 6 h **Aérosol utilisé :** 8 aérosols contenant des tailles différentes **Méthode dosimétrique :** MET (microscopie électronique à transmission) et modélisation **Efficacité de déposition :** 0,5 - 7 %, dépendant du diamètre aérodynamique (∅) et de la distance entre la sortie d'air et l'insert, et le débit du flux d'air	(Majeed et al., 2014; Fujitani et al., 2015; Loret et al., 2016; Steiner et al., 2017, VITROCELL®)
	VitroCell® Automated Exposure Station (AES)	100 mL/min	Jusqu'à 24 h selon VitroCell® Jusqu'à 72 h (Zimmermann et al., 2025)	Déposition électrostatique	**Débit d'exposition :** 100 mL/min **Durée d'exposition :** 4 h **Aérosol utilisé :** Nébulisation d'une solution de NP de TiO_2 **Méthode dosimétrique :** QCM + MET **Efficacité de déposition :** NR (Non renseigné)	(Mülhopt et al., 2020; Zimmermann et al., 2025, VITROCELL®)
	Cultex® RFS (Radial Flow System)	30 mL/min	Jusqu'à 1 h avec le chargeur Jusqu'à 24 h sans le chargeur	Chargeur EDD (Electrical Deposition Device) possible	**Débit d'exposition :** 30 mL/min **Durée d'exposition :** 15 – 60 min **Aérosol utilisé :** NP de $CuSO_4$ **Méthode dosimétrique :** ICP-MS (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry), gravimétrie **Efficacité de déposition :** 10 - 35 % pour CuSO4 sans EDD, 100 % des particules chargée avec EDD	(Aufderheide and Mohr, 1999; Aufderheide et al., 2013; Fröhlich and Salar-Behzadi, 2014; Tsoutsoulopoulos et al., 2016, 2019, Cultex®)
	NACIVT (Nano Aerosol Chamber for In Vitro Toxicity)	25 mL/min	Jusqu'à 2 h	Déposition électrostatique	**Débit d'exposition :** 25 mL/min **Durée d'exposition :** 30 min – 1 h **Aérosol utilisé :** Polystyrène latex (PSL) (200 nm) et NP d'Ag (20 nm) **Méthode dosimétrique :** Laser scanning micrographie sur insert	(Jeannet et al., 2015)

Mécanisme de déposition	Système ALI	Débit d'exposition*	Durée de l'exposition*	Augmentation du dépôt	Déposition des aérosols**	Références et utilisateurs
Flux perpendiculaire - Diffusion et sédimentation					**Efficacité de déposition :** 15 % pour PSL (∅ 200 nm) et 40 % pour AgNP (∅ 20 nm)	
	Xpose*ALI*®	2 – 10 mL/min	5 – 20 min	Non	**Débit d'exposition :** 5 mL/min **Durée d'exposition :** 10 min **Aérosol utilisé :** NP de CeO_2 **Méthode dosimétrique :** ICP-MS, MEB **Efficacité de déposition :** 5 µg/cm^2, déposition dépendante du protocole, Efficacité (%) NR	(Ji et al., 2017; Cappellini et al., 2020)
	MINUCELL	5 mL/min	Jusqu'à 6 h	Non	**Débit d'exposition :** 5 mL/min **Durée d'exposition :** 6 h **Aérosol utilisé :** Particules ultrafine carbonées (∅ 95 nm) **Méthode dosimétrique :** Modélisation du dépôt + MEB **Efficacité de déposition :** 2 %	(Tippe et al., 2002; Bitterle et al., 2006)
	P.R.I.T ExpoCube	3 mL/min	1 h	Amélioration du dépôt via un système de thermophorèse (gradient thermique)	**Débit d'exposition :** 3 mL/min **Durée d'exposition :** 1 h **Aérosol utilisé :** PM de différentes tailles **Méthode dosimétrique :** QCM + gravimétrie **Efficacité de déposition :** 2 % sans thermophorèse, 30 % (∅ 450 nm) et 43 – 47 % (∅ 900 – 1700 nm) avec thermophorèse	(Ritter et al., 2018, ExpoCube)
	DAVID (Dosimetric Aerosol In Vitro Inhalation Device)	4 à 8 L/min pour l'ensemble du système	4 à 20 min	Condensation et croissance contrôlée des particules	**Débit d'exposition :** 6 et 8 L/min **Durée d'exposition :** < 20 min **Aérosol utilisé :** NP d'uranine (traceur) **Méthode dosimétrique :** Fluorimétrie + gravimétrie **Efficacité de déposition :** 58 % (6L/min) et 46 % (8L/min)	(Tilly et al., 2019, 2023; Ward et al., 2020)

Mécanisme de déposition	Système ALI	Débit d'exposition*	Durée de l'exposition*	Augmentation du dépôt	Déposition des aérosols**	Références et utilisateurs
Flux perpendiculaire - Diffusion et sédimentation	AEC (Custom designed Aerosol Exposure Chamber)	10 mL/min	Jusqu'à 1 h	Précipitation électrostatique	**Débit d'exposition :** 10 mL/min **Durée d'exposition :** 1 h **Aérosol utilisé :** NP métallique **Méthode dosimétrique :** ICP-MS **Efficacité de déposition :** NR	(Tilly et al., 2020)
	PIVEC (Portable In Vitro Exposure Cassette)	500 mL/min	10 min	Non	**Débit d'exposition :** 500 mL/min **Durée d'exposition :** 10 min **Aérosol utilisé :** NP Cu (∅ 40, 100, 800 nm) **Méthode dosimétrique :** gravimétrie + SMPS (Scanning Mobility Particle Sizer) + OPS (Optical Particle Sizer) **Efficacité de déposition :** - Inserts 24 puits : 1.43 % (40 nm), 1.37 % (100 nm), 6.98 % (800 nm) - Inserts 6 puits : 17.83 % (40 nm), 0.47 % (100 nm), 3.70 % (800 nm)	(Secondo, 2018; Lewinski et al., 2019; Secondo et al., 2019)
	ALIDA (ALI Deposition Apparatus – système ViroCell® modifié)	100 mL/min	Jusqu'à 7 h	Précipitation électrostatique	**Débit d'exposition :** 100 mL/min **Durée d'exposition :** 5 h **Aérosol utilisé :** NP de SiO_2 (∅ 50 nm) (électrospray) **Méthode dosimétrique :** MET + fluorimétrie **Efficacité de déposition :** 11 ± 3 %	(Comouth et al., 2013; Panas et al., 2014)
	MALIES (Modular Air-Liquid Interface Exposure System)	3,88 L/min pour le système entier	1 h	Non	**Débit d'exposition :** 3,88 L/min **Durée d'exposition :** 1 h **Aérosol utilisé :** NP de $BaSO_4$ et TiO_2 **Méthode dosimétrique :** MET **Efficacité de déposition :** $BaSO_4$: 3,2 % (0,1 g/L) et 8,9 % (0,9 g/L) TiO_2 : 2,6 % (0,1 g/L) et 7,1 % (0,9 g/L)	(Küstner et al., 2024)

Mécanisme de déposition	Système ALI	Débit d'exposition*	Durée de l'exposition*	Augmentation du dépôt	Déposition des aérosols**	Références et utilisateurs
Flux perpendiculaire - Diffusion et sédimentation	Teflonfilm Indoor Chamber (home – made)	800 mL/min	45 min	Précipitation magnétique	NR	(Jang et al., 2006; Baber et al., 2011)
	HIVIS (HCTm In Vitro Inhalation System)	10 mL/min	2 h	Non	**Débit d'exposition :** 10 mL/min **Durée d'exposition :** 2 h **Aérosol utilisé :** NP de Ag (∅ 20 – 30 nm) **Méthode dosimétrique :** gravimétrie **Efficacité de déposition :** 28 ± 1,5 %	(Kim, Shin, et al., 2022)
	PEMS – based portable ALI exposure system (Portable emissions monitoring systems)	25 mL/min	4 h	Non PEMS permet la mesure des émissions en ligne (CO, CO_2, NO_x, PM et PN)	**Débit d'exposition :** 25 mL/min **Durée d'exposition :** 2 h **Aérosol utilisé :** Emissions diluées provenant de moteurs diésels **Méthode dosimétrique :** gravimétrie **Efficacité de déposition :** 1,5 % (∅ 10 – 21 nm)	(FH JOANNEUM, 2022; Vojtisek-Lom et al., 2025)
	HRH-CES1332 (Single-Concentration Air-Liquid Interface Exposure System)	5 – 25 mL/min	1 h	Non	**Débit d'exposition :** 25 mL/min **Durée d'exposition :** 1 h **Aérosol utilisé :** Emissions moteurs de motos **Méthode dosimétrique :** NR **Efficacité de déposition :** NR	(HRH - CES1332, 2026; Yu et al., 2017)
	ELLIE (ELectrostatic Air-Liquid Interface Exposure system)	100 et 214 mL/min à l'entrée du système	2 h	Champ électrostatique	**Débit d'exposition :** 3 L/min **Durée d'exposition :** 2 h **Aérosol utilisé :** NP de Cu **Méthode dosimétrique :** DMA (Differential Mobility Analyzer) + CPC (Condensation Particle Counter) **Efficacité de déposition :** 1.5 µg/cm^2	(Juárez-Facio et al., 2025)

Mécanisme de déposition	Système ALI	Débit d'exposition*	Durée de l'exposition*	Augmentation du dépôt	Déposition des aérosols**	Références et utilisateurs
Flux perpendiculaire - Diffusion et sédimentation	HTES (high-throughput exposure system) ou VitroCell® 96 Exposure System	1,2 mL/min	28 et 84 min	Non Possibilité de dilutions et de doses-réponses (haut débit)	**Débit d'exposition :** 1,2 mL/min **Durée d'exposition :** 28 (1R6F) et 84 (IQOS) min **Aérosol utilisé :** IR6F et IQOS (fumées de tabac) **Méthode dosimétrique :** (NR) – auto-fluorescence **Efficacité de déposition :** (NR) – dépôt uniforme	(Zimmermann-Klemd et al., 2025)
	Custom ALI exposure system for SVOC – incluant des modules VitroCell®	100 mL/min	24 h	Non Sépare la phase gaz de la phase PM	**Débit d'exposition :** 100 mL/min **Durée d'exposition :** 4 h **Aérosol utilisé :** COVS dibutyl phthalate **Méthode dosimétrique :** Modélisation **Efficacité de déposition :** dépend de la taille des PM – déposition fable et homogène	(Binder et al., 2022)
	Custom-built Air–Liquid Interface (ALI) exposure system	5 mL/min	4 h	Non	**Débit d'exposition :** 5 mL/min **Durée d'exposition :** 4 h **Aérosol utilisé :** gaz d'échappement fraîchement générés **Méthode dosimétrique :** Modélisation **Efficacité de déposition :** 0 – 0,18 – 1,28 – 10,5 et 23,6 µg/m3 généré par 0 – 0,01 – 0,01 – 0,1 et 1 mg/mL	(Oostingh et al., 2013)
	Système ALI "Glovebox" – Exposition CeO_2 Flame Spray	2 L/min	Jusqu'à 30 min	Non	**Débit d'exposition :** 2 L/min **Durée d'exposition :** 5, 10, 20 et 30 min **Aérosol utilisé :** NP de CeO_2 ∅ < 30 nm, solution à 8 % **Méthode dosimétrique :** ICP-MS + MET **Efficacité de déposition :** < 1 µg/puits (5 min), > 1,5 µg/puits (10 min), > 5,5 µg/puits (20 min), 8 µg/puits (30 min)	(Rothen-Rutishauser et al., 2009; Raemy et al., 2011)
	Sealed Stainless Steel Enclosure	1,3 L/min	6 h	Non	**Débit d'exposition :** 1,3 L/min **Durée d'exposition :** 6 h **Aérosol utilisé :** PM vieillies issues de l'échappement d'un moteur diésel (∅ 32 nm, 1,3 – 1,78 g/cm^3) **Méthode dosimétrique :** MET **Efficacité de déposition :** 2,3 × 10^7 particules/cm^2, soit 1,0 × 10^{-4} µg/cm^2	(Holder et al., 2008)

Mécanisme de déposition	Système ALI	Débit d'exposition*	Durée de l'exposition*	Augmentation du dépôt	Déposition des aérosols**	Références et utilisateurs
Flux perpendiculaire - Diffusion et sédimentation	Custom ALI exposure chamber	10 mL/min	1 min	Non	**Débit d'exposition :** 10 mL/min **Durée d'exposition :** 1 min **Aérosol utilisé :** NP de SiO_2 **Méthode dosimétrique :** modélisation + MEB **Efficacité de déposition :** recouvre 27 à 42 % de l'insert	(Kim et al., 2014)
	Exposure System for Continuous Gas Exposure	Entre 1,43 et 1,79 L/min	9 jours	Non	**Débit d'exposition :** 10 mL/min **Durée d'exposition :** 9 jours **Aérosol utilisé :** Gaz NO_2 **Méthode dosimétrique :** NR **Efficacité de déposition :** NR	(Oldenburger et al., 2026)
Flux horizontal – Diffusion et sédimentation	NAVETTA (Flatbed air-liquid interface exposure module)	300 mL/min Débit total traversant la chambre	1 h	Précipitateur électrostatique	**Débit d'exposition :** 300 mL/min **Durée d'exposition :** 1 h **Aérosol utilisé :** NP de CuO (solution de 4 g/L atomisée, dispersée et séchée, ∅ 25 nm) **Méthode dosimétrique :** ICP-MS + SMPS + MEB **Efficacité de déposition :** 75 % sans et 95 % avec champs électrostatique	(Frijns et al., 2017, VITROCELL®)
	EAVES (Electrostatic Aerosol In Vitro Exposure System)	1 L/min Débit total traversant la chambre	1 h	Précipitateur électrostatique	**Débit d'exposition :** 300 mL/min **Durée d'exposition :** 1 h **Aérosol utilisé :** PSL sphériques fluorescentes **Méthode dosimétrique :** Fluorimétrie **Efficacité de déposition :** 35% (∅ 0,2 µm) et 47% (∅ 0,5 µm)	(de Bruijne et al., 2009; Volckens et al., 2009)
	CelTox Sampler dérivée du Gillings Sampler	2,2 L/min Débit total traversant la chambre	Jusqu'à 3 – 4 h	Précipitateur électrostatique (champs électrostatique oscillant) avec chargeur corona	**Débit d'exposition :** 2,2 L/min **Durée d'exposition :** 4 h **Aérosol utilisé :** PSL sphériques fluorescentes (∅ 0,2 µm) **Méthode dosimétrique :** Fluorimétrie **Efficacité de déposition :** 38 à 45 %	(Zavala et al., 2014; Guénette et al., 2022; He, Barnett, et al., 2024)

Mécanisme de déposition	Système ALI	Débit d'exposition*	Durée de l'exposition*	Augmentation du dépôt	Déposition des aérosols**	Références et utilisateurs
Flux horizontal – Diffusion et sédimentation	Thermophoretic ALI Exposure Device (Thermocollector)	0,15 L/min à l'entrée du système	NR	Système de gradient de température : thermophorèse	**Débit d'exposition :** 0,15 L/min **Durée d'exposition :** **Aérosol utilisé :** NP de suie et $AgNO_3$ sphériques **Méthode dosimétrique :** modélisation + analyse chimique + MEB + SMPS **Efficacité de déposition :** NR, ↗ avec la thermophorèse	(Ihalainen et al., 2019; Ihantola et al., 2020)
	MEC (Multiculture Exposure Chamber)	2,2 à 3 L/min Débit total traversant la chambre	3 h	Non	**Débit d'exposition :** 2,2 L/min **Durée d'exposition :** 4 h **Aérosol utilisé :** NP de SiO_2 marquées (nébulisées) **Méthode dosimétrique :** Fluorimétrie **Efficacité de déposition :** 82 %	(Asimakopoulou et al., 2013)
	Custom electrostatic precipitator (ESP) integrated ALI exposure chamber	1,5 L/min	3 h	Précipitateur électrostatique	**Débit d'exposition :** 1,5 Lmin **Durée d'exposition :** 10 min **Aérosol utilisé :** Fluorescéine (∅ 50 – 100 nm) **Méthode dosimétrique :** Fluorimétrie **Efficacité de déposition :** 30 à 40 % selon le ∅ des PM	(Holder and Marr, 2013)
	ALI Exposure System for Nanoplastic Aerosols	4 L/min à l'entrée du système	1 h	Non	**Débit d'exposition :** 4 L/min **Durée d'exposition :** 1 h **Aérosol utilisé :** Nanopolystyrène en suspension en solution puis nébulisation (∅ = 0,5 µm) **Méthode dosimétrique :** Compteur de particules (KANOMAX) **Efficacité de déposition :** 0 – 0,18 – 1,28 – 10,5 et 23,6 µg/m3 généré par 0 – 0,01 – 0,01 – 0,1 et 1 mg/mL	(Kono et al., 2024; Okuda et al., 2025)
	Dual $PM_{2.5}$ sampling + direct ALI exposure system	5 L/min	2 h	Non	**Débit d'exposition :** 5 L/min **Durée d'exposition :** 2 h **Aérosol utilisé :** $PM_{2.5}$ ambiantes **Méthode dosimétrique :** MEB + comptage des particules sur ImageJ **Efficacité de déposition :** : $1,5 \pm 0,1 \times 10^4$ particules/mm^2/h	(Paengnakorn et al., 2025)

Mécanisme de déposition	Système ALI	Débit d'exposition*	Durée de l'exposition*	Augmentation du dépôt	Déposition des aérosols**	Références et utilisateurs
Pas de Flux - Sédimentation	VitroCell® Dry Powder / PowderX	Pas de débit Aérosolisation et déposition directe de poudres sèches	< 30 min	Non	**Débit d'exposition :** Pas de débit **Durée d'exposition :** < 30 min **Aérosol utilisé :** Quartz DQ_{12}, corindon, nanotubes de carbone multi-parois (NM-401), et Graphène (NM48001a) **Méthode dosimétrique :** Gravimétrie + QCM 6 MEB **Efficacité de déposition :** NR	(Chary et al., 2025, VITROCELL®)
	PADDOCC (Pharmaceutical Aerosol Deposition Device On Cell Cultures	Pas de debit **G**énération et dépôt *via* aérosolisation	10 min	Non	**Débit d'exposition :** Pas de débit **Durée d'exposition :** 10 min **Aérosol utilisé :** Budesonid **Méthode dosimétrique :** Lyse des cellules + HPLC **Efficacité de déposition :** ≈ 1 µg/puits (200 µg), 2 µg/puits (400 µg) et 3,5 µg/puits (800 µg)	(Hein et al., 2010, 2011)
	Dry Powder Insufflator (DP-4, dérivé du DP-4M)	Pas de débit Délivre un bolus d'aérosol de poudre *via* une poussée d'air	Pas de durée	Non	**Débit d'exposition :** Pas de débit **Durée d'exposition :** Pas de durée **Aérosol utilisé :** Fluorescine **Méthode dosimétrique :** Fluorimétrie + gravimétrie **Efficacité de déposition :** 13,7 ± 4,4 % dépend du type, de la concentration et de la taille de la NP	(Hoppentocht et al., 2014; Meindl et al., 2015)
Flux d'air turbulent – Diffusion et sédimentation	Home-made spark ignition engine (Euro 5) – ALI exposure	200 mL/min	1 h	Non	**Débit d'exposition :** 200 mL/min **Durée d'exposition :** 1 h **Aérosol utilisé :** Émissions complètes d'échappement du moteur Euro 5 **Méthode dosimétrique :** Gravimétrique + SMPS/CPC **Efficacité de déposition :** 2 % – 3 mg/insert	(Vojtisek-Lom et al., 2019; Cervena et al., 2020; Rossner et al., 2021)

* Durée et débit du flux d'air d'exposition : les valeurs maximales sont données à titre indicatif issues, pour la plupart, de la littérature et non du site constructeur quand il y en a. Les systèmes peuvent ou non contenir des cellules. Chaque expérimentateur est libre d'expérimenter toutes les durées et débits d'exposition et adapter son protocole.
** Déposition des aérosols : La dose déposée dépend principalement des paramètres qui sont propre à l'exposition (débit, durée, type et concentration de l'aérosol). Les valeurs indiquées correspondent à une étude de déposition et répertorient chaque caractéristique propre à cette étude de déposition.
*** Ce tableau exclue les systèmes de fumeurs

Les systèmes existants diffèrent donc par leur conception, leur géométrie, leur débit, direction de flux, ainsi que par leurs mécanismes de génération et de dépôt des aérosols. Si tous visent à exposer des cultures cellulaires dans des conditions plus représentatives que les modèles submergés, leurs principes physiques varient fortement. Un nombre important de systèmes intègrent des dispositifs favorisant artificiellement la déposition, tels que des chargeurs et/ou précipitateurs électrostatiques, des accélérateurs de flux, des gradients thermiques (thermophorèse), pour augmenter le rendement de déposition des particules. Bien que techniquement efficaces, ces derniers sont incompatibles avec des expositions de longues durées et introduisent des forces physiques absentes de la respiration pulmonaire physiologique, qui pourraient modifier les dynamiques de transport et d'interaction particules-cellules ainsi que les caractéristiques de l'aérosol. Par exemple, ces systèmes présentent des procédés physiques de charge corona qui modifient la charge des particules et produisent de l'ozone, de gradient thermique qui influence le partage gaz/particule, ou encore d'accélération de flux entraînant la collision des particules. En pratique, peu de systèmes reproduisent simultanément un flux aérien dynamique, contrôlé et perpendiculaire aux cellules, sans artifice de dépôt, tout en permettant des expositions prolongées. Certaines plateformes commerciales comme VitroCell® ou Cultex® se distinguent à cet égard, car elles permettent une exposition continue sous flux contrôlé, sur des durées compatibles avec des scénarios d'exposition réalistes (ex : 24 h), sans recours obligatoire à des mécanismes électrostatiques. Ces caractéristiques les rapprochent davantage des conditions d'inhalation pulmonaire, notamment au niveau alvéolaire.

Au-delà de leurs différences, ces dispositifs reposent sur des principes communs. Ils intègrent notamment un module d'exposition thermorégulé et des emplacements dédiés à l'exposition de modèles cellulaires cultivés en ALI sur inserts à membrane semi-perméable, permettant le maintien des cellules à une température physiologique et un apport en éléments nutritifs essentiels. Les modules d'exposition sont généralement équipés de pompes et de contrôleurs de débit massique assurant une distribution contrôlée des aérosols vers les cultures cellulaires. Les systèmes dynamiques à flux perpendiculaire représentent la version des systèmes ALI les plus physiologiquement pertinents pour l'étude du compartiment pulmonaire en simulant fidèlement l'inspiration et l'arrivée de l'air

au niveau du poumon profond. Le flux d'air permet généralement une déposition homogène des particules. La dose exposée en ALI dépend de nombreux facteurs tels que la taille, la densité, la forme, et la charge des particules, de même que du débit du flux d'air, de la géométrie de la chambre d'exposition, des mécanismes de dépôt (diffusion, sédimentation, impaction, forces électrostatiques, etc.), de l'humidité relative (HR) et de la température (Yu et al., 2017; Lacroix et al., 2018; Baldassi et al., 2021; Buckley et al., 2024; Das et al., 2025). La déposition effective des particules sur le tapis cellulaire constitue un paramètre déterminant afin de pouvoir interpréter les réponses toxicologiques observées et son efficacité doit par conséquent être évaluée.

Plusieurs approches complémentaires sont utilisées pour estimer ou quantifier cette déposition. Des méthodes semi-directes reposent sur la collecte des particules déposées sur des supports inertes ou biologiques, tels que des grilles de microscopie électronique à transmission (MET), des filtres ou des inserts, suivi d'analyses physiques (gravimétrie, taille, densité) ou chimiques (analyse de métaux utilisés comme traceurs d'exposition par exemple) (Mülhopt et al., 2016, 2020; Nannu Shankar et al., 2023; Buckley et al., 2024; Das et al., 2025). Les systèmes d'exposition peuvent également intégrer des dispositifs de mesures de la masse ou du nombre de particules déposées comme une microbalance à cristal de quartz (Quartz Crystal Microbalance - QCM), un photomètre ou un électromètre (Ding et al., 2020). L'estimation peut également être faite en mesurant la différence de concentrations en amont et en aval du système d'exposition par des instruments de type SMPS (Scanning Mobility Particle Sizer) (Latvala et al., 2016; Nannu Shankar et al., 2023). Des approches théoriques sont également employées combinant des calculs de déposition des particules reposant sur la physique et la dynamique des aérosols avec des données de mesures des caractéristiques physiques des particules (nombre, diamètre, densité, morphologie, etc.) et les caractéristiques géométriques du système d'exposition et physique de l'exposition (vitesse du flux d'air, viscosité, température, humidité, etc.) (Aufderheide et al., 2011; Comouth et al., 2013; Yu, Jang, et al., 2017; Lucci et al., 2018). Bien que ces méthodes apportent des informations essentielles, l'évaluation précise de la dose effectivement déposée et biologiquement pertinente reste un défi majeur des expositions ALI, contribuant à la variabilité inter-études et renforçant le besoin d'harmonisation des pratiques.

2.5.3.2. Paramètres clés pour les expositions dynamiques ALI

Les systèmes dynamiques d'exposition ALI imposent des contraintes techniques importantes pouvant impacter de façon significative les paramètres biologiques cellulaires (Buckley et al., 2024; Bredeck et al., 2025) (Tableau 2. 3.). La chambre d'exposition doit garantir des conditions stériles ce qui implique un nettoyage et une stérilisation entre chaque exposition. De plus, des conditions strictement contrôlées telles que le débit du flux d'air, l'humidité relative, la température à l'intérieur des chambres, ou encore, la durée de l'exposition sont nécessaires afin d'éviter la déshydratation cellulaire, les perturbations osmotiques ou l'induction de réponses biologiques non spécifiques des polluants testés (Tsoutsoulopoulos et al., 2016; Zavala et al., 2017; Buckley et al., 2024; Bredeck et al., 2025; Zimmermann et al., 2025). Bien que le nombre d'études utilisant ces dispositifs soit en constante augmentation, peu d'entre elles rapportent de manière exhaustive les paramètres critiques d'exposition, tels que la température, l'humidité relative, la durée d'exposition, le temps d'habituation à l'ALI des modèles cellulaires utilisés ou encore l'estimation de la dose effectivement déposée (Lacroix et al., 2018; Leibrock et al., 2019). Or, tous ces paramètres influent directement sur l'homéostasie des cellules et leurs réponses au flux d'air et aux polluants testés, conditionnant ainsi la pertinence physiologique et toxicologique des résultats obtenus.

D'autres dispositifs ajoutés aux systèmes d'exposition dynamiques, comme l'utilisation de précipitateurs électrostatiques à l'intérieur des chambres peuvent aussi impacter les cellules. Ces dispositifs permettent de précipiter les particules ayant une certaine charge électrique (positive ou négative) sur le tapis cellulaire assurant une meilleure déposition et donc, une exposition mieux contrôlée. Une électrode placée en aval des inserts attire les particules d'une charge électrique donnée en appliquant un champ électrique opposé. Les particules peuvent aussi être chargées uniformément à la même polarité en amont du module d'exposition par un système de décharge corona. Ces dispositifs ne sont toutefois pas compatibles avec des expositions longues. Le plus souvent, les expositions réalisées avec ceux-ci ont une durée relativement courte, comprise entre 5 et 30 min. La précipitation unique de particules chargées positivement ou négativement représente un biais en toxicologie. En effet, il est maintenant bien connu que les particules chargées négativement ont un potentiel toxique plus important que les particules chargées positivement en raison

des flux d'ions intra- et extracellulaire nécessaire à l'homéostasie cellulaire (Roser et al., 1998; Kohli and Alpar, 2004; Harush-Frenkel et al., 2007; Nagayama et al., 2007; Albanese et al., 2012; Landsiedel et al., 2012; Zoroddu et al., 2014; Ruenraroengsak and Tetley, 2015). Au-delà de modifier les caractéristiques physico-chimiques des aérosols exposés dans le cas des chargeurs corona, l'utilisation des précipitateurs électrostatiques, même à faibles puissances et pour de courtes durées, peuvent induire une électrolyse des cellules et induire une mort cellulaire prématurée (Buckley et al., 2024). Ainsi, dans le contexte ces travaux de thèse, compte tenu que ces systèmes ne permettent pas une représentation physiologiquement et toxicologiquement pertinente des conditions d'exposition alvéolaires, ils n'ont pas été utilisés.

Finalement, afin d'intégrer et de pallier les impacts potentiels de l'ALI, du flux d'air ou encore des précipitateurs, l'utilisation de contrôles négatifs pertinents est indispensable. Des cellules laissées à l'incubateur le temps de l'exposition en ALI (contrôles incubateurs) permettent une évaluation de l'impact de l'exposition au seul flux d'air sur les cellules tandis que des inserts exposés à de l'air propre (contrôles air) permettent de juger l'impact du polluant étudié. Cependant, encore trop peu d'études présentent en détail les contrôles négatifs dans la littérature, et ce pour plusieurs raisons :

- La réalisation de la totalité des contrôles est généralement considérée comme très chronophage en plus d'être consommatrice de matériels biologiques, d'inserts, et de réactifs de culture cellulaire. Ainsi, certains contrôles ne sont pas systématiquement réalisés ou sont partiellement évalués. Dans de nombreuses études, les contrôles associés au flux d'air sont principalement analysés à l'aide de tests de cytotoxicité ou de viabilité cellulaire, conduisant à conclure à une absence d'effet du flux d'air. Toutefois, ces paramètres correspondent à des marqueurs tardifs et ne reflètent pas nécessairement l'état fonctionnel des cellules.
- L'importance des contrôles n'est pas encore suffisamment soulignée dans la communauté scientifique. De ce fait, les données relatives aux contrôles sont souvent difficilement exploitables. Par exemple, les contrôles incubateurs ne sont pas systématiquement présentés ou ne sont pas comparés aux contrôles air.
- Lors d'expositions dynamiques prolongées (supérieures à 4 h), les contrôles air révèlent fréquemment des effets délétères significatifs par rapport aux contrôles incubateurs.

Pourtant, ces résultats sont encore trop rarement présentés ou discutés dans la littérature.

Très récemment, la communauté scientifique a commencé à se questionner et à publier les réponses cellulaires observées après une simple exposition à de l'air propre (Buckley et al., 2024; Bredeck et al., 2025). Ces dernières sont présentées dans la plupart des études récentes, en prenant en compte les contrôles incubateur et air, mais ne sont pas clairement analysées et interprétées (Augustin et al., 2020; Bessa et al., 2021; Hufnagel et al., 2021; Verstraelen et al., 2021; Zimmermann et al., 2025; Zimmermann-Klemd et al., 2025; Guo et al., 2026). Indépendamment du modèle de système ALI et du modèle cellulaire utilisés, les effets biologiques relevés sont souvent les mêmes : une réponse (pro)-inflammatoire avec une augmentation de la production de l'expression des gènes liés à TNF-α, IL-6 et IL-8 et un stress oxydant avec une augmentation de ROS intra- et extracellulaire, l'augmentation de l'expression des gènes codant pour les enzymes antioxydantes telles que HMOX1 et dans une moindre mesure, une peroxydation lipidique et de la cytotoxicité (Augustin et al., 2020; Bessa et al., 2021; Hufnagel et al., 2021; Verstraelen et al., 2021; Buckley et al., 2024; Bredeck et al., 2025; Campbell et al., 2025; Zimmermann et al., 2025; Zimmermann-Klemd et al., 2025; Guo et al., 2026).

2.5.3.3. Besoin d'harmonisation des pratiques pour les expositions ALI dynamiques

Au regard des nombreux paramètres techniques et biologiques susceptibles d'influencer les réponses cellulaires observées lors d'expositions dynamiques en ALI, un besoin d'harmonisation des pratiques expérimentales apparaît aujourd'hui indispensable. La grande diversité des systèmes ALI, des stratégies d'exposition employées et des modèles cellulaires utilisés s'accompagne d'une hétérogénéité importante dans les protocoles expérimentaux, rendant les comparaisons inter-études particulièrement complexes, voire impossibles. En effet, de nombreuses publications ne rapportent qu'une partie des paramètres critiques d'exposition, tels que le débit du flux d'air, la durée et le mode d'exposition (statique ou dynamique), le temps d'adaptation à l'ALI, le conditionnement de l'aérosol ou encore la dose déposée. De plus, les contrôles négatifs indispensables à l'interprétation des effets biologiques, notamment les contrôles incubateurs et les contrôles air, ne sont pas présentés de manière systématique, ou ne font pas l'objet

d'analyses approfondies. Cette variabilité méthodologique limite fortement la reproductibilité des études et la robustesse des conclusions toxicologiques qui en découlent.

Dans ce contexte, plusieurs groupes de recherche ont récemment souligné la nécessité de définir des recommandations communes visant à améliorer la transparence, la reproductibilité, la comparabilité et la pertinence physiologique des études menées en ALI (Lacroix et al., 2018; Leibrock et al., 2019; Buckley et al., 2024; Bredeck et al., 2025). Ces recommandations incluent notamment l'harmonisation du report des paramètres d'exposition, l'intégration systématique de contrôles négatifs pertinents, ainsi que l'évaluation des doses d'exposition.

Si une harmonisation complète des pratiques reste difficile en raison de la diversité des designs expérimentaux, l'inclusion systématique et l'analyse rigoureuse des contrôles devraient néanmoins constituer une exigence minimale dans toute étude utilisant des systèmes dynamiques en ALI. Ce besoin est d'autant plus critique dans le cadre des études portant sur les AOS. En raison de leur nature complexe, dynamique et hautement dépendante des conditions expérimentales de génération et d'exposition. Les différences de systèmes en ALI, de conditions de flux d'air, de temps d'exposition ou de stratégies de dépôt par l'inclusion de systèmes d'amélioration du dépôt par exemple, peuvent conduire à des réponses biologiques divergentes, indépendamment de la toxicité intrinsèque des AOS étudiés.

Points clés : Approches pour l'étude in vitro de la toxicité des PM et des AOS

L'interface air-liquide (ALI)	L'ALI constitue une approche pertinente pour reproduire de manière plus physiologique l'interface entre l'air inspiré et les tissus pulmonaires, en particulier pour l'étude des particules inhalées.
Modèles alvéolaires *in vitro* en ALI	Le besoin de modèles alvéolaires physiologiquement pertinents, simples, rapides et reproductibles, demeure constant. Le développement de cocultures capables de reproduire la complexité de l'environnement alvéolaire et caractérisées directement en conditions ALI apparaît indispensable.
Les systèmes d'exposition ALI	Les expositions dynamiques ALI sont techniquement complexes et nécessitent le contrôle rigoureux de nombreux paramètres (flux d'air, humidité, température, durée d'exposition, dose déposée). De plus en plus d'études mettent en évidence l'impact du flux d'air en lui-même sur les cellules, indépendamment des polluants étudiés.
Harmonisation ALI	Un besoin critique d'harmonisation des pratiques d'exposition dynamique en ALI s'impose afin de permettre la comparaison des études de toxicité, d'améliorer la reproductibilité des résultats et de promouvoir de bonnes pratiques expérimentales, notamment en ce qui concerne l'intégration des contrôles négatifs pertinents, et le report de leurs données spécifiques.

2.6. Synthèse bibliographique des études de la toxicité des AOS par exposition ALI

Le nombre d'études ayant investigué la toxicité des AOS par exposition en ALI sur des modèles pulmonaires est encore limité dans la littérature. Une synthèse bibliographique des travaux existants est présentée dans le Tableau 2. 3. Celle-ci vise à fournir une vue d'ensemble (i) des approches méthodologiques mises en œuvre, incluant les modèles cellulaires et les systèmes en ALI utilisés, (ii) des effets toxicologiques rapportés pour différents types d'AOS (biogéniques, anthropiques) obtenus selon différentes conditions expérimentales, et (iii) des principales limites et difficultés rencontrées, telles que le manque de contrôles appropriés ou les effets induits par le flux d'air (Tableau 2. 3.).

Tableau 2.3. : Description des études de toxicité des AOS par exposition ALI et des approches méthodologiques associées

Conditions de formation d'AOS	Paramètres d'exposition	Modèles cellulaires	Contrôles	Evaluation toxicologique	Réf
COV : 1,3-Butadiène, Isoprène **Système :** Chambre de simulation atmosphérique **Réactivité :** Lumière solaire + NO_x + OH + O_3 **Temps de résidence :** 4 h **Température et humidité :** Environnementales **[Gaz] :** 200 ppbv de COV et 50 ppbv de NO_x **[AOS] générées :** NR*	**Système ALI :** Chambre d'exposition reliée à un incubateur **Débit d'exposition :** Pas de débit (système ALI statique) **Durée d'exposition :** 5 h **Augmentation du dépôt :** Non **Conditionnement de l'aérosol :** 37 °C, 100 % HR, 5 % CO_2 **Dose déposée :** Non calculée	**Modèle cellulaire :** A549 et cellules bronchiques humaines différenciées **Habituation à l'ALI :** A549 : NR Cellules bronchiques : 18 à 21 jours **Confluence avant exposition :** Confluence complète	**Contrôles air :** pas nécessaires **Contrôles incubateur :** Oui **Présentation graphique des contrôles :** Incubateur vs. exposées	**Paramètres biologiques :** Surnageant récupérés 9 h post exposition pour dosage LDH, sécrétion et expression génique d'IL-8 **Effets des AOS :** A549 : ↗ LDH et niveau d'IL-8 Cellules primaires : pas de réponse significative **Effets de l'air :** NA**	(Doyle et al., 2004)

Conditions de formation d'AOS	Paramètres d'exposition	Modèles cellulaires	Contrôles	Evaluation toxicologique	Réf
COV : α-Pinène, terpinolène sur nanoparticules magnétiques Fe_3O_4 +/- acides (acide sulfurique et sulfate d'hydrogène d'ammonium) **Système :** Chambre de simulation atmosphérique **Réactivité :** OH + O_3 **Temps de résidence :** 5 h **Température et humidité :** Ambiantes **[Gaz] :** 200 ppbv de COV et 50 ppbv de NO_x **[AOS] générées :** AOS sur nanoparticules magnétiques : $4{,}10.10^{11}$ – $8{,}47.10^{12}$ nm^3/cm^3 AOS : $2{,}01.10^{11}$ – $4{,}24.10^{11}$ nm^3/cm^3	Système ALI : NR - Flux horizontale Débit d'exposition : 1,4 à 3 L/min Durée d'exposition : 60 min Augmentation du dépôt : Champ magnétique permanant pour attirer les AOS sur nanoparticules magnétiques Conditionnement de l'aérosol : 100 % HR, 5 % CO_2 Dose déposée : 2,39 – 8,99 µg / insert selon l'expérience	Modèle cellulaire : BEAS-2B Habituation à l'ALI : NR Confluence avant exposition : 100 %	Contrôles air : Pas clair Contrôles incubateur : Oui Présentation graphique des contrôles : Oui	Paramètres biologiques : 24 h post exposition – LDH, sécrétion et expression génique d'IL-6, IL-8, TNF-α Effets des AOS : - AOS seuls : aucun effet - AOS sur nanoparticules magnétiques : ↗ dose réponse d'IL-8 Effets de l'air : NR	(Jang et al., 2006)
COV : 1,3-Butadiène **Système :** Chambre de simulation atmosphérique **Réactivité :** Lumière solaire + NO_x + OH + O_3 **Temps de résidence :** NR **Température et humidité :** 22-23°C, 40-50% HR **[COV] :** 0,072 ± 0,056 ppm **[AOS] générées :** NR	**Système ALI :** Chambre atmosphérique reliée à un incubateur comme chambre d'exposition **Débit d'exposition :** système ALI statique **Durée d'exposition :** 5 h **Augmentation du dépôt :** NR **Conditionnement de l'aérosol :** 5 % CO_2 **Dose déposée :** NR	**Modèle cellulaire :** A549 et cellules bronchiques humaines différenciées **Habituation à l'ALI :** A549 : NR Cellules bronchiques : 18 à 21 jours **Confluence avant exposition :** 100 %	**Contrôles air :** pas nécessaires **Contrôle incubateur :** Oui **Présentation graphique des contrôles :** Incubateur vs. exposées	**Paramètres biologiques :** 9 h post exposition dosage LDH et sécrétion d'IL-8 et IL-6 **Effets des AOS :** ↗ LDH et sécrétion d'IL-8 et IL-6 **Effets de l'air :** NA	(Doyle et al., 2007)

Conditions de formation d'AOS	Paramètres d'exposition	Modèles cellulaires	Contrôles	Evaluation toxicologique	Réf
COV : α-pinène sur nanoparticules magnétiques de Fe_3O_4 ± acides (acide sulfurique et sulfate d'hydrogène d'ammonium) **Système :** Chambre de simulation atmosphérique **Réactivité :** O_3 **Temps de résidence :** NR **Température et humidité :** 22-23°C, 40-50% HR **[Gaz] :** 0,3 ppmv COV, 0,3-0,4 ppmv O_3 **[AOS] générées :** NR	**Système ALI :** Chambre atmosphérique reliée une chambre d'exposition **Débit d'exposition :** système ALI statique **Durée d'exposition :** 60 min **Augmentation du dépôt :** NR **Conditionnement de l'aérosol :** NR **Dose déposée :** NR	**Modèle cellulaire :** BEAS-2B **Habituation à l'ALI :** NR **Confluence avant exposition :** NR	**Contrôle air :** NR **Contrôle incubateur :** NR **Présentation graphique des contrôles :** NR	**Paramètres biologiques :** 6 ou 24 h post exposition dosage d'IL-8 et acétaldéhyde (marqueur de stress oxydant) **Effets des AOS :** ↗ acétaldéhyde à 6 h et ↗ IL-8 à 24 h **Effets de l'air :** NA	(Ghio et al., 2009)
COV : 1,3-Butadiène **Système :** Chambre de simulation atmosphérique **Réactivité :** Lumière du soleil + NO_x + O_3 **Temps de résidence :** plusieurs heures **Température et humidité :** 50 % HR **[Gaz] :** 199 ppbv d'acroléine, 171 ppbv d'ozone et 87 ppbv de formaldéhyde 1 – 5 ppmv O_3 **[AOS] générés :** 200 ppbv COV + 50 ppbv NO + 1 – 5 ppmv O_3	**Système ALI :** VitroCell® **Débit d'exposition :** 3 mL/min **Durée d'exposition :** 5 h **Augmentation du dépôt :** NR **Conditionnement de l'aérosol :** 37 °C + 5% CO_2 + 50 % HR **Dose déposée :** NR **Conditions :** (1) 1,3-Butadiène (2) produit de formation du 1,3-Butadiène (3) O_3 formée (4) chaque co-produit séparé	**Modèle cellulaire :** A549 **Habituation à l'ALI :** 24 ± 4 h **Confluence avant exposition :** Confluence complète	**Contrôles air :** Air propre humidifié **Contrôles incubateur :** non **Présentation graphique des contrôles :** Comparaison avec contrôles air	**Paramètres biologiques :** 24 h post exposition, 2 h post exposition, cyrtométrie en flux (viabilité), expression de *GM-CSF, IL-6, IL-8, TNF-α*, 8, 12 et 24 h post exposition, sécrétion GM-CSF, IL-6, IL-8, TNF-α **Effets des AOS :** (2) ↗ *GM-CSF, IL-6, IL-8, TNF-α* (4) 4-OPA ↗ IL-6, IL-8, GM-CSF, TNF-α, Diacetyl ↗ IL-6, IL-8, Glyoxal ↗ IL-6, IL-8, Methyl glyoxal ↗ IL-8, IL-6 Glutaraldehyde ↗ IL-6, IL-8, TNF-α **Effets de l'air :** NR	(Anderson et al., 2010)

Conditions de formation d'AOS	Paramètres d'exposition	Modèles cellulaires	Contrôles	Evaluation toxicologique	Réf
COV : α-pinène et 1,3,5-trimethylbenzene **Système :** Chambre de simulation **Réactivité :** O_3 + NO_x (2:1 ratio) + irradiation solaire **Température et humidité :** 20 °C + 50 % HR **[COV] :** 240 ppb (α-pinène), 600 et 1200 ppb (1,3,5-trimethylbenzene) **[AOS] générées :** 2×10^4 particules/cm^3	**Système ALI :** NACIVT **Débit d'exposition :** 50 mL/min **Durée d'exposition :** 2 h **Augmentation du dépôt :** chargeur de particules **Conditionnement de l'aérosol :** (contrôle air) 75 % N_2 + 20 % O_2 + 5 % CO_2 + > 90 % RH Dénudeurs (charbon et oxide de cobalt) **Dose déposée :** NA	**Modèle cellulaire :** Cellules épithéliaux-trachéales (Cochon) + Macrophages (Cochon) + A549 (Humain) + Macrophages (Humain) **Habituation à l'ALI :** NA **Confluence avant exposition :** NR	**Contrôles air :** Oui **Contrôles incubateur :** Oui **Présentation graphique des contrôles :** Oui	**Paramètres biologiques :** MET + LDH + Activité phagocytaire des macrophages (APM) + Sécrétion TNF-α, IL-6 et IL-8 + Migration + Prolifération **Effet des AOS :** (Cochon) ↘ APM, ↗ IL-8, (Humain) ↘ APM, ↗ IL-8, ↗ réparations, AOS dépend **Effets de l'air :** (Cochon) ↘ APM, ↗ IL-8, (Humain) ↘ APM, ↗ IL-8	(Gaschen et al., 2010)
COV : Limonène **Système :** Chambre de simulation atmosphérique **Réactivité :** Lumière du soleil + NO_x + O_3 **Temps de résidence :** 15 – 30 min **Température et humidité :** 50 % HR **[Gaz] : 20 ppm COV, O_3 (4 ppm)** **[AOS] générées :** NR	**Système ALI :** VitroCell® PT-CF exposure system **Débit d'exposition :** 3 mL/min (A549), 2 mL/min (MucilAir™) **Durée d'exposition :** 1 – 4 h (A549), 1 h × 5 jours × 5 semaines (MulciAir™) **Augmentation du dépôt :** Non **Conditionnement de l'aérosol :** NR **Dose déposée :** NR	**Modèle cellulaire :** (1) A549 et (2) MucilAir™ **Habituation à l'ALI :** (1) NR, (2) 18 – 21 jours **Confluence avant exposition :** NR	**Contrôles air :** Oui **Contrôles incubateur :** Oui **Présentation graphique des contrôles :** Contrôles air vs limonène ou O_3 seuls Limonène vs limonène + O_3	**Paramètres biologiques :** (1) 10, 12 et 24 h post exposition : Prolifération + sécrétion IL-8, MCP-1 (2) : Prolifération + sécrétion IL-8, IL-6, MCP-1, GM-CSF **Effets des AOS :** (1) : expo 4 h limonène ↗ IL-8 (12 h), ↗ MCP-1 (24 h), limonène + O_3 ↗ IL-8 (12 h), expo 1 h limonène ↗ IL-8 et MCP-1 (24 h), limonène + O_3 ↗ MCP-1 (24 h) + prolifération (2) limonène + O_3 ↗ IL-8 et 6 (sem. 3) et ↘ MCP-1 (sem. 1 et 2) **Effets de l'air :** (1) ↘ Prolifération après 4 h d'expo à l'air propre (24 h post expo)	(Anderson et al., 2013)

Conditions de formation d'AOS	Paramètres d'exposition	Modèles cellulaires	Contrôles	Evaluation toxicologique	Réf
COV : Isoprène sur particules support de $MgSO_4$ + H_2SO_4 **Système :** Chambre de simulation atmosphérique **Réactivité :** OH généré à partir de H_2O_2 + NO + lumière solaire **Temps de résidence :** 1 h **Température et humidité :** 25 °C + 50 % HR **[Gaz] : 3,5 ppmv COV, 200 ppbv NO** **[AOS] générées :** 173,1 ± 4,2 µg/m^3	**Système ALI :** EAVES **Débit d'exposition :** 1,0 L/min **Durée d'exposition :** 1 h **Augmentation du dépôt :** Précipitateur électrostatique intégré **Conditionnement de l'aérosol :** 37 °C + 70 % HR + 5 % CO_2 **Dose déposée :** 0,29 µg/cm^2	**Modèle cellulaire :** BEAS-2B **Habituation à l'ALI :** Juste avant expo **Confluence avant exposition :** 80 %	**Contrôles air :** Oui **Contrôles incubateur :** Oui **Présentation graphique des contrôles :** Incubateur. vs. contrôles air AOS lumière allumée vs éteintes	**Paramètres biologiques :** Expression *IL-8* et *COX-2*, dosage LDH **Effets des AOS :** ↗ expression *IL-8* et *COX-2* **Effets de l'air :** Pas d'effets	(Arashiro et al., 2016)
COV : Isoprène sur particules support de $MgSO_4$ + H_2SO_4 **Système :** Chambre de simulation atmosphérique **Réactivité :** OH généré à partir de H_2O_2 + NO + lumière solaire **Temps de résidence :** NR **Température et humidité :** 27, 4 °C + 50 – 70 % HR **[Gaz et PM] : 3,5 ppmv COV, 200 ppbv NO, 100 µg/m^{3}PM support** **[AOS] générées :** 35 µg/m^3	**Système ALI :** EAVES **Débit d'exposition :** 1,0 L/min **Durée d'exposition :** 1 h **Augmentation du dépôt :** Précipitateur électrostatique intégré **Conditionnement de l'aérosol :** 37 °C + 70 % HR + 5 % CO_2 **Dose déposée :** 58 ng/cm^2	**Modèle cellulaire :** BEAS-2B **Habituation à l'ALI :** Juste avant expo **Confluence avant exposition :** 60 – 70 %	**Contrôles air :** Air propre + PM support seules + sans lumière **Contrôles incubateur :** Oui **Présentation graphique des contrôles :** Non	**Paramètres biologiques :** 9 h post exposition LDH et transcriptomique ciblée sur 249 gènes de l'inflammation et 84 gènes du stress oxydant **Effets des AOS :** 29 gènes modifiés dont 23 ↗ et 6 ↘ régulés **Effets de l'air :** Pas d'effet	(Lin et al., 2017; Surratt et al., 2019)

Conditions de formation d'AOS	Paramètres d'exposition	Modèles cellulaires	Contrôles	Evaluation toxicologique	Réf
COV : α-pinène (1), d-limonène (2) et toluène (3) **Système :** Chambre de simulation atmosphérique **Réactivité :** (1) ou (2) + O_3 et (3) + OH + NO_x **Temps de résidence :** NR **Température et humidité :** (1 et 2) 22 – 25 °C, 15,3 et 38 % HR, (3) 21 – 40 °C et 24 – 73 % HR **[Gaz] :** (1) 309 – 424 ppbv + 208 – 503 ppbv O_3, (2) 272 – 390 ppbv + 300 – 406 ppbv O_3, (3) 6018 – 650 ppbv + 192 - 210 ppbv NO_x **[AOS] générées :** (1 et 2) ≈ 2000 µg/m^3, (3) ≈ 1200 µg/m^3	**Système ALI :** Cultex RFS avec ou sans EDD **Débit d'exposition :** 0,15 – 0,6 – 0,9 mL/min (par puits) **Durée d'exposition :** 15, 30 et 45 min **Augmentation du dépôt :** EDD à – 600 V **Conditionnement de l'aérosol :** 80 % HR **Dose déposée :** 0,2 µg pour 30 min et 0,15 mL/min de débit par modélisation	**Modèle cellulaire :** BEAS-2B **Habituation à l'ALI :** 15 jours **Confluence avant exposition :** Confluence atteinte	**Contrôles air :** Oui **Contrôles incubateur :** Oui **Présentation graphique des contrôles :** Oui	**Paramètres biologiques :** LDH et expression d'*IL-8* **Effets des AOS :** Non car trop d'effets dû à l'exposition seule **Effets de l'air :** Fort effet du flux d'air dû aux débits élevés (LDH + *IL-8*), moins d'effet à 0,15 L/min	(Yu, Jang, et al., 2017)
COV : Naphtalène et α-pinène **Système :** PAM-OFR (Potential Aerosol Mass - Oxidation Flow Reactor) **Réactivité :** OH + NO_x + lampes 185 + 254 nm (+ O_3) **Temps de résidence :** 190 secondes **Température et humidité :** 35-38 % HR, 22°C **[Gaz] :** 250 ppb COV, 15 – 61 ppm O_3 **[AOS] générées :** NR	**Système ALI :** Cultex RFS **Débit d'exposition :** 10 mL/min **Durée d'exposition :** 1 à 6 h **Augmentation du dépôt :** EDD **Conditionnement de l'aérosol :** NR **Dose déposée :** NR	**Modèle cellulaire :** A549 **Habituation à l'ALI :** NR **Confluence avant exposition :** NR	**Contrôles air :** NR **Contrôles incubateur :** NR **Présentation graphique des contrôles :** NR	**Paramètres biologiques :** 4 h post exposition dosage de ROS, LDH, 24 h post exposition expression *CAT, NRF2, NQO1,* et *IL-8* **Effets des AOS :** ↗ de l'expression *CAT, NRF2, NQO1,* et *IL-8* = activation de la voie NRF2 et inflammation **Effets de l'air :** NR	(Chowdhury et al., 2018)

Conditions de formation d'AOS	Paramètres d'exposition	Modèles cellulaires	Contrôles	Evaluation toxicologique	Réf
COV : (1) Naphtalène et (2) α-pinène **Système :** PAM-OFR **Réactivité :** OH + NO_x (2 % N_2O)+ lampes 185 + 254 nm (+ O_3) **Temps de résidence :** 180 secondes **Température et humidité :** 36 ± 2 % HR et 22,5 ± 0,3 °C **[COV] :** 250 ppbv (naphtalène), 128 ppbv (α-pinène) **[AOS] générées :** NR	**Système ALI :** Cultex RFS **Débit d'exposition :** 10 mL/min **Durée d'exposition :** 4 h **Augmentation du dépôt :** EDD - 300 V **Conditionnement de l'aérosol :** 38 % HR **Dose déposée :** (1) 9,8 ± 1,1 µg/cm², vieillis 8,0 ± 0,5 µg/cm², + NO_x 8,6 ± 0,9 µg/cm² (2) 9,7 ± 3,8 µg/cm², vieillis 11,0 ± 1,3 µg/cm², + NO_x 3,9 ± 0,1 µg/cm²	**Modèle cellulaire :** A549 **Habituation à l'ALI :** **Confluence avant exposition :** NR	**Contrôles air :** Air + filtre HEPA **Contrôles incubateur :** Oui **Présentation graphique des contrôles :** Comparaisons avec contrôles air	**Paramètres biologiques :** Viabilité (WST-1), dosage ROS avec H_2DCFDA et superoxydes par cytométrie en flux et dosage intracellulaire **Effets des AOS :** ↗ Cytotoxicité en lien avec niveaux de ROS intracellulaires et teneur plus élevée en peroxydes mesurée dans les AOS vieillis **Effets de l'air :** Pas d'effet, pas de comparaison avec contrôles incubateur	(Chowdhury et al., 2019)
COV : Méthylsiloxane **Système :** PAM-OFR **Réactivité :** OH + O_3 **Temps de résidence :** NR **Température et humidité :** 30 % HR **[COV] :** NR **[AOS] générées :** 82 – 220 µg/m³	**Système ALI :** VitroCell® **Débit d'exposition :** 5 mL/min **Durée d'exposition :** 4 h **Augmentation du dépôt :** Non **Conditionnement de l'aérosol :** 5 % CO_2 + HR **Dose déposée :** 150 µg/m³ – 54 à 116 ng/cm²	**Modèle cellulaire :** A549 **Habituation à l'ALI :** 12 h **Confluence avant exposition :** 100 %	**Contrôles air :** Air filtré (HEPA) **Contrôles incubateur :** Oui **Présentation graphique des contrôles :** Comparaison avec contrôles incubateurs	**Paramètres biologiques :** Viabilité et sécrétion d'IL-6 **Effets des AOS :** ↘ viabilité **Effets de l'air :** pas de véritables contrôles air car le filtre HEPA ne piège pas les gaz	(King et al., 2020)

Conditions de formation d'AOS	Paramètres d'exposition	Modèles cellulaires	Contrôles	Evaluation toxicologique	Réf
COV : Mésitylène, α-pinène **Système :** Chambre de simulation atmosphérique **Réactivité :** OH + O_3 + lampes 254 et 185 nm + PM support **Temps de résidence :** NR **Température et humidité :** 60 – 75 % HR **[COV] :** NR **[AOS] générées :** (1) 73 – 192 µg/m^3 (∅85 – 120 nm) ; 17 – 38 µg/m^3 (∅35 – 50 nm) et (1) 116 – 279 µg/m^3 (∅85 – 120 nm) et 77 – 351 µg/m^3 (∅35 – 50 nm)	**Système ALI :** NACIVT **Débit d'exposition :** NR **Durée d'exposition :** 1 h **Augmentation du dépôt :** Non **Conditionnement de l'aérosol :** 37 °C, 85 –95 % HR, 5 % CO_2 **Dose déposée :** Voir tableau 1	**Modèle cellulaire :** Epithélium bronchique humain reconstitué **Habituation à l'ALI :** 28 jours **Confluence avant exposition :** complète	**Contrôles air :** Air filtré (HEPA) **Contrôles incubateur :** Oui **Présentation graphique des contrôles :** Contrôles incubateur présentés. Résultats comparés avec contrôles air pour LDH, contrôles air comparés avec AOS pour protéomique	**Paramètres biologiques :** 24 h post exposition, Dosage LDH et analyse protéomique de 102 chemokines et cytokines **Effets des AOS :** ↗ Cytotoxicité en lien avec ↗ de la taille de la fraction exposée + régulation positive de beaucoup de cytokines **Effets de l'air :** Non	(Leni et al., 2022)
COV : (1) β-pinène, (2) Naphtalène **Système :** PAM-OFR **Réactivité : OH + O_3 + lampes 185 nm + 254 nm** **Temps de résidence :** 113 secondes **Température et humidité :** 40 % HR, 40 (1) – 60 (2) °C **[COV] :** (1) 6,0 ± 0,6 ppmv, (2) 5,4 ± 0,3 ppmv **[AOS] générées:** 4 mg/m^3	**Système ALI :** VitroCell® AES **Débit d'exposition :** 100 mL/min **Durée d'exposition :** 4 h **Augmentation du dépôt :** Non **Conditionnement de l'aérosol :** 39,5 °C, 85 % HR **Dose déposée :** 17 ± 2 (1), 28 ± 2 (2) ng/cm^2	**Modèle cellulaire :** A549, EA.hy926, A549/EA.hy926 **Habituation à l'ALI :** 48 h **Confluence avant exposition :** Confluence confirmée	**Contrôles air :** Filtre HEPA + dénudeurs **Contrôles incubateur :** Oui **Présentation graphique des contrôles :** Pas de comparaison avec les contrôles incubateurs	**Paramètres biologiques :** 4 h post exposition Viabilité (PRrestoBlue™), dosage LDH, dosage MDR (LC-MS/MS), test des comètes, sécrétion IL-8 et angiogenèse **Effets des AOS :** (2) ↗ IL-8, MDA, dommage à l'ADN et angiogenèse, effets moins prononcés avec (1) **Effets de l'air :** NR	(Offer, Hartner, Di Bucchianico, et al., 2022)

Conditions de formation d'AOS	Paramètres d'exposition	Modèles cellulaires	Contrôles	Evaluation toxicologique	Réf
COV : (1) β-pinène, (2) Naphtalène, sur particules de suie **Système :** PAM-OFR **Réactivité :** OH + O_3 + lampes 185 nm + 254 nm **Temps de résidence :** 113 secondes **Température et humidité :** 40 % HR, 40 (1) – 60 (2) °C **[COV] :** (1) 6,0 ± 0,6 ppmv, (2) 5,4 ± 0,3 ppmv **[AOS] générées :** 4 mg/m^3	**Système ALI :** VitroCell® AES **Débit d'exposition :** 100 mL/min **Durée d'exposition :** 4 h **Augmentation du dépôt :** Non **Conditionnement de l'aérosol :** 39,5 °C, 85 % HR **Dose déposée :** 5,6 (1), 9,3 (2) ng/cm^2	**Modèle cellulaire :** BEAS-2B **Habituation à l'ALI :** 4 jours **Confluence avant exposition :** NR	**Contrôles air :** AOS + Filtre HEPA **Contrôles incubateur :** Oui **Présentation graphique des contrôles :** Pas de comparaison avec contrôles incubateur	**Paramètres biologiques :** Viabilité (PrestoBlue™), séquençage ARNm, dosage sécrétion CXCL11/I-TAC, IFNγ, IL-12p70, IL-1b, IL-23, IL-6, IL-8 et TNF-α, dosage MDA, test des comètes (dommage ADN) **Effets des AOS :** (1) 725 gènes dérégulés, faible inflammation (2) ↘ Viabilité dose dépendant, 986 gènes dérégulés (voies de signalisation de l'inflammation, du can, du cycle cellulaire et de la prolifération, de la réponse au stress oxydant), Activation de la voie NRF2, surexpression AhR et CYP1A1, activité ROS **Effet de l'air :** NR	(Pardo et al., 2022)
COV : (1) β-pinène, (2) Naphtalène sur particules support de suie **Système :** PAM-OFR **Réactivité :** OH + O_3 + lampes 185 nm + 254 nm **Temps de résidence :** 113 secondes **Température et humidité :** 40 % HR, 40 (1) – 60 (2) °C **[COV] :** (1) 6,0 ± 0,6 ppmv, (2) 5,4 ± 0,3 ppmv **[AOS] générées :** 4 mg/m^3	**Système ALI :** VitroCell® AES **Débit d'exposition :** 100 mL/min **Durée d'exposition :** 4 h **Augmentation du dépôt :** Non **Conditionnement de l'aérosol :** 39,5 °C, 85 % HR **Dose déposée :** 17 ± 2 (non dilué) et 0,6 ng/cm² (1:30 dilution) (1), 28 ± 2 ng/cm^2 (non dilué) et 0,9 ng/cm² (1:30 dilution) (2)	**Modèle cellulaire :** A549/EA.hy926 **Habituation à l'ALI :** 48 h **Confluence avant exposition :** Confluence confirmée	**Contrôles air :** Oui **Contrôles incubateur :** Oui **Présentation graphique des contrôles :** Résultats comparés aux contrôles air	**Paramètres biologiques :** Directement post exposition, séquençage (RNAseq), métabolomique avec GC/MS, sécrétion des cytokines CXCL11/I-TAC, IFNγ, IL12p70, IL-1β, IL-23, IL-6, IL-8 et TNF-α **Effets des AOS :** Dérégulation des voies de signalisations liées au stress oxydant, aux réponses inflammatoires, remodelage des voies respiratoire, stress et maladie cardiovasculaire, cassures de l'ADN, augmentation du potentiel angiogénique. Les analyses protéomiques ont montré l'induction d'un état (pro)-inflammatoire systémique **Effets de l'air :** NR	(Offer et al., 2024)

*NR : Non rapporté

**NA : Non applicable

Cette synthèse met en évidence la grande hétérogénéité de génération des AOS mais aussi des modèles cellulaires, des systèmes d'exposition en ALI et des paramètres expérimentaux utilisés pour étudier leur toxicité, rendant difficile la comparaison des résultats inter-études. Plusieurs verrous scientifiques majeurs émergent de l'analyse comparative des études disponibles :

- La majorité des travaux reposent sur la lignée bronchique BEAS-2B, qui ne représente pas l'épithélium alvéolaire distal. Les modèles les plus avancés incluent des cocultures telles que les lignées A549 et EA.hy926. Néanmoins, ces systèmes cellulaires ne reproduisent pas la complexité de l'épithélium alvéolaire humain, notamment en l'absence de PT1. À ce jour, aucun modèle alvéolaire pleinement caractérisé n'a été exposé en ALI aux AOS.

- Les durées d'exposition rapportées demeurent limitées, n'excédant généralement pas 4 à 6 heures. Les expositions prolongées, pourtant plus représentatives de situations environnementales chroniques ou répétées, restent rares voire inexistantes.

- L'impact biologique du flux d'air seul, pourtant susceptible d'induire des réponses mécanosensibles, un stress oxydant et une réponse inflammatoire basale, n'est pas systématiquement évalué lorsque les expositions dépassent une heure pouvant compliquer l'interprétation des effets attribués aux AOS.

- Les concentrations d'AOS générées sont éloignées des concentrations rencontrées en air ambiant et les doses réellement appliquée sur les cellules sont donc éloignées d'une exposition réelle. Cela soulève la question de la pertinence et de la transposabilité environnementale des résultats obtenus. De plus, la dose effectivement déposée sur les cellules n'est pas systématiquement déterminée. L'absence de mesure ou d'estimation des quantités déposées sur les cellules complique toute comparaison inter-études et limite l'interprétation toxicologique en termes de relation dose-réponse.

- Les caractéristiques physico-chimiques des AOS étudiés sont encore rapportées de manière parcellaire et hétérogène selon les études. Les concentrations initiales en COV utilisées pour générer les AOS, ainsi que les concentrations effectivement produites en phase particulaire, ne sont pas systématiquement renseignées. De plus, la

caractérisation physico-chimique des aérosols et des gaz associés demeure souvent incomplète, avec des informations limitées concernant la distribution granulométrique, la densité, la morphologie, la composition chimique ou encore la composition de la phase gazeuse. Cette variabilité limite la compréhension des relations entre propriétés physico-chimiques et réponses biologiques.

Au-delà des aspects méthodologiques, la littérature révèle également des lacunes concernant les types de précurseurs étudiés pour la génération des AOS en ALI. Les émissions issues de la combustion de biomasse comprennent une grande diversité de composés organiques, incluant notamment des hydrocarbures aromatiques monoaromatiques, des HAP, des composés phénoliques et des furannes. Pourtant, les études disponibles en ALI se concentrent majoritairement sur un nombre restreint de précurseurs, principalement des terpènes biogéniques (α-pinène, β-pinène, limonène, isoprène) ou quelques composés aromatiques simples tels que le naphtalène ou le mésitylène. Par ailleurs, la majorité des travaux repose sur des AOS générés par oxydation diurne impliquant le radical hydroxyle (OH) ou l'ozone (O_3), tandis que la chimie nocturne gouvernée par le radical nitrate (NO_3) demeure non explorée. Cette lacune apparaît particulièrement critique dans le contexte des émissions issues du chauffage au bois, majoritairement utilisées en période hivernale et nocturne.

Ainsi, l'analyse de la littérature met en évidence des lacunes méthodologiques et conceptuelles majeures et donc un besoin de (i) développer un modèle alvéolaire *in vitro* pertinent, pleinement caractérisé et adapté aux expositions prolongées en ALI, (ii) d'harmoniser les pratiques expérimentales en caractérisant finement les réponses biologiques induites par le flux d'air, et (iii) d'évaluer, dans ce cadre méthodologique maîtrisé, la toxicité des AOS issus de d'oxydation de précurseurs majoritairement émis par la combustion de biomasse pour différentes conditions de réactivité (e.g., chimie diurne et nocturne).

Ces constats structurent directement le présent travail de thèse. Dans un premier temps, le développement et la caractérisation d'un modèle alvéolaire *in vitro* physiologiquement pertinent, compatible avec les expositions ALI prolongées (24 à 72 h), ont été entrepris afin de répondre aux limites liées aux modèles cellulaires existants. Dans

un deuxième temps, une attention particulière a été portée à la maîtrise et à la caractérisation fine des conditions d'exposition, notamment l'impact du flux d'air, afin de garantir une interprétation toxicologique robuste et reproductible. Enfin, dans ce cadre méthodologique maîtrisé, la toxicité d'AOS issus de la combustion de biomasse, incluant des précurseurs aromatiques tels que les HAP et le phénol, seuls ou en mélange, encore peu étudiés, a été évaluée en améliorant la représentativité atmosphérique et la pertinence environnementale des données produites.

Chapitre 3 – Matériels et méthodes

Chapitre 3 – Matériels et méthodes

3.1. Matériels biologiques

Deux lignées cellulaires étaient utilisées et cultivées en routine dans un incubateur à 37 °C saturé en humidité et à 5 % de CO_2. Les cellules épithéliales alvéolaires humaines (hAELVi, InScreenEx : INS-CI-1015), immortalisées par lentivirus, étaient fournies par InSCREENeX GmbH (Braunschweig, Allemagne). Elles étaient cultivées sur une solution de revêtement huAEC dans un milieu de culture cellulaire synthétique défini huAEC (InSCREENeX GmbH, Brunswick, Allemagne) additionné de 1 % (v/v) de pénicilline/streptomycine (Gibco® – Sigma-Aldrich – Merck, Darmstadt, Allemagne). Les cellules épithéliales d'adénocarcinome pulmonaire humain (A549, numéro ATCC : CCL-185™) étaient fournies par Sigma-Aldrich – Merck (Darmstadt, Allemagne) et cultivées dans du milieu RPMI 1640 (Gibco® – Sigma-Aldrich – Merck, Darmstadt, Allemagne) additionné de 10 % (v/v) de sérum de veau fœtal (SVF) inactivé par la chaleur (65 °C pendant 60 min) (Gibco® – Sigma-Aldrich – Merck, Darmstadt, Allemagne) et de 1 % (v/v) de pénicilline/streptomycine (Gibco® – Sigma-Aldrich – Merck, Darmstadt, Allemagne). Pour chacune des deux lignées cellulaires, les cellules utilisées avaient subi moins de 20 passages. Les passages étaient effectués lorsque les cellules atteignaient une confluence de 80 à 90 % dans des flasques T75 (flacons de culture cellulaire TRP, Suisse), avec 0,05 % (v/v) de trypsine-EDTA (Gibco® – Sigma-Aldrich – Merck, Darmstadt, Allemagne). Chaque suspension de cellules était récupérée séparément dans une solution de PBS supplémentée avec 10 % (v/v) de sérum de veau fœtal inactivé par la chaleur (65 °C pendant 60 min) et 1 % (v/v) de pénicilline/streptomycine permettant l'inactivation de la trypsine.

Après centrifugation, les cellules A549 et hAELVi étaient remises en suspension dans du milieu de culture supplémenté en vue de leur comptage. Le comptage cellulaire était réalisé à l'aide d'un Cellometer® selon les recommandations du fabricant, permettant ainsi de calculer les nombres de cellules et leurs viabilités respectives. Un test de dépistage des mycoplasmes était réalisé mensuellement (kit de contrôle MycoAlert™, Lonza, Rockland, ME, États-Unis).

3.2. Développement et caractérisation d'un modèle cellulaire d'épithélium alvéolaire pour l'exposition en IAL

Deux modèles *in vitro* dérivés des lignées cellulaires A549 et hAELVi ont été développés et caractérisés. Le premier modèle (A549 – AR) consiste en une optimisation de la culture de la lignée cancéreuse A549 en ALI par la supplémentation de son milieu nutritif en acide rétinoïque (AR), afin de stabiliser sa prolifération et son phénotype épithélial. Le second modèle (A549 – hAELVi) correspond à une coculture des lignées A549 et hAELVi cultivées en ALI, visant à reproduire plus fidèlement l'architecture et les fonctions de l'épithélium alvéolaire humain.

3.2.1. Développement et mise en place du modèle d'épithélium alvéolaire

Les deux modèles ont été développés selon une méthodologie similaire. Les principales différences concernaient la composition du milieu de culture ainsi que le protocole d'ensemencement et de mise en ALI. Les sections suivantes détaillent ces spécificités.

3.2.1.1. Réactifs et préparation des milieux

Deux milieux de culture étaient utilisés : le RPMI 1640 (spécifique aux cellules A549) et le milieu huAEC (spécifique aux cellules hAELVi). Le milieu RPMI 1640 était supplémenté avec 10 % (v/v) de SVF inactivé par la chaleur (65 °C pendant 1 h) et 1 % (v/v) de pénicilline/streptomycine (RPMI complet). Le milieu huAEC était préparé conformément aux recommandations du fabricant et supplémenté avec 1 % (v/v) de pénicilline/streptomycine. Avant utilisation, les milieux étaient aliquotés dans des tubes Falcon® de 50 mL selon les besoins expérimentaux afin d'éviter la propagation des contaminations, et préchauffés à 37 °C pour préserver des chocs thermiques.

A549 – AR :

L'acide rétinoïque en poudre (99,9 % – R2625– Sigma-Aldrich – Merck, Darmstadt, Allemagne) était solubilisé dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) (99,9 % – 472301– Sigma-Aldrich – Merck, Darmstadt, Allemagne) et du DPBS (Gibco® – Sigma-Aldrich – Merck,

Darmstadt, Allemagne) afin d'obtenir une solution mère concentrée à 3×10^{-3} M. La solution d'AR était ensuite diluée par un facteur trois avec du DPBS pour obtenir une concentration intermédiaire de 1×10^{-3} M puis aliquotée et conservée à -20 °C à l'abri de la lumière. Le milieu de culture RPMI 1640 complet était ensuite supplémenté avec la solution d'AR pour obtenir des concentrations finales de 1, 10 ou 20 µM d'AR. La quantité finale de DMSO dans le milieu était largement inférieur à 0,1 % donc considérée comme compatible avec la culture des cellules épithéliales.

Finalement, lors du passage, les cellules étaient re-suspendues dans du milieu RPMI 1640 frais à différentes concentrations d'AR (0, 1, 10 ou 20 µM) puis comptées avant d'être ensemencées.

A549 – hAELVi :

Pour la coculture, les deux lignées étaient cultivées séparément puis re-suspendues dans du milieu huAEC ou RPMI 1640 complet au moment de l'ensemencement pour permettre d'étudier leur comportement permettant de déterminer le milieu final. Une fois le milieu nutritif collectif choisi, chaque lignée était ensemencée dans du milieu huAEC frais afin d'assurer la compatibilité avec les cellules hAELVi et la stabilité du modèle en ALI.

3.2.1.2. Monoculture 2D

Des monocultures en 2D étaient réalisées afin d'évaluer la croissance cellulaire des lignées dans les différents milieux testés. Les cellules A549 et hAELVi étaient ensemencées dans des plaques 12 puits (Falcon® – ThermoFisher Scientific) a une faible densité de 2×10^4 cellules/puits, en triplica, dans les milieux suivants : huAEC, RPMI 1640, RMPI 1640 supplémenté avec 1, 10 ou 20 µM d'AR. La densité d'ensemencement était déterminée préalablement afin d'obtenir une croissance optimale sans décollement cellulaire. Les cellules étaient observées quotidiennement (section 3.4.3.1.1.). Chaque jour, trois puits par condition étaient analysés et comptés pour établir les courbes de croissance.

3.2.1.3. Mono- et coculture en interface air-liquide

Monoculture :

Les lignées cellulaires étaient ensemencées individuellement à confluence à une densité de 1,1 × 10^5 cellules/cm² sur des inserts Transwell® 6 puits (Corning 3450 ; membrane en polyester ; surface de croissance : 4,67 cm², épaisseur : 10 µm, taille des pores : 0,4 µm, densité : 4 × 10^6 pores/cm²). Un volume de 1 mL de suspension cellulaire était déposé dans le compartiment apical et 1,5 mL de milieu de culture dans le compartiment basolatéral de l'insert. Les inserts étaient préalablement traités avec 500 µL de solution de coating (revêtement) pendant 2 h à 37 °C sous saturation d'humidité et 5 % de CO_2, puis rincés au PBS. Après 24 h d'incubation, l'adhésion des cellules à la membrane était vérifiée par microscopie optique. Le milieu apical était ensuite retiré afin d'initier la mise en ALI. Les cellules étaient lavées avec du tampon $HBSS^{++}$ supplémenté en Mg^{2+} et Ca^{2+} (Gibco® - Sigma-Aldrich – Merck, Darmstadt, Allemagne) pour débuter l'habituation à l'ALI. Deux durées d'habituation à l'ALI étaient étudiées pour l'établissement du modèle de coculture :

- Modèle court terme avec 24 h en ALI
- Modèle long terme avec 6 jours en ALI

A l'issue de cette période, les cellules étaient soit exposées à l'air propre (condition « AIR »), soit maintenues à l'incubateur (condition « INCUB »).

Coculture (A549 – hAELVi) :

Après le décollement cellulaire, les lignées étaient mélangées afin d'obtenir une proportion de 60 % de cellules de type PT2 (représentées par les A549) et 40 % de type PT1 (représentées par les cellules hAELVi), proportion reflétant l'organisation de l'épithélium alvéolaire humain *in vivo* (Mason and Crystal, 1998). Après homogénéisation, les cellules étaient ensemencées à confluence (1,1 × 10^5 cellules/cm^2) sur des inserts Transwell® six puits, puis mises en ALI selon les mêmes conditions que celles décrites pour les monocultures. La coculture était maintenue dans le milieu huAEC. Ce choix repose sur des essais préliminaires montrant que la lignée A549 présentait une croissance plus lente dans

le milieu huAEC que dans le milieu RPMI, permettant ainsi de préserver le ratio cellulaire initial au cours du temps (Figure 3. 1). En milieu RPMI, les vitesses de prolifération des deux lignées différaient significativement, au profit des cellules A549, entraînant une dérive significative du ratio cellulaire, tandis qu'en milieu huAEC, les croissances respectives des deux lignées cellulaires étaient comparables.

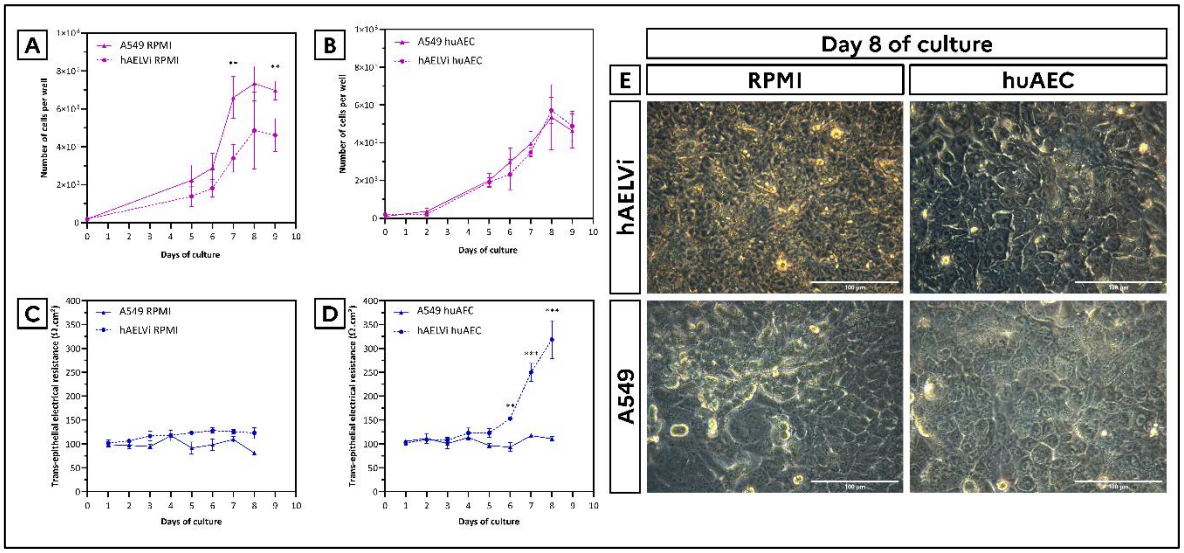


Figure 3. 1 : Croissance des lignées cellulaires A549 et hAELVi dans les milieux de culture RPMI et huAEC. À partir du cinquième jour de culture, les cellules ont été comptées afin d'établir des courbes de croissance en fonction du temps : (A) Croissance cellulaire dans le milieu RPMI 1640, (B) Croissance cellulaire dans le milieu huAEC. À partir du deuxième jour de culture, la résistance transépithéliale (TEER) a été mesurée quotidiennement selon le protocole décrit en section 3.2.3.4.1. (C) Croissance cellulaire dans le milieu RPMI, (D) Croissance cellulaire dans le milieu huAEC. La ligne continue représente la lignée cellulaire A549 et la ligne pointillée, la lignée cellulaire hAELVi. Les données présentées ici correspondent aux valeurs moyennes ± écart-type (n = 9) issues de trois expériences indépendantes (**p < 0,01, ***p < 0,001). (E) Au huitième jour de culture, des photos des monocultures ont été réalisées avec un grossissement de × 200.

3.2.2. Optimisation de l'exposition du modèle cellulaire à l'ALI

Deux systèmes d'exposition dynamique étaient utilisés. Le premier est un module VitroCell® 6 PT-CF (VitroCell®, Gutach, Allemagne) qui était utilisé pour caractériser le modèle en exposant les mono- et cocultures à de l'air propre. Le deuxième est un système

à flux radial Cultex® RFS (Cultex® Technology GmbH, Hanovre, Allemagne) qui était utilisé pour exposer la coculture à de l'air propre ou à des AOS pendant 8, 24 et 72 h afin d'évaluer l'impact d'une exposition dynamique prolongée. L'utilisation successive de ces deux systèmes d'exposition dynamique permettait également d'évaluer la robustesse et la reproductibilité du modèle de coculture dans des conditions expérimentales distinctes.

3.2.2.1. Conditions de l'exposition à l'air

L'air propre était obtenu par pompage de l'air ambiant du laboratoire, puis traité en traversant successivement un filtre à charbon actif (Carbon activated, Chem-Lab, #CL00.1101.1000) puis un filtre à particules (TSI, HEPA Capsule Filter, #1602051) avant d'entrer dans les systèmes ALI. L'humidité relative (HR) et la température de la salle étaient régulées respectivement entre à 30-45 % et 22 ± 0,5 °C. La température des modules était maintenue à 37 °C à l'aide d'un bain-marie à recirculation thermostatique. Le débit d'air entrant au niveau de chaque insert était ajusté à 10 mL/min et enrichi en CO_2 afin d'obtenir une concentration finale d'environ 5 % (v/v). L'intégration du CO_2 dans le flux d'air entrant permettait de reproduire plus fidèlement le microenvironnement alvéolaire humain, caractérisé par une concentration typique de CO_2 de 5 à 6 % (v/v) (Krogh and Lindhard, 1914; Mackay, 1940; van den Velde et al., 2007; Bessaguet and Desmoulière, 2021). Cette condition contribuait également au maintien du pH physiologique du milieu cellulaire après le retrait des cellules de l'incubateur.

Trente min avant chaque exposition, du milieu de culture était ajouté dans chaque chambre du système VitroCell® ou du système Cultex®, préchauffé à 37 °C par le biais du système de circulation d'eau. L'exposition des cellules était initiée uniquement à partir du moment où la température, l'humidité et le flux d'air étaient stabilisés (voir section 3.4.3.). Cette étape permettait à l'humidité d'atteindre un niveau proche de la saturation dans les chambres d'exposition par auto-humidification. Ainsi, après 30 min de stabilisation, les inserts contenant les cellules cultivées étaient placés dans des chambres présentant une humidité relative d'environ 80 % et une température de 37 °C (Tsoutsoulopoulos et al., 2016). Ces résultats étaient également contrôlés expérimentalement dans le cadre de ce travail de thèse (voir section 3.4.3.6.). Dans ces conditions, le tapis cellulaire n'était ni exposé à un risque de dessiccation ni impacté par la formation de gouttelettes de

condensation. Les débits d'air étaient vérifiés avant et à la fin de chaque expérience à l'aide d'un débitmètre massique (GMF, Analytique, #GMFS - 010449). Les cellules étaient soit exposées à l'air propre (condition « AIR » ou « CLEAN AIR ») soit maintenues dans l'incubateur (condition « INCUB ») à 37 °C et 5 % de CO_2, servant de contrôles négatifs de l'exposition en ALI.

3.2.2.2. Exposition ALI avec le système VitroCell®

Le dispositif d'exposition en ALI VitroCell® et le protocole associé étaient décrits en détail précédemment (Loret et al., 2016). Pour étudier les modifications physiologiques des lignées cellulaires induites par l'exposition à l'air, le système VitroCell® était directement alimenté en air propre (condition « AIR »). Pour chaque exposition, 17 mL de milieu de culture préchauffé étaient ajoutés dans le compartiment basolatéral des modules. Des inserts contenant des cellules A549, hAELVi ou la coculture étaient exposés pendant 24 h dans trois modules fonctionnant en parallèle. Trois inserts par module étaient exposés (n = 3 inserts/condition), et trois expériences ont été réalisées de manière indépendante.

3.2.2.3. Exposition ALI avec le système Cultex®

Le dispositif d'exposition ALI Cultex® ainsi que le protocole d'exposition à l'air propre étaient décrits en détail précédemment (Tsoutsoulopoulos et al., 2019). Les conditions définies lors de la caractérisation du modèle avec le système VitroCell® étaient transposées à des expositions de 8, 24 et 72 h avec le système Cultex®. Les inserts de coculture étaient exposés dans deux modules en parallèle. Trois inserts par module étaient utilisés (n = 3 inserts/condition), et trois expériences étaient réalisées de manière indépendante. Chaque insert reposait sur 24 mL de milieu de culture placé dans le compartiment basolatéral du module d'exposition. Les chambres du système ALI, incluant le compartiment contenant le milieu et le compartiment aérien délivrant l'aérosol, étaient équipées de sondes de température et d'humidité permettant un suivi continu des paramètres expérimentaux (voir section 3.4.3.6).

3.2.3. Caractérisation biologique du modèle cellulaire

3.2.3.1. Etudes morphologiques et organisationnelles par immunomarquage et coloration

En complément de la surveillance de la morphologie du tapis cellulaire par microscopie optique, des observations étaient réalisées après marquage direct par des fluorophores ou immunomarquage. Elles permettaient de mettre en évidence l'expression de marqueurs alvéolaires spécifiques ainsi que l'organisation des lignées cellulaires sur les inserts.

3.2.3.1.1. Immunomarquage

Après 24 h d'exposition, le milieu basolatéral était retiré et les inserts étaient lavés avec du PBS, puis fixés à l'aide d'une solution de paraformaldéhyde (*PFA*) à 4 % (v/v) pendant 10 min à température ambiante. Le PFA était ensuite éliminé par trois lavages consécutifs au tampon Tri-buffered saline (TBS). A ce stade, les inserts pouvaient être conservés à 4 °C jusqu'à utilisation. Les membranes des inserts étaient ensuite découpées en quatre parties égales. Les cellules étaient perméabilisées et les sites de fixation non spécifiques bloqués pendant 1 h à température ambiante, avec une solution de blocage composée de 10 % (*v*/v) de FBS ; 0,2 % (v/v) de Triton X-100 et 2 % (m/m) d'albumine sérique bovine (BSA) dilué dans du TBS. Les membranes étaient ensuite incubées avec les anticorps primaires spécifiques, dilués dans la solution de blocage (Tableau 3. 2.). Après trois lavages au TBS, elles étaient incubées avec les anticorps secondaires appropriés, dilués dans une solution contenant 10 % (v/v) de FBS et 2 % (v/v) de BSA dans du TBS (Tableau 3. 2). Pour la coloration nucléaire, les membranes étaient lavées trois fois avec du TBS puis incubées avec du DAPI (dilution 1:5000) pendant 2 min. Enfin, les membranes étaient lavées trois fois avec du TBS puis une fois avec de l'eau distillée avant d'être montées sur lame et lamelle avec un milieu de montage Fluoromount-G™ (Thermo Fisher, # 00–4958-02). Des témoins négatifs étaient réalisés en parallèle (voir section 3.4.4.1.).

3.2.3.1.2. Marquage fluorescent à la quinacrine

La quinacrine est un marqueur fluorescent présentant des propriétés différentes selon l'état cellulaire. Dans les cellules mortes, elle présente une affinité pour les acides nucléiques et marque l'ADN et l'ARN en vert (Comings et al., 1975; Caspersson et al., 1999). Dans les cellules vivantes, la quinacrine marque spécifiquement les compartiments intracellulaires acides (notamment les vésicules et lysosomes), sans fluorescence détectable au niveau des noyaux ou des nucléoles (Pierzyńska-Mach et al., 2014; Lee et al., 2018).

A l'issue des expositions en ALI et après réalisation des analyses prévues, les inserts étaient lavés deux fois avec du PBS. Un volume de 500 µL d'une solution de Quinacrine (Quinacrine dihydrochloride – Sigma-Aldrich – Merck, Darmstadt, Allemagne) à 50 µM, dilué dans du PBS était appliquée et incubée 10 min à 37 °C. Les inserts étaient ensuite lavés trois fois au PBS. Les cellules étaient alors fixées avec une solution de PFA à 4 % (v/v) pendant 10 min à TA. Après trois lavages avec du TBS, les inserts pouvaient être conservés à 4 °C jusqu'à utilisation. Une solution de DAPI (dilution 1:5000) était ensuite appliquée pendant au moins 15 min afin de permettre la pénétration du colorant dans la région nucléaire. Aucune perméabilisation membranaire n'était nécessaire. Les membranes des inserts étaient découpées en deux parties, puis lavées trois fois avec du TBS et une fois avec de l'eau distillée avant montage entre lame et lamelle avec le milieu Fluoromount-G™.

Tableau 3. 1 : Couplage, protocole et spécificités des anticorps utilisés pour les immunomarquages.

Anticorps primaires

	Co-marquage 1		**Co-marquage 2**	
Marqueurs	Human Lung AT1, 56 kDa (HT1-56)	Human Lung AT2, 280 kDa (HT2-280)	Podoplanin (PDPN)	Aquaporin 5 (AQP5)
	AT1-specific transmembrane protein	AT2-specific transmembrane protein	AT1-specific transmembrane protein	Water transporter AT1-specific
Espèce hôte	Mouse / IgG1	Mouse / IgM	Goat / IgG	Rabbit / IgG
Espèce cible	anti-human	anti-human	anti-human	anti-human
Dilution	1:150	1:150	1:500	1:500
Incubation	30 min à température ambiante	30 min à température ambiante	Toute la nuit à +4°C	Toute la nuit à +4°C
Fabricant	Terrace Biotech	Terrace Biotech	R&D Systems	Novusbio
Référence	TB-29AHTI-56	TB-27AHT2-280	AF3244	NBP2-39043

Anticorps secondaires

Marqueurs	Alexa Fluor™ 633	Alexa Fluor™ 488	Secondary Antibody 680	Alexa Fluor™ Plus 488
	Deep red	Green	Deep red	Green
Hôte	Goat	Goat	Donkey	Goat
Espèce cible	Anti-mouse IgG1	Anti-mouse IgM	Anti-goat IgG	Anti-rabbit IgG
Dilution	1:500	1:500	1:1000	1:1000
Incubation	30 min à température ambiante	30 min à température ambiante	2 h à température ambiante	2 h à température ambiante
Emission	650	520	704	520
Excitation	631	499	687	499
Fabricant	Thermo Fisher	Thermo Fisher	Thermo Fisher	Invitrogen
Référence	A-21126	A-21042	A32860	AB_2633280

3.2.3.2. Cytotoxicité

La lactate déshydrogénase (LDH) est une enzyme cytosolique libérée dans le milieu extracellulaire lors d'une altération de l'intégrité membranaire. La quantification de la LDH extracellulaire constitue ainsi un indicateur de cytotoxicité et de perméabilisation membranaire. La LDH libérée était mesurée dans le compartiment apical des inserts pour l'ensemble des conditions expérimentales. Les tapis cellulaires étaient rincés avec 500 µL de milieu de culture préchauffé. Ensuite, 3 × 100 µL du milieu de rinçage étaient collectés et transférés dans une plaque 96 puits à fond noir (100 µL/puits). Le reste du volume de rinçage était aliquoté dans des plaques 96 puits et conservé à -80 °C pour le dosage de cytokines (voir section 3.2.3.6.). L'activité LDH extracellulaire était déterminée à l'aide du kit CytoTox-ONE (G7890, Promega Corporation, Madison, USA), selon les recommandations du fabricant. La fluorescence était mesurée à l'aide d'un lecteur de microplaques multimode (Varioskan™ LUX, Thermo Fisher scientific, Waltham, États-Unis) avec une longueur d'onde d'excitation de 560 nm et d'émission de 590 nm. Les valeurs obtenues étaient normalisées par rapport au contrôle positif (Triton X-100 à 1 % (v/v), correspondant à une libération maximale de LDH, et exprimées en pourcentage de cytotoxicité (voir section 3.4.4.2.).

3.2.3.3. Activité métabolique

Le test PrestoBlue™ (A13262, Thermo Fischer Scientific) repose sur la réduction intracellulaire de la résazurine en résorufine fluorescente par les enzymes mitochondriales. L'intensité du signal fluorescent est proportionnelle à l'activité métabolique des cellules viables. Après lavage des cellules, le milieu basolatéral était remplacé et les cellules étaient incubées pendant 1 h à 37 °C, 5 % (v/v) de CO_2, en atmosphère saturée en humidité. La solution PrestoBlue™ a été diluée à 10 % (v/v) dans le milieu de culture correspondant. A l'issue de l'incubation, 3× 200 µL du milieu basolatérale contenant le PrestoBlue™ métabolisé étaient transférés dans une plaque 96 puits à fond noir. La fluorescence était mesurée à l'aide du lecteur Varioskan™ LUX (λ excitation : 550 nm ; λ émission : 590 nm). Les résultats étaient normalisés par rapport aux témoins négatifs (INCUB ou AIR selon l'expérience) et exprimés en pourcentage d'activité métabolique relative.

3.2.3.4. Propriétés de barrière

3.2.3.4.1. Résistance trans-épithéliale (TEER)

La résistance électrique transépithéliale (TEER) était mesurée à l'aide d'un volt-ohmmètre EVOM™ 3 (WPI, Sarasota, USA) afin d'évaluer l'intégrité des jonctions serrées et l'intégrité du tapis cellulaire. Les milieux de culture apicaux et basolatéraux étaient remplacés par de l'HBSS^{++} (avec Ca^{2+} et Mg^{2+}, Gibco – Sigma Aldrich, Darmstadt, Allemagne). Afin d'éviter les variations liées à la température et aux flux d'ions, les inserts étaient incubés à température ambiante pendant 15 à 30 min avant lecture (Srinivasan et al., 2015). Trois inserts, non ensemencés avec des cellules mais traités de la même manière, étaient utilisés comme blancs. Les valeurs de TEER ($\Omega.cm^2$) étaient calculées selon l'équation suivante :

$$TEER = (R_C - R_B) \times A$$

Avec :

TEER = Résistance transépithéliale ($\Omega.cm^2$)

R_C = Résistance mesurée pour la condition testée (Ω)

R_B = Résistance mesurée pour le blanc (Ω)

A = Surface de l'insert (cm^2).

3.2.3.4.2. Coefficient de perméabilité apparent : P_app

Pour compléter l'évaluation des propriétés de barrière, un test de perméabilité au jaune lucifer (Lucifer Yellow) était réalisé immédiatement après la mesure de la TEER. Une solution de Lucifer Yellow (Sigma Aldrich, Darmstadt, Allemagne) était préparée à 100 µM dans de l'HBSS^{++} et ajoutée au compartiment apical (donneur) de l'insert. Le compartiment basolatéral (receveur) recevait seulement de l'HBSS^{++}. Les inserts étaient ensuite incubés 1 h à 37 °C, 5 % (v/v) de CO_2 dans une atmosphère saturée en humidité. Après incubation, 150 µL du compartiment basolatéral et 50 µL étaient transférés dans une plaque 96 puits à fond noir complété avec de l'HBSS^{++} pour un volume final de 200 µL/puits. Chaque

échantillon était déposé en triplica. La fluorescence était mesurée (λ excitation : 424 nm ; λ émission :540 nm) à l'aide du lecteur Varioskan™ LUX. La quantification était réalisée à partir d'une courbe d'étalonnage en six points (0,01 à 50 µg/mL), préparée par dilution gravimétrique ($r^2 > 0,995$, régression linéaire). La concentration totale de Lucifer Yellox était vérifiée en additionnant les quantités mesurées dans les compartiments apicaux et basolatéraux. Le coefficient de perméabilité apparent (P_app) était calculé en cm/s selon l'équation suivante :

$$P_app = \frac{C_b \times V_b}{A \times C_i \times t}$$

Avec :

P_app = Coefficient de perméabilité apparent (cm/s)

C_b = Concentration basolatérale mesurée (µg/mL)

V_b = Volume basolatéral (mL)

A = Surface de l'insert (cm^2)

Ci = Concentration initiale apicale (µg/mL)

t = Temps d'incubation (s)

3.2.3.5. Etude de l'expression des gènes par RT-qPCR

Afin d'évaluer les variations d'expression génique en mono- et en coculture, les ARN totaux étaient extraits à partir de lysats cellulaires collectés séparément pour chaque condition expérimentale. Les niveaux d'expression des gènes cibles (Tableau 3. 3.) étaient analysés par réaction en chaîne par polymérase quantitative après transcription inverse (RT-qPCR).

Extraction des ARN :

Immédiatement après l'exposition, 700 µL de réactif de lyse QIAzol® (QIAGEN) étaient ajoutés dans le compartiment apical des inserts. Les cellules étaient ensuite

homogénéisées, puis les lysats collectés et conservés à -80 °C jusqu'à extraction. Les ARN totaux étaient extraits et purifiés sur colonnes à l'aide du kit miRNeasy Mini Handbook (217 004, QIAGEN), conformément aux recommandations du fabricant.

Synthèse des ANDc :

La synthèse d'ADNc était réalisée à partir des ARN totaux à l'aide du kit Hight Capacity cDNA Reverse Transcription KIT (4,374,967, Thermo Fischer Scientific), selon les instructions du fabricant. La réaction de transcription inverse était effectuée dans un thermocycleur (Applied Biosystems™ Thermocycleur SimpliAmp™, Fischer Scientific) selon le programme suivant : 10 min à 25 °C, 120 min à 37 °C, 5 min à 85 °C, 4 °C jusqu'à récupération des échantillons.

Amplification quantitative (qPCR) :

La qPCR était réalisée à l'aide du kit TaqMan™ Fast Advanced Master Mix (A44360, Thermo Fischer Scientific), selon les recommandations du fabricant. Chaque réaction, d'un volume total de 10 µL/puits, contenait : 5 µL de tampon d'analyse TaqMan™ Fast Advanced Master MIX (2×), 0,5 µL de sonde TaqMan™ spécifique, 2,5 µL d'eau ARNase, 2 µL d'ADNc dilué (1:2). Les réactions se sont déroulées en temps réel sur un système de détection StepOnePlus™ Real-Time PCR (Thermo Fisher Scientific). Le programme comprenait 40 cycles selon la programmation suivante : dénaturation de l'ADN à 95 °C (20 s), hybridation des amorces à 60 °C (3 s) et élongation à 72 °C (30 s). Les données d'amplification étaient analysées à l'aide du logiciel Thermo Fisher Scientific Cloud (Thermo-Fisher Scientific®).

Analyse des données :

La méthode du seuil de cycle comparatif (CT) permettait de calculer les niveaux d'expression des gènes d'intérêts (Schmittgen and Livak, 2008). Les niveaux d'expression des gènes d'intérêts étaient normalisés par rapport au gène de référence *RNA18S*. Les valeurs de CT supérieures à 36 étaient considérées comme non détectées (ND). L'analyse relative de l'expression génique a été réalisée selon la méthode du ΔΔCT. ΔCT, ΔΔCT et la quantification relative (RQ) ont été calculés et transformés en log(2) à l'aide des équations suivantes :

$$\Delta CT = CT_{gène\ d'intérêt} - CT_{gène\ de\ ménage}$$

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT_{gène\ d'intérêt} - \Delta CT_{contrôle}$$

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

Les résultats étaient exprimés en log(2) du facteur de variation, plus communément nommé « fold change » ou FC. Un gène était considéré comme différentiellement exprimé lorsque le log(2) du FC étaient ≤ à -1 (sous-expression) ou ≥ à 1 (surexpression) et que la *p*-value était inférieure à 0,05.

Tableau 3. 2 : Noms et fonctions des gènes étudiés et références des amorces utilisées pour les expériences de RTqPCR.

Abréviations	Noms complet	Identification	Fonction	Objectifs
RNA18S	*RNA ribosomal 18S*	Hs03928990_g	Gène de ménage	Contrôle
KRT14	*Keratin 14*	Hs00265033_m1	Kératinocyte	Marqueurs PT1 et PT2
AQP5	*Aquaporin 5*	Hs00387048_m1	Aquaporine	Marqueurs spécifiques des PT1
CAV1	*Caveolin 1*	Hs00971716_m1	Cavéoles	
PDPN	*Podoplanin*	Hs00366766_m1	Différenciation	
CDH1	*Cadherin 1*	Hs01023895_m1	Protéines d'adhésion	
I-CAM1	*Intercellular adhesion molecule 1*	Hs00164932_m1		
TJP1	*Tigh junction protein 1*	Hs01551871_m1		
SPA1	*Surfactant protein A1*	Hs00831305_s1	Protéines tensioactives	Marqueurs spécifiques des PT2
SPB	*Surfactant protein B*	Hs00167036_m1		
SPC	*Surfactant protein C*	Hs00951326_g1		
SPD	*Surfactant protein D*	Hs01108490_m1		
KEAP1	*Kelch-like ECH-associated protein 1*	Hs00202227_m1	Stress oxydatif	Activation de voies de signalisation cellulaires
NFE2L2	*Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2*	Hs00975961_g1		
HMOX1	*Heme oxygenase 1*	Hs01110250_m1		
SOD1	*Superoxide dismutase 1*	Hs00533490_m1		
AhR	*Aryl hydrocarbon receptor*	Hs00169233_m1	Détoxification	
AhRR	*Aryl hydrocarbon receptor repressor*	Hs01005075_m1		
CYP1A1	*Cytochrome P450 family 1 subfamily A member 1*	Hs01054796_g1		
CYP2E1	*Cytochrome P450 family 2 subfamily E member 1*	Hs00559367_m1		
TP53	*Tumor protein p53*	Hs01034249_m1	Cycle cellulaire	
MUC2	*Mucin 2*	Hs03005103_g1	Mucus (bronchique)	Synthèse du mucus
MUC5AC	*Mucin 5AC*	Hs01365616_m1		
MUCB	*Mucin B*	Hs00861595_m1		

3.2.3.6. Dosage de la sécrétion des cytokines TNF-α, IL-1β, IL-6 et IL-8

Les concentrations d'interleukine-1β (IL-1β), interleukine-6 (IL-6), interleukine-8 (IL-8) et facteur de nécrose tumorale α (TNF-α) étaient mesurées, après exposition, dans le milieu de rinçage du tapis cellulaire. Les quatre cytokines étaient dosées simultanément à l'aide du kit multiplex V-PLEX® Proinflammatory Panel 1 (Human) (Kit K15345D-2, Meso Scale Discovery, Royaume-Uni) conformément aux instructions du fabricant. Ce test repose sur une détection immunologique multiplexée par électro-chimiluminescence, permettant la quantification simultanée de plusieurs cytokines dans un même échantillon. Les échantillons et étalons étaient déposés dans des microplaques pré-revêtues d'anticorps spécifiques, incubés, puis révélés à l'aide d'un anticorps secondaire marqué par un composé électrochimiluminescent. Les microplaques étaient analysées à l'aide du lecteur MSD MESO QuickPlex SQ 120MM (Meso Scale Discovery). Les concentrations étaient calculées à partir des courbes d'étalonnage générées pour chaque cytokine à l'aide du logiciel Discovery Workbench (MSD). Les résultats ont été comparés à ceux obtenus après exposition au LPS (5 µg/mL), cette condition étant considéré comme un contrôle positif pour la réponse inflammatoire (LPS ; voir section 3.4.4.3.).

3.2.3.7. Dosage de la sécrétion de protéines du surfactant B et D

Les concentrations en protéines tensioactives SP-B et SP-D étaient déterminées dans les mêmes échantillons de rinçage apical que ceux utilisés pour la cytotoxicité et le dosage des cytokines. Les quantifications étaient réalisées à l'aide de kits ELISA commerciaux conformément aux recommandations du fabricant : Human Pulmonary Surfactant-Associated Protein B (SP-B) ELISA Kit et Human Pulmonary Surfactant Protein D (SP-D) ELISA Kit (Abbexa, Royaume-Uni). Les étalons ainsi que les échantillons étaient ajoutés dans des puits de microplaques pré-revêtus d'anticorps spécifiques et incubés afin de permettre la capture des antigènes. Les échantillons basaux (AIR et INCUB) n'étaient pas dilués tandis que les contrôles positifs LPS (5 et 20 µg/mL) et ZnO (1 et 2 mg/m^3) étaient dilués respectivement d'un facteur deux et quatre. Après lavage, un anticorps de détection conjugué à la peroxydase de raifort (HRP) était appliqué. La détection colorimétrique était réalisée en utilisant la tétraméthylbenzidine (TMB) comme substrat. La réaction enzymatique était arrêtée selon le protocole du kit, puis l'absorbance était mesurée à λ =

450 nm à l'aide du lecteur Varioskan™ LUX. Les courbes d'étalonnage étaient modélisées à l'aide du logiciel CurveExpert 1.4 afin d'obtenir la meilleure régression polynomiale ($y = ax^2 + bx + c$) sur la plage de concentration ciblée. Les concentrations des échantillons étaient calculées à partir de ces courbes. Tous les échantillons étaient analysés en double.

3.3. Etude de la toxicité *in vitro* des AOS issus de l'oxydation de HAP et du phénol en ALI

Dans cette partie, les méthodes et stratégies utilisées pour la génération, la caractérisation physico-chimique, l'exposition ALI et la détermination des effets toxicologiques sont décrites. Ce travail expérimental conséquent a mobilisé différentes personnes de l'INERIS notamment sur les aspects de génération d'AOS et de caractérisation physico-chimique. Je me suis néanmoins intéressée à tous les aspects de ces expériences dans le but d'avoir une vision d'ensemble des essais réalisés. Ainsi, j'ai pu mettre en relation les résultats toxicologiques avec les conditions expérimentales et les différents résultats physico-chimiques obtenus.

3.3.1. Génération des AOS à partir de précurseurs purs en laboratoire

Les AOS ont été générés de façon stable sur une période de 24 et 72 h à température ambiante (25 – 30°C) et humidité relative environnementale (62 – 75 %) à l'aide d'un réacteur d'oxydation à écoulement (Potential Aerosol Mass - Oxidation Flow Reactor, PAM-OFR ; PAM – OFR, Aerodyne Research) (Kang et al., 2007; Lambe et al., 2011; Peng and Jimenez, 2019). Le réacteur est une chambre cylindrique horizontale en aluminium d'un volume de 13,3 L (46 cm de long × 22 cm de diamètre) fonctionnant en flux continu. Les vapeurs de HAP [naphtalène (99 % de pureté) et acénaphtylène (75 %, les 25 % restants sont de l'acénaphtène)] et phénol (98 %) (Sigma – Aldrich, France) seuls ou en mélange, ont été obtenues par volatilisation de composés solides purs injectés en l'absence ou présence de NO_x et oxydés par réaction avec les radicaux OH (chimie diurne) ou les radicaux NO_3 (chimie nocturne) (Tableau 3. 4.). La formation des AOS était issue de processus de nucléation homogène sans présence de particules supports (Figure 3. 2. et 3. 3.). Les précurseurs ont été vaporisés par circulation d'air propre (air zéro) chauffé à travers un tube métallique rempli des composés solides correspondant. La température était régulée entre

25 et 30 °C à l'aide d'un four à colonne de chromatographie liquide CROCO-CIL et un débit de l'ordre de quelques dizaines de mL/min était appliqué en fonction du composé et de la concentration désirée. Le flux d'air zéro (air sec) entraînait les vapeurs dans le PAM – OFR. L'air entrant dans le PAM – OFR provenait d'air compressé filtré (filtre TSI 3074B), traité par un générateur d'air zéro à catalyse (Claind ZeroAir 20). Le flux d'air principal provenant du même générateur d'air zéro était en plus humidifié à l'aide d'un échangeur d'humidité (Perma Pure LLC – FC100-80-6-MKK) jusqu'à une humidité relative de 62 à 75 %. Le débit total au sein du réacteur était constant à 9.7 L/min correspondant à un temp de résidence au sein du PAM-OFR de 82 s. Dans les conditions expérimentales retenues, les concentrations en AOS générées étaient de l'ordre de 200 à 400 µg/m^3 avec une distribution granulométrique unimodale de 50 à 300 nm en diamètre aérodynamique.

Tableau 3. 3. : Conditions expérimentales de génération des différents AOS testés.

COVs	Oxydants	Ajout de NO_x	$[COV]_0$ ($mg.m^{-3}$)	[AOS] ($mg.m^{-3}$)	Irradiance ($\mu W.cm^{-2}$)	HR %)	T (°C)	$[O_3]_{PAM}$ (ppmv)	$[NO_x]$ (ppbv)	NO_x/COV
ACY + ACE	NO_3	-	0,03 + 0,08	412	-	75	25	14,60	1605	97,3
NAPH	NO_3	-	3,24	328	-	66	26	14,10	616	1.0
NAPH	OH	-	0,24	289	58	66	30	0,27	-	-
NAPH	OH	×	0,29	225	43	66	30	0,22	184	3,3
Phénol	OH	-	1,86	206	80	60	30	0,21	-	-
NAPH + Phénol	OH	-	0,33 + 1,86	190	25	62	29	0.09	-	-

Pour simuler la chimie diurne, les radicaux OH étaient produits par photolyse en appliquant la méthode « OFR185 » (Li, Palm, et al., 2015). Quatre lampes ultraviolet (UV) émettant à 185 et 254 nm (GPH436T5 96/4 five segments splice UVC lamps, Light Sources, Inc. I_{185}/I_{254} = 0.00234) (Rowe et al., 2020) photolysaient O_2 à 185 nm pour former O_3 qui était ensuite photolysé à 254 nm pour produire $O(^1D)$. $O(^1D)$ réagissait alors avec la vapeur d'eau présenter dans le PAM-OFR pour générer des radicaux OH. La tension des lampes était constante et comprise entre 1,9 et 2,5 V selon l'expérience. L'irradiance résultante (Ir), mesurée en continu par une photodiode placée dans le PAM-OFR (Tocon_C6, sglux), était comprise entre 25 et 80 $\mu W.cm^{-2}$. Un analyseur d'ozone photométrique UV (modèle 202, 2B Technologies) était utilisé pour mesure les concentrations en O_3 dans le PAM-OFR. Les NO_x étaient générés par l'ajout de N_2O pur (99,998 %, Air Liquide) à l'air zéro humidifié à environ 1 % en concentration finale dans le PAM-OFR. Celui-ci par réactivité avec ^1OD va engendrer la formation de NO qui en réagissant avec O_3 va former NO_2 (Lambe et al., 2017). Un tube de mélange (Koflo 1/4-21 316 SS, Cole-Parmer) placé à l'entrée du PAM-OFR permettait d'assurer un mélange homogène des vapeurs des précurseurs d'AOS avec les autres gaz (N_2O, air humide) (Figure 3. 2.).

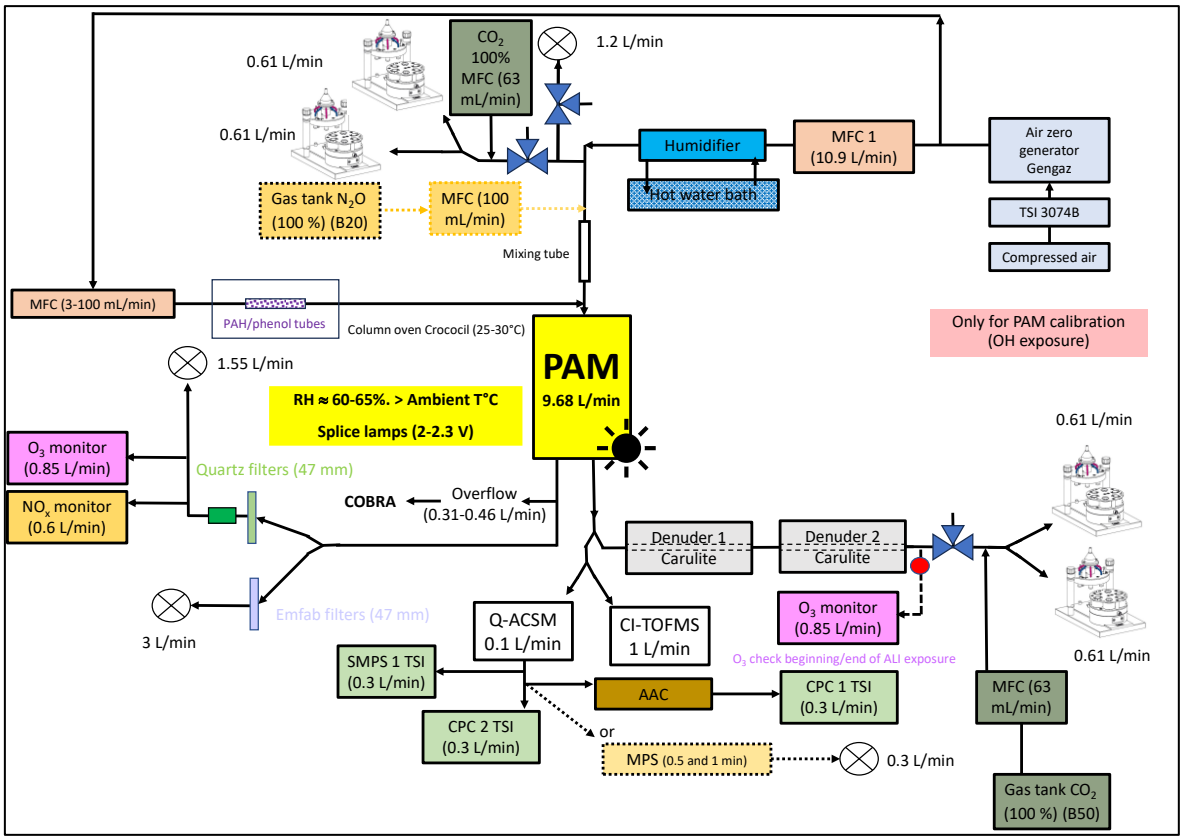


Figure 3. 2. : Représentation schématique dispositif expérimental utilisé pour générer et caractériser les AOS en condition diurne.

Pour la chimie nocturne, les radicaux NO_3 ont été générés en continu par décomposition thermique du N_2O_5 à température ambiante avant introduction dans le PAM-OFR maintenu à l'obscurité et en adoptant la méthode « OFR-iN_2O_5 » (Lambe et al., 2020). NO_3 et N_2O_5 étaient produits en phase gazeuse à la suite de la réaction de flux séparés de 75 ppmv de NO_2 (1 % dans N_2, Air Liquide) et de 150 ppmv d'O_3 dans un réacteur à flux laminaire (laminar flow reactor, LFR) en perfluoroalkoxy (PFA) de 152,4 cm de long et 2,22 cm de diamètre interne, couplé au PAM-OFR. Dans ces conditions, le rapport $[NO_2]_{0,LFR}$:$[O_3]_{0,LFR}$ était d'environ 0,5. L'ozone était produit à partir d'O_2 pur (99,9995 %, Air Liquide) ou au moyen d'une chambre à ozone équipée d'une lampe fluorescente au mercure (GPH212T5VH/4, Light Sources). Les concentrations en O_3 à l'intérieur du LFR étaient mesurées en continu par photométrie UV à l'aide d'un analyseur d'ozone supplémentaire (modèle 202, 2B Technologies) et les concentrations en NO_x dans le PAM-OFR par chimiluminescence au moyen d'un analyseur de NO-NO_2-NO_x (Thermo 42i). (Figure 3. 3.).

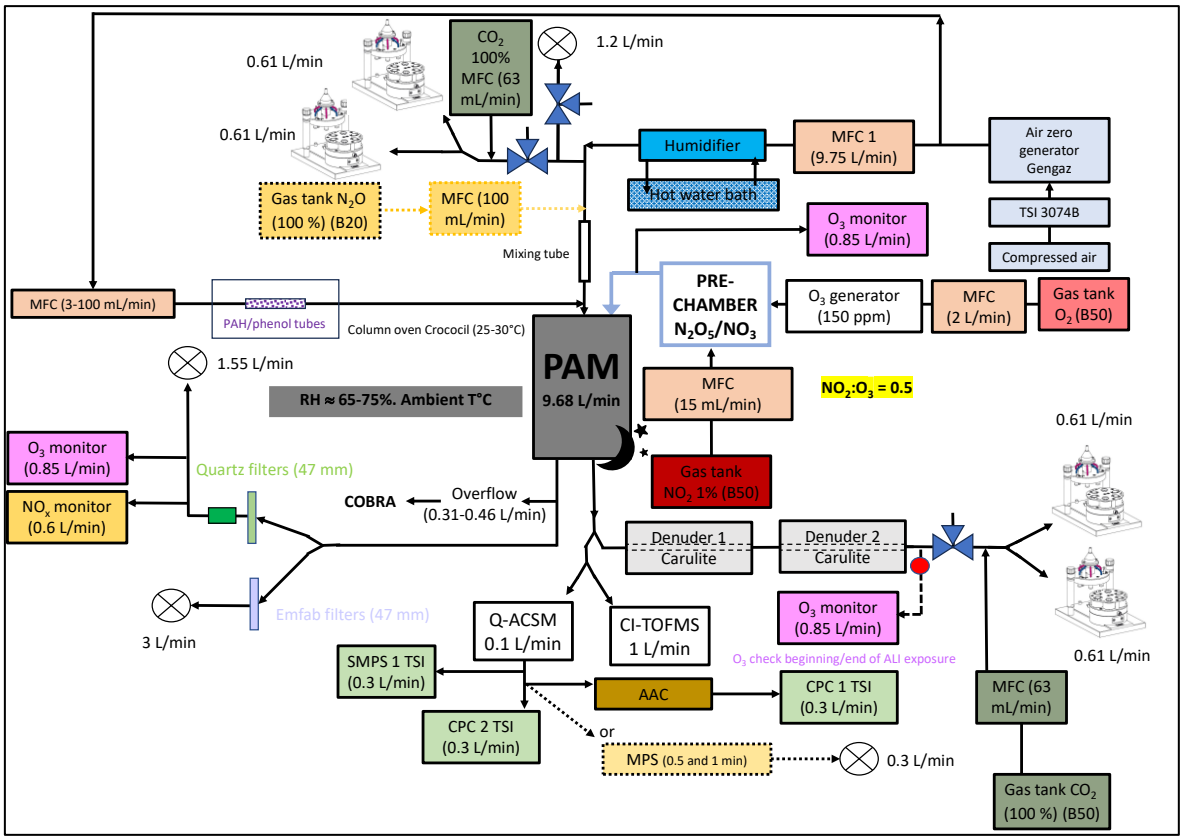


Figure 3. 3. : Représentation schématique dispositif expérimental utilisé pour générer et caractériser les AOS en condition nocturne.

3.3.1. Détermination des concentrations en précurseurs d'AOS injectés

Les concentrations de HAP et phénol ont été évaluées lors d'expériences dédiées réalisées dans les mêmes conditions que pour la génération d'AOS, mais sans oxydants (lampes du PAM-OFR éteintes et absence d'injection d'O_3 et de NO_2 dans le LFR, uniquement O_2). Les phases particulaire et gazeuse ont été collectées à la sortie du PAM-OFR sur des filtres en quartz (Pallflex Tissuquartz, Ø = 47 mm) et sur des mousses de polyuréthane (PUF ; 3,81 × 7,62 cm ; Tisch Environmental). Avant échantillonnage, les filtres ont été préchauffés à 500 °C pendant 12 h, tandis que les PUF ont été pré-nettoyées par extraction au solvant sous pression (ASE 350, Thermo Scientific ; un cycle d'hexane suivi de deux cycles d'acétone : 80 °C, 100 bars, 5 min de chauffage, 15 min de temps statique) (Zielinska, 2008). Les durées d'échantillonnage étaient de 15 et 30 min, et les expériences ont été réalisées en duplicata pour chaque durée. Après collecte, les échantillons ont été enveloppés dans du papier aluminium, placés dans des sachets hermétiques, puis stockés

à −20 °C jusqu'à l'analyse. Le filtre et la PUF associée (n = 14 échantillons) ont été extraits ensemble par extraction liquide sous pression (ASE 350, Thermo ; 80 °C, 100 bars, 5 min de chauffage, 15 min de temps statique, deux cycles) avec de l'acétonitrile comme solvant (VWR, qualité HPLC). Avant extraction, une quantité connue de 6-méthylchrysène a été ajoutée aux échantillons et utilisée comme étalon interne pour vérifier l'efficacité d'extraction pour les HAP (comprise entre 81 % et 85 %). Les extraits ont ensuite été directement quantifiés (sans étape de concentration afin d'éviter toute perte de HAP et phénol par évaporation ; seule une dilution par 10 a été appliquée). Les analyses ont été réalisées par chromatographie liquide à ultra haute performance (ultra high performance liquid chromatograhy, UHPLC) avec détection par fluorescence-UV (Ultimate 3000 ; Thermo Scientific) utilisant une colonne C18 UHPLC (2,1 mm × 150 mm × 1,8 µm, injection de 1 µL ; ZORBAX Eclipse PAH ; Agilent Technologies).

3.3.2. Caractérisation physico-chimique des AOS générés

Les AOS générés étaient suivis et caractérisés en temps-réel à l'aide d'un ensemble d'instrumentations (Figures 3.2 et 3.3, Tableau 3. 5.). La masse d'aérosol organique et la composition chimique de la fraction non réfractaire [matière organique (OM), nitrate (NO_3^-), sulfate (SO_4^{2-}), ammonium (NH_4^+) et chlorure (Cl^-)] étaient mesurées à l'aide d'un spectromètre de masse aérosol du type quadrupôle Aerosol Chemical Speciation Monitor (Q-ACSM – Aerodyne Research Inc.), équipé d'une lentille aérodynamique $PM_{2.5}$, avec une résolution temporelle d'une minute. Notons qu'avec un tel système (lentille $PM_{2.5}$), les particules inférieures à 110 nm ne sont pas analysables. Les aérosols ont été séchés avant analyse à l'aide d'un système de séchage à membrane Nafion® monotube. L'étalonnage du facteur de réponse du détecteur a été réalisé avec des solutions de nitrate et de sulfate d'ammonium (Ng et al., 2011; Crenn et al., 2015; Freney et al., 2019). Une efficacité ionique relative (relative ionization efficiency, RIE) de 1,4 a été appliquée à la matière organique. L'instrument était équipé d'un vaporiseur du type « capture vaporizer » permettant d'utiliser une efficacité de collecte des particules (collection efficiency, CE) fixe de 1 pour l'ensemble des données ACSM (Xu et al., 2017). En série avec l'ACSM, un compteur de particules par condensation (condensation particle counter, CPC – 3775, TSI) et spectromètre de mobilité électrique (scanning mobility particle sizer, SMPS), composé d'un

analyseur de mobilité différentielle (differential mobilty analyser, DMA, 3081, TSI) équipé d'un neutraliseur d'aérosols à rayons X, d'un classificateur électrostatique (3082, TSI) et d'un CPC (3756, TSI), étaient connectés afin de mesurer respectivement la concentration totale en nombre de particules (4 nm à 3 µm, avec une résolution de 1 s) et la distribution granulométrique des AOS basé sur leur diamètre de mobilité électrique (15,1 à 661,2 nm, avec une résolution de 2 min). En complément, la granulométrie des AOS basée sur leur diamètre aérodynamique était déterminée à l'aide d'un classificateur aérodynamique d'aérosols (aerodynamic aerosol classifier, AAC, Cambustion) couplé à un CPC (3775 TSI) en réalisant de 10 à 20 scans sur une gamme de taille de particules de 23 à 782 nm adaptée selon le type d'AOS étudié. La composition des particules à l'échelle moléculaire était aussi évaluée en temps-réel à l'aide d'un CI-TOF-MS (chemical ionization-time of flight-mass spectrometer) (Vocus CI-TOF, model Flex R, Tofwerk) muni d'une source d'ionisation par électrospray extractif (extractive electrospray ioniziation source, EESI) (Tofwerk) (Lopez-Hilfiker et al., 2019; Pospisilova et al., 2020; Surdu et al., 2021). Dans ce dispositif, le flux d'aérosol était aspiré à 1 $L \cdot min^{-1}$ à travers un dénudeur de charbon actif en nid d'abeille assurant l'élimination quasi-intégrale des espèces gazeuses par adsorption afin de cibler exclusivement la phase particulaire. A la différence du Q-ACSM, le CI-TOF-MS couplé à l'EESI n'est pas muni de lentille aérodynamique à l'entrée de l'échantillonnage ; Ainsi, l'ensemble des particules, quelles que soient leurs tailles, est théoriquement analysée même si des pertes peuvent avoir lieu notamment dans le dénudeur de charbon actif (Lopez-Hilfiker et al., 2019). À la sortie du dénudeur de charbon actif, le flux de particule croise un électrospray constitué de gouttelettes chargées (mélange 50:50 eau/acétonitrile, dopé à 100 ppm en iodure de sodium, NaI), généré par une tension de +2900 V. Les constituants hydrosolubles des particules sont désorbés et solubilisés *in situ* dans les microgouttelettes chargées. Les microgouttelettes sont transférées dans un capillaire chauffé où de l'évaporation rapide du solvant, la diminution du rayon des gouttelettes conduit à un éclatement coulombien expulsant les analytes sous forme d'adduits sodium ($M + Na^+$). Ces ions sont ensuite transférés et focalisés vers l'analyseur TOF-MS, où ils sont séparés en fonction de leur rapport masse/charge (m/z). La résolution moyenne obtenue sur l'analyseur temporel était comprise entre 5000 et 6000 ($M/\Delta M$) à m/z 185 avec une fréquence d'acquisition de 1 Hz, et ce pour l'ensemble des expériences.

Les particules d'AOS étaient aussi collectées à l'aide d'un échantillonneur double pompe à débit constant (QB1 – DADOLAB) permettant d'obtenir des débits d'échantillonnage d'environ 3 L/min. La collecte des particules était réalisée en parallèle sur filtres en fibres de quartz (Pallflex Tissuquartz, ∅ = 47 mm) et sur filtres Teflon-Fibre de verre (Pallflex Emfab, ∅ = 47 mm). Ces échantillons étaient destinés soit à de futures analyses chimiques/par bioessais *in vitro* et/ou *in vivo* ou pour des analyses gravimétriques. Avant échantillonnage, les filtres en quartz étaient calcinés à 500 °C pendant 12 h afin d'éliminer toute trace de composés organiques résiduelle tandis que les filtres Téflon-Fibre de verre étaient pré-pesés. Après prélèvement, les filtres étaient placés individuellement dans des boîtes de Petri Pall Analyslide, scellées dans des sachets en polyéthylène et stockés jusqu'à leur analyse soit à 4 °C pour les échantillons de gravimétrie soit à -20 °C pour les filtres quartz et à 5°C pour les filtres Teflon-Fibre de verre. La concentration massique totale des AOS à partir des filtres Téflon-Fibre de verre était déterminée par gravimétrie selon la norme EN 12341 (CEN - EN 12341, 2023). Les particules d'AOS étaient aussi collectées sur des grilles de microscopie électronique à transmission (MET) en cuivre (QUANTIFOIL R1.2/1.3 Cu 400 mesh, Holey Carbon Films) au moyen d'un système MPS (mini-particle sampler) (R'mili et al., 2013)avec un débit de 0,3 L min^{-1}. Ces échantillons ont permis une étude la morphologie des particules d'AOS. Les grilles étaient exposées 30 s et 1 min à chaque fois pour garantir au moins une analyse exploitable au MET en évitant la saturation de la grille. Une fois l'exposition terminée, les grilles étaient visualisées à l'aide d'un MET (JEAOL 1400 FLASH). L'homogénéisation des particules et le taux d'obscurcissement des grilles étaient vérifiés puis, un zoom était effectué sur les carreaux contenant les particules. Les images des particules ou groupes de particules étaient prises à l'échelle micrométrique et nanométrique, de telles manières à pouvoir facilement visualiser une morphologie particulière.

Tableau 3. 4. : Méthodes de caractérisation des particules d'AOS utilisées lors des expérimentations.

Paramètres étudiés	**Méthodes**
Concentration massique des AOS	Collecte de filtres et gravimétrie
Nombre de particules	CPC (Condensation Particle Counter)
Granulométrie et concentration en AOS	SMPS (Scanning Mobility Particle Sizer) ou AAC (Aerodynamic Aerosol Classifier) + CPC
Concentration et composition chimique des AOS	ACSM (Aerosol Chemical Speciation Monitor)
Composition chimique des particules à échelle moléculaire	CI-TOF-MS (Chemical Ionization Mass Spectrometer) avec source EESI (Extractive Electrospray Ionization Source)
Morphologie des AOS	Prélèvement sur grilles et analyse par microcopie électronique à transmission (MET)

3.3.3. Détermination des conditions de réactivité

L'exposition OH (OH exposure, OH_{exp}) a été estimée à l'aide du modèle cinétique KinSim (Peng and Jimenez, 2019). Les paramètres d'entrée du modèle KinSim incluaient la pression (P), la température (T), l'humidité relative (RH), les concentrations initiales en COV $[COV]_0$ et N_2O (1, 038 %) le cas échéant (Tableau 3.4), le temps de résidence total à l'intérieur du PAM-OFR (τ = 82 s), les flux de photons à 185 et 254 nm (I_{185} et I_{254},), les constantes de réactivité de chaque précurseur, N_2O et les sous-produits avec OH ou O_3 (McGillen et al., 2020) ainsi que les sections efficaces d'absorption photochimique (σ_i) de chaque précurseur, N_2O et les sous-produits à 185 et 254 nm (Keller-Rudek et al., 2013). Les valeurs obtenues de OH_{exp} variaient entre 3,29 × 10^9 et 4,45 × 10^{11} molécules cm^{-3} s, ce qui correspond à environ 0,03 à 3,43 jours équivalent de vieillissement atmosphérique (Tableau 4.2) en considérant une concentration moyenne journalière (24 h) en OH de 1,5 × 10^6 molécules cm^{-3} (Finlayson-Pitts and Pitts, 2000b) ainsi que les sections efficaces d'absorption photochimique (σ_i) de chaque précurseur à 185 et 254 nm

L'exposition NO_3 (NO_3 exposure, NO_{3exp}) a également été estimée théoriquement à l'aide du modèle KinSim et adaptée de travaux antérieurs (Lambe et al., 2017). Les paramètres du modèle incluaient P, T, RH, $[COV]_0$, $[O_3]_0$, $_{LFR}$ (Tableau 3.4), un temps de résidence de 111 s, une concentration de $[NO_2]_0$, $_{LFR}$ de 75 ppmv, ainsi que les constantes

de réactivité de chaque précurseur avec NO_3 ou O_3 (McGillen et al., 2020). Les valeurs de NO_{3exp} s'étendaient de 8,59 × 10^{13} à 1,12 × 10^{14} molécules cm^{-3} s, correspondant à environ 2,32 à 3,02 nuits équivalentes de 14 h de vieillissement atmosphérique (Tableau 4.2), en considérant un rapport de mélange nocturne moyen en NO_3 de 7,36 × 10^8 molécules cm^{-3} (Asaf et al., 2010).

La modélisation KinSim a permis également de déterminer les concentrations d'autres espèces chimiques telles que les NO_X et l'acide nitrique (HNO_3) (Tableau 4.2).

3.3.4. Exposition des cellules en ALI aux AOS générés

En parallèle de la caractérisation chimique en ligne, les AOS étaient dirigés vers le système d'exposition ALI Cultex® RFS. Le flux sortant du PAM-OFR était directement connecté à deux dénudeurs à oxydants monotube en série chacun de longueur 53,5 cm et de diamètre 8,3 cm remplis de Carulite® 200 (MnO_2/CuO, 4 × 8 mesh, granular catalyst, Carus Corporation), permettant l'élimination des oxydants gazeux résiduels, notamment l'ozone, afin d'éviter toute toxicité non spécifique (Doyle et al., 2007; Bowers et al., 2021; Henriquez et al., 2025). Les dénudeurs à oxydants alimentaient ensuite les deux modules Cultex® dédiés à l'exposition du modèle de coculture alvéolaire en ALI (Figures, 3. 2., 3. 3. et 3. 4.). L'efficacité des dénudeurs était vérifiée systématiquement avant et après chaque exposition par mesure de l'ozone en sortie (analyseur d'ozone, modèle 202, 2B Technologies) en conservant le débit total d'air les parcourant au cours des expositions de cellules (i.e., 1,2-1,3 L/min). La concentration était de 0 ppbv montrant une efficacité complète de piégeage de l'ozone même dans le cas des expérimentations de réactivité avec NO_3 où les concentrations dans le PAM-OFR étaient de 14 ppmv environ (Tableau 3.4). De façon similaire l'efficacité de piégeage des dénudeurs pour des composés organiques en phase gazeuse a été évalué à l'aide du CI-TOF-MS en mode PTR-MS (proton transfert mass reaction-mass spectrometry). Le suivi de divers composés organiques (dont le naphtalène) lors de la génération d'un AOS issu de l'oxydation du naphthalène avec NO_3, en amont et en aval des dénudeurs a montré que moins de 20% des COVs étaient piégés par ces derniers. L'efficacité de transmission des particules d'AOS a également été évaluée expérimentalement à partir de la génération d'AOS naphthalène avec OH et au moyen de deux SMPS placés en amont et en aval des dénudeurs en appliquant un débit total dans

ceux-ci similaire à celui utilisé lors de l''exposition des cellules (1.5 L/min). Les résultats ont montré des taux de transmission compris entre 70 et 100 % selon la taille des particules considérées entre 15,1 et 661,2 nm.

En parallèle de l'exposition aux AOS, deux modules supplémentaires étaient utilisés pour exposer les cellules à un air propre (condition AIR), permettant de comparer les effets des AOS à un flux exempt d'aérosols. Pour cette condition, le même air zéro humidifié et utilisé pour la génération d'AOS, était détourné en amont du PAM-OFR vers les modules ALI. Il est important de noter que, contrairement au flux sortant de PAM-OFR, cet air ne subissait pas l'élévation de température due aux lampes UV, ce qui introduisait une différence de température et d'humidité relative entre les conditions AOS et AIR notamment dans les conditions de réactivité OH.

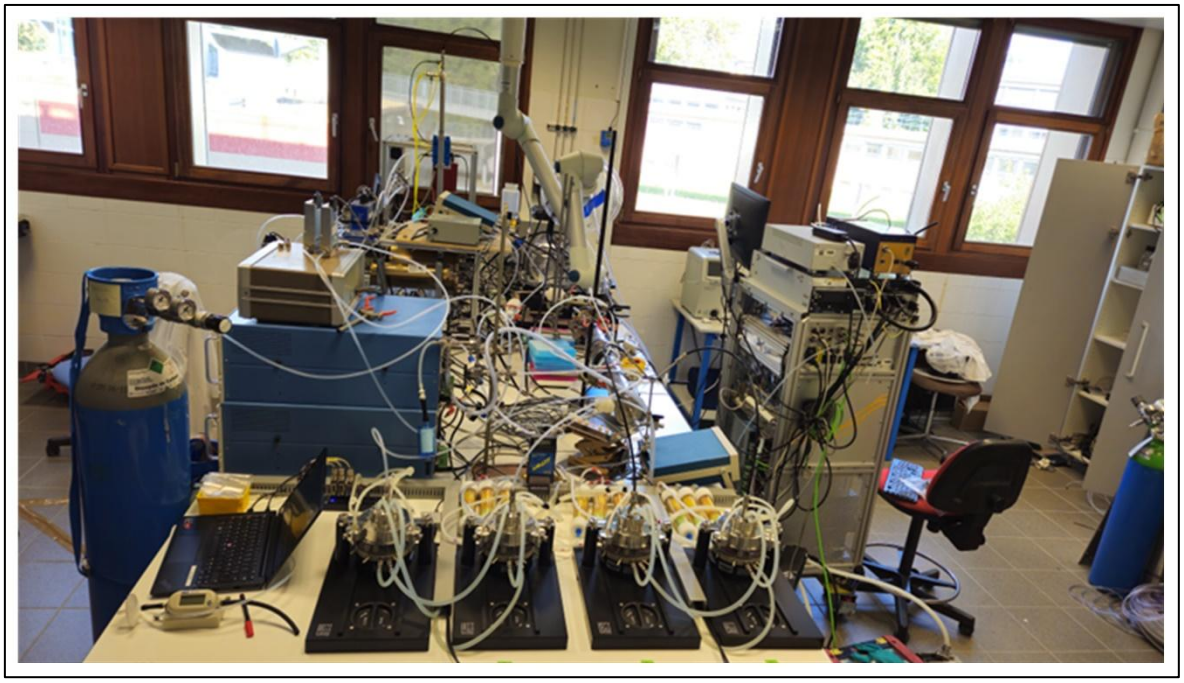


Figure 3. 4. : Photographie du dispositif expérimental utilisé pour générer, caractériser et exposer les AOS.

Afin de reproduire au mieux la composition gazeuse de l'air contenue dans les alvéoles pulmonaires, un apport en CO_2 (5% v/v) était ajouté en amont de chaque module d'exposition. Pour chaque paire de module d'une même condition, un flux de CO_2 pur en bouteille (Air liquide, 99.9996 %), régulé par des contrôleurs de débit massique, était ajusté de manière à maintenir concentration désirée (5 % de CO_2) (Figures 3. 2. et 3. 3.).

Dans ces conditions expérimentales, la coculture A549/hAELVi était exposée pendant 24 h ou 72 h à un débit d'air de 10 mL/min. Un troisième groupe de référence, constitué de cellules maintenues à l'incubateur (37 °C, humidité saturée, 5 % de CO_2), était utilisé pour contrôler le bon déroulement de l'exposition (condition INCUB). Le Tableau 3.5 résumé les différentes expositions réalisées selon les différentes conditions expérimentales.

Tableau 3. 5. : Détails des expositions ALI réalisées expositions réalisées selon les différentes conditions expérimentales.

Précurseurs d'AOS	**Oxydant**	**NOx**	**Durée d'exposition**	**Nombre de réplicas**
Acénaphtylène (+ acénaphtène)	NO_3	Non	24 h + 72 h	4 × (24 h) + 1 × (72 h)
Naphtalène	NO_3	Non	24 h	3 × (24 h)
Naphtalène	OH	Non	24 h + 72 h	3 × (24 h) + 1 × (72 h)
Naphtalène	OH	Oui	24 h	3 × (24 h)
Naphtalène + Phénol	OH	Non	24 h + 72 h	3 × (24 h) + 1 × (72 h)
Phénol	OH	Non	24 h	2 × (24 h)

3.3.5. Détermination de la dose d'AOS déposée sur les cellules

La détermination de la quantité de particules d'AOS déposée à la surface des cellules est essentielle pour l'interprétation des résultats toxicologiques obtenus. Celle-ci a été réalisée de façon théorique à partir des mesures de différents paramètres tels que la granulométrie, les concentrations atmosphériques en AOS déterminées par les mesures SMPS et corrigées à partir des mesures de gravimétrie, leur densité selon leur taille, la transmission des particules au sein des dénudeurs à oxydants selon leur taille (voir section 3.3.4), ainsi que la géométrie du système ALI. Ces paramètres sont ensuite utilisés afin de modéliser le dépôt des particules au sein du système ALI en prenant en compte les forces de sédimentation, de diffusion et d'impaction inertielle des particules ainsi que le débit (Q = 10 mL min^{-1}) et le temps d'exposition (24 ou 72 h). Cette modélisation s'appuie sur des

travaux précédemment publiés et le calcul des différents forces est détaillé en dessous (Aufderheide et al., 2011).

Géométrie et débit du système ALI

Le diamètre de l'entrée du système ALI Cultex® RFS est de 5 mm, la hauteur du flux parallèle à la culture cellulaire est h = 2,5 mm et le rayon extérieur de la sortie d'air est de 12,3 mm. Le débit Q = 10 ml/min. Le volume d'air au-dessus de la culture cellulaire est V = 1,182 cm^3 et le temps de séjour de l'air t = 7,09 s. La surface de l'insert considérée était de 4,57 cm^2.

Sédimentation

La sédimentation est déterminée par la mobilité et la masse des particules. La mobilité B est le rapport entre la vitesse des particules et la force qui provoque le mouvement, et peut être calculée par l'équation :

$$B = \frac{C}{3\pi\eta d}$$

η *:* viscosité de l'air = 1.8×10^{-5} kg/(s m).

D_p *:* diamètre des particules (m).

C *:* facteur de correction selon la loi de Stokes.

$$C = 1 + \frac{\lambda}{d}\left[2.514 + 0.8\exp(-0.55\frac{D_p}{\lambda}\right]$$

λ *:* libre parcours moyen des molécules d'air, 6.5×10^{-8} m (65 nm) à 298.15 °K

La masse *W* d'une particule est :

$$W = \frac{\pi}{6}d^3\rho_p g$$

g *:* accélération gravitationnelle, 9.81 m s^{-2}

ρ_p : densité de la particule. Compte tenu de la variation de la densité des AOS selon le diamètre des particules, au lieu d'une densité moyenne, celle-ci a été prise en compte selon leur diamètre en se basant sur les résultats obtenus précédemment pour les AOS HAP (El Mais et al., 2023). Dans le cas des AOS Phénol où aucune donnée selon le diamètre des particules n'existe dans la littérature, une densité moyenne de 1.54 g cm^{-3} a été prise en compte (Fang et al., 2024). De même pour les AOS Naphtalène + Phénol, une densité moyenne de 1.4 g cm^{-3} a été prise en compte comme généralement considérée dans les expérimentations de réactivité en chambre de simulation atmosphérique (Hallquist et al., 2009).

La vitesse de la particule $v = B*W$ et distance de sédimentation $s = v*t$. Pour toutes les particules, pour lesquelles « s » est supérieur à la hauteur h au-dessus de la culture cellulaire, le dépôt est complet, ce qui signifie 100 %. Pour toutes les particules, pour lesquelles « s » est inférieur à h, l'efficacité de dépôt par gravité est s/h. Pour les particules de diamètre inférieur à 0,5 µm, il n'y a pratiquement pas de dépôt dû à la gravité. Les particules de 10 µm de diamètre sont complètement déposées.

$$v = B \times W$$

$$s = v \times t$$

$$\text{Taux de déposition par sédimentation} = \frac{s}{h}$$

Diffusion

Le paramètre important pour la diffusion des particules est le coefficient de diffusion D.

$$D = BkT$$

k*:* constante de Boltzmann, 1.38×10^{-23} W s K^{-1}

T*:* Température, 310.15 K (37 °C)

Le dépôt de particules au cours du temps t sur une surface sous un aérosol avec la concentration en particules n_0 peut être calculé par :

$$N = 2n_0\sqrt{\frac{Dt}{\pi}}$$

L'efficacité de la déposition peut être calculée par :

$$\frac{N/n_0}{h}$$

Impaction inertielle

La distance d'arrêt est très faible, en raison de la faible vitesse d'écoulement. Même pour des particules de 10 µm, elle ne dépasse pas 8 µm. Par conséquent, l'impaction inertielle peut être ignorée.

Pour la représentation finale, le diamètre de mobilité (Dm) des particules a été converti en diamètre aérodynamique (Da)en utilisant les équations suivantes (John, 2011) :

$$Da = Dm \times \sqrt{\frac{\rho_p\,\chi}{\rho_0}} \times \frac{C_c(Da)}{C_c(Dm)}$$

Avec :

ρ_p : densité de la particule prise en compte selon le diamètre des particules comme indiqué ci-dessus.

ρ_0 = 1 g cm^{-3}

χ : facteur de forme dynamique qui pour les AOS est égal à 1 (particules sphériques) (voir section 4.3.2) (DeCarlo et al., 2004).

C_c le facteur de correction de Cunningham calculé pour Da et Dm ainsi (John, 2011) :

$$C_c = 1 + \frac{2\lambda}{D_p}\left[1.257 + 0.4\,exp\left(\frac{-1.1D_p}{2\lambda}\right)\right]$$

Avec λ étant le libre parcours moyen des particules dans l'air (égal à 65 nm à 298.15 °K).

3.3.6. Séparation des lots, tests et préparation des échantillons

À l'issue de chaque exposition, un module par condition était dédié aux analyses fonctionnelles : activité métabolique (PrestoBlue™), cytotoxicité (CytotoxOne™), intégrité de la barrière épithéliale (mesure de la TEER et perméabilité à la Lucifer Yellow) ainsi qu'à l'évaluation de la sécrétion de vésicules par coloration à la quinacrine sur cellules vivantes. Les inserts des modules restants étaient utilisés pour une extraction multiple ADN/ARN/protéines en vue du séquençage des ARNm et de l'analyse du stress oxydant.

Pour les analyses fonctionnelles, les inserts étaient récupérés immédiatement après exposition. Un contrôle microscopique était réalisé avant et après le rinçage apical à l'HBSS^{++}, permettant de vérifier l'intégrité du tapis cellulaire et l'absence de décollement. Le surnageant était ensuite collecté : une fraction était utilisée pour le dosage de la LDH extracellulaire (voir section 3.2.3.2.) et une autre conservée à -80 °C pour l'analyse des cytokines (IL-8, IL-6, TNF-α, IL-1β) par MSD (voir section 3.2.3.6.). L'activité métabolique était ensuite mesurée par la réaction de la résazurine (voir section 3.2.3.3.), suivie de la mesure de la TEER (voir section 3.2.3.4.1.) et de la perméabilité à la Lucifer Yellow (voir section 3.2.3.4.2.). Enfin, les cellules étaient rincées deux fois au PBS puis colorée à la quinacrine, avant d'être fixées et conservées à 4 °C (voir section 3.2.3.1.2.). Les inserts destinés aux analyses moléculaires subissaient une multi-extraction immédiatement post-exposition et contrôle visuel à l'aide du kit Qiagen AllPrep DNA/RNA/Protein selon les recommandations du fabricant. Les ARN issus des trois inserts d'une même condition (CT INC, CT AIR ou AOS) générés lors d'une exposition étaient regroupés afin d'avoir une quantité d'ARN suffisante pour les analyses, de limiter la variabilité intra-condition et d'optimiser l'utilisation des ressources de séquençage. Ainsi, les conditions CT INC et CT AIR comptaient n = 18 échantillons tandis que chaque AOS comptait n = 3 échantillons. Brièvement, après lyse cellulaire, les lysats étaient stockés à −80 °C puis décongelés pour l'extraction séquentielle de l'ADN, de l'ARN et des protéines par passage sur colonnes et centrifugation. Les ARN purifiés étaient ensuite conservés pour les analyses transcriptomiques (3'RNA-seq) et les protéines pour les dosages de biomarqueurs du stress oxydant (4-HNE, 8-OHdG, GSSG/GSH).

3.3.7. Analyses du stress oxydant

Les échantillons ont été envoyés au centre de recherche LilNCog (Lille Neuroscience & Cognition) à Lille (UMR-S 1172) qui a réalisé ces dosages à partir des fractions génomiques ou protéiques extraites des échantillons.

Dosage de la 8-OHdG (ELISA compétitif) :

La 8-hydroxy-2'-désoxyguanosine (8-OHdG) est un biomarqueur de dommages oxydatifs de l'ADN. Sa quantification était réalisée à l'aide du kit 8-OHdG ELISA (ab285254 – Abcam), basé sur un ELISA compétitif : la 8-OHdG présente dans les échantillons entre en compétition avec une 8-OHdG conjuguée à un HRP. L'intensité du signal colorimétrique mesurée est inversement proportionnelle à la concentration en 8-OHdG. La quantité d'ADN dans les fractions génomiques était dosée, puis après digestion, les échantillons et étalons étaient incubés dans des puits pré-revêtus d'anticorps, puis le HRP-conjugué était ajouté. Après lavage, la révélation était réalisée par ajout du substrat TMB et lecture de l'absorbance à 450 nm. Les concentrations étaient déterminées à partir de la courbe standard.

Dosage du ration GSSG/GSH :

Le ratio glutathion réduit/oxydé (GSH/GSSG) constitue un indicateur sensible de l'état redox cellulaire. Le test GSSG/GSH-Glo™ (Promega) repose sur une réaction enzymatique convertissant le glutathion en un signal luminescent proportionnel à sa concentration. Le GSH total est mesuré directement, tandis que le GSSG est quantifié après blocage préalable du GSH libre puis le ratio GSSG/GSH est calculé. Une fois la fraction protéique dosée, les échantillons étaient incubés avec les réactifs spécifiques permettant soit la mesure du GSH total, soit celle du GSSG. L'ajout du réactif luciférine-génératrice et de la luciférase permettait la production d'un signal luminescent mesuré à l'aide d'un luminomètre (Thermo varioskan LUX reader). Le ratio GSH/GSSG était alors calculé.

Dosage des adduits 4-HNE :

Les adduits du 4-hydroxynonénal (4-HNE) aux protéines sont des produits stables issus de la réaction de l'un des aldéhydes issus de la peroxydation des lipides membranaires et des protéines riches en acides aminés nucléophiles. Il constitue un marqueur reconnu du stress oxydant lipidique. Les adduits 4-HNE-protéines étaient quantifiés à l'aide d'un R-plex assay développé sur la plateforme MSD avec les réactifs fournis par le kit Lipid Peroxidation (4-HNE) Assay (ab238538 – Abcam), basé sur un ELISA compétitif. Les adduits 4-HNE-protéines présents dans les échantillons entrent en compétition avec une quantité connue et constante d'adduits 4-HNE-BSA fixés au fond des puits de la microplaque pour se fixer à un anticorps spécifiquement dirigé contre les adduits 4-HNE-BSA. Après incubation pendant 2h sous agitation à TA, un anticorps secondaire couplé à une sulfotag est ajouté. Après une incubation pendant 1h sous agitation à TA, puis lavage, la luminescence émise est mesurée grâce à un lecteur MESO QuickPlex SQ 120 (MSD). La luminescence est inversement proportionnelle à la concentration en adduits 4-HNEprotéines présents dans l'échantillon. Les concentrations étaient alors déterminées à partir d'une courbe standard d'adduits 4-HNE-BSA.

Dosage des protéines carbonylées :

Le dosage des protéines carbonylées permet de quantifier l'oxydation des protéines, l'une des conséquences directes de l'exposition aux espèces réactives de l'oxygène. Le test repose sur la dérivation des groupements carbonyles par la DNPH (2,4-dinitrophénylhydrazine), formant des hydrazones détectables en spectrophotométrie, par le Protein Carbonyl Content Assay Kit (ab126287, ABCAM). Les extraits protéiques étaient incubés avec la DNPH, puis précipités, lavés et re-suspendus selon le protocole du fabricant. L'absorbance des hydrazones était mesurée à λ 375 nm et les niveaux de carbonylation calculés en utilisant le coefficient d'extinction recommandé.

3.3.8. Analyses transcriptomique 3'RNAseq

Le séquençage par 3'-RNAseq et les premières analyses biostatistiques des résultats ont été réalisés par la plateforme GenOmics – at – Lille (GO@L) de l'UAR2014-US41-Plateformes Lilloises en biologie et santé (PLBS).

Préparation des librairies de séquençage :

Les librairies 3'RNA-seq étaient préparées à partir de 100 ng d'ARN total avec des amorces oligo-dT. Les amorces contenaient les séquences adaptatrices compatibles Illumina (Read 2). Après la synthèse du premier brin, l'ARN était dégradé puis le second brin synthétisé à l'aide d'une ADN polymérase. Ces amorces aléatoires introduisaient également les séquences adaptatrices Read 1 ainsi que des identifiants moléculaires uniques (UMIs) permettant l'élimination des duplicats PCR lors de l'analyse. Le cDNA double brin était ensuite purifié sur billes magnétiques puis amplifié. Les index i7 (3') et i5 (5') nécessaires à la génération des clusters Illumina étaient ajoutés lors de cette amplification. Le nombre de cycles dépendait de la quantité initiale d'ARN. Les librairies finales étaient purifiées puis contrôlées sur puce High Sensitivity DNA (Bioanalyzer 2100 – Agilent) afin de vérifier leur concentration et leur distribution en taille.

Séquençage :

Les librairies étaient normalisées, regroupées en pool équimolaire puis à nouveau contrôler sur Bioanalyseur. Puis, le séquençage était réalisé sur NovaSeq 6000 (Illumina). Le choix de la puce dépendait du nombre d'échantillons regroupés, avec un objectif minimal de vingt millions de lectures par échantillon.

Analyse bio-informatique :

Les lectures brutes étaient filtrées avec fastp pour retirer les régions de faible qualité et les queues poly(A), en appliquant un seuil de qualité de vingt et une longueur minimale de 25 paires de bases. Les lectures étaient ensuite alignées sur un génome de référence avec STAR en utilisant les annotations Ensembl. Les UMIs étaient traités avec fastp et umi-tools afin de corriger les erreurs et éliminer les duplicats PCR. Le comptage des lectures par gène était réalisé avec FeatureCounts. La qualité globale des données était évaluée à l'aide de Qualimap, FastQC, fastp et MultiQC. L'analyse différentielle d'expression était effectuée avec le package DESeq2 (R). Les gènes différentiellement exprimés étaient définis selon un seuil de significativité padj (méthode Benjamini-Hochberg) < 0,05.

3.4. Assurance qualité et contrôles qualité

3.4.1. Génération des AOS et exposition ALI

Le PAM-OFR était nettoyé systémiquement entre chaque expérimentation c'est à dire entre précurseur d'AOS et chaque changement de réactivité (OH et NO_3), ainsi qu'en fin de semaine, en le purgeant avec l'air zéro avec les lampes réglées à leur tension maximale (10 V). Avant chaque série expérimentale, le nombre de particules à la sortie du PAM-OFR était vérifié dans les conditions de réactivité retenues. Le nombre de particules mesuré par CPC devait être inférieur à 100 particules.cm^{-3}, garantissant l'absence de contamination résiduelle. Des blancs étaient également réalisés et collectés pendant 1 h en générant les oxydants dans les mêmes conditions que lors de la génération d'AOS mais sans injection de précurseurs montrant l'absence de contamination du système avant toute expérimentation et la qualité des mesures (voir section 3.4.2.). Les débits d'entrée des gaz dans le PAM-OFR et le système ALI étaient régulés par des débimètres massiques (MFC, mass flow controller, Alicat, MKS ou Tylan) étalonnés selon les gaz utilisé (air, N_2, NO_2, O_2, CO_2). Ces débits, ainsi que ceux de l'ensemble des instruments en temps-réel, étaient contrôlés avec un débimètre (TSI, model 5200) avant et après chaque expérimentation. Pour le système ALI, les débits étaient systématiquement vérifiés à plusieurs points stratégiques : à la jonction entre les deux modules d'une même condition, à l'entrée de chaque module et à l'entrée de chaque chambre d'exposition. L'écart maximal admissible entre la somme des débits de pompage et de fuite avec le débit d'entrée total au sein du PAM-OFR était de 0.1 L/min permettant de s'assurer qu'aucune fuite dans montage complet n'existait notamment à l'interface entre le PAM-OFR et le système ALI au niveau des dénudeurs à oxydants.

3.4.2. Mesures et analyses physico-chimiques

Les mesures et analyses physico-chimiques étaient réalisées conformément aux spécifications des normes et référentiel air ambiant en vigueur. Ainsi, la norme EN 16976 était suivi pour la détermination du nombre de particules par mesure CPC, la norme expérimentale CEN/TS 17434 pour la détermination des distributions granulométriques des particules, les recommandations des guide méthodologiques du LCSQA (Laboratoire Central de Surveillance de la qualité de l'air) relatif à la mesure de la composition chimique

des particules submicroniques en temps-réel par ACSM et du nombre de particules (XP CEN/TS 17434, 2020; Ustache, 2021; Chebaicheb, 2024; NF EN 16976, 2024). Les mesures gravimétriques de particules et le mesure des NO_x étaient effectués selon les normes EN 12341 et EN 14211. La détermination des concentrations en HAP était effectuée selon les normes en vigueurs (ISO 12884, 2000; NF EN 15549, 2008; CEN/TS 16645, 2014 p. 2; NF EN 12341, 2023; NF EN 14211, 2024). Ainsi, ces règlementations garantissaient la maîtrise métrologique, l'étalonnage des instruments et la traçabilité des mesures et analyses. Pour les mesures EESI-TOF-MS, des mesures de bruit de fond ont été effectuées lors de chaque expérimentation en faisant passer le flux échantillonné depuis le PAM-OFR au travers un filtre à particules (9933-11-BQ, 0,01 µm, 99,99% d'efficacité, Parker). Les signaux rapportés étaient calculés comme la différence de l'air non filtré sortant du PAM-OFR moins la moyenne des mesures de fond immédiatement avant et après chaque mesure du PAM-OFR.

3.4.3. Exposition ALI – Identification des risques et actions mises en place

Des blancs dynamiques, témoins négatifs et positifs, ainsi qu'un contrôle de l'effet propre du système ALI étaient systématiquement intégrés. Chaque série comportait au moins trois expériences indépendantes avec réplicas techniques, et l'ensemble des étapes était consigné dans un cahier de laboratoire assurant la traçabilité. La qualité des systèmes d'essais (stérilité, viabilité, absence de mycoplasmes, stabilité cellulaire) et des réactifs (lots, péremption) était vérifiée régulièrement. L'ensemble des paramètres influençant les expositions en ALI (débit, humidité, température, géométrie des inserts, stabilité du flux) était rigoureusement contrôlé afin de limiter des effets non spécifiques liés aux contraintes propres du dispositif. Lors de la mise en place des systèmes Cultex® et VitroCell®, plusieurs sources potentielles de stress cellulaire liées au fonctionnement des dispositifs ou aux ajustements techniques ont été identifiées. Chacune était testée, quantifiée et optimisée avant les expositions définitives. Cette phase d'optimisation visait à dissocier les effets intrinsèques du système d'exposition de ceux induits par les AOS, garantissant que les réponses biologiques observées étaient spécifiquement attribuables au polluant étudié.

3.4.3.1. Points de contrôles systématiques

3.4.3.1.1. Contrôle visuel de la morphologie cellulaire

La morphologie des cellules A549 et hAELVi en mono- et coculture était suivie tout au long du protocole par microscopie optique (Leica DMIL, #356764) après ensemencement cellulaire, durant la phase de croissance cellulaire, avant et après la mise en ALI, ainsi qu'avant et après l'exposition. Des images étaient acquises à l'aide d'une caméra XCAM1080P2MPA couplée au logiciel ToupView (Digital Camera), à un grossissement de $\times$ 200 avec réglage automatique de l'exposition lumineuse.

3.4.3.1.2. Contrôle de la viabilité cellulaire

Afin de garantir la stabilité du modèle cellulaire et la fiabilité des expositions ALI, plusieurs points de contrôle systématiques étaient intégrés à chaque étape du protocole. Un contrôle visuel rigoureux était réalisé tout au long des phases de culture, de mise en ALI et d'exposition, permettant de détecter précocement toute anomalie morphologique ou signe de dessèchement du tapis cellulaire. À l'issue de chaque exposition, la viabilité cellulaire était systématiquement évaluée par la mesure de la LDH extracellulaire et de l'activité métabolique via les tests CytotoxOne et PrestoBlue®, utilisés comme premiers indicateurs de cytotoxicité. Ces contrôles permettaient de confirmer le bon déroulement de l'exposition et d'interrompre les analyses suivantes, plus coûteuse, en cas d'altération majeure de l'intégrité cellulaire.

3.4.3.2. Mise en interface air-liquide des cellules immergées

Outre les effets de l'exposition à l'air, la transition des cellules d'un environnement de croissance cellulaire submergé vers une interface en ALI constitue une étape déterminante pour la viabilité du modèle. Ce changement brutal d'environnement représente en lui-même une source potentielle de stress cellulaire, susceptible d'altérer l'intégrité épithéliale indépendamment des futures expositions. L'optimisation de cette phase était essentielle pour garantir un état physiologique stable des cellules. Dans ce contexte, l'impact des procédures de rinçage apical, nécessaire avant la mise en ALI, était évalué sur des modèles cellulaires maintenus en conditions submergées. Il était observé que l'utilisation répétée de

PBS favorisait le dessèchement du tapis cellulaire, probablement en altérant la couche de surfactant produite. Afin de limiter ce phénomène, le rinçage apical était réalisé avec de l'HBSS supplémenté en Ca^{2+} et Mg^{2+} ($HBSS^{++}$), dont la composition ionique contribue au maintien de l'intégrité épithéliale et soutient la production de surfactant. Cette optimisation a permis de limiter le risque de déshydratation apicale et d'assurer une transition ver l'ALI plus reproductible et physiologiquement pertinente.

3.4.3.3. Choix des contrôles négatifs

Compte tenu des contraintes spécifiques associées aux expositions ALI, l'intégration de contrôles négatifs adaptés est indispensable pour distinguer les effets liés aux dispositifs d'exposition de ceux induits par les aérosols. Ainsi, pour chaque série expérimentale, des groupes témoins systématiques ont été réalisés en parallèle afin de garantir l'interprétation correcte des réponses biologiques :

- Contrôle INCUB : Au moins trois inserts maintenus en conditions ALI étaient conservés à l'incubateur (37 °C, 5 % de CO_2 et humidité saturée) sans exposition au système ALI. Ces contrôles permettaient d'isoler les effets spécifiquement liés au système d'exposition indépendamment des effets liés aux polluants.

- Contrôle AIR : Au moins trois inserts étaient placés dans le système ALI et exposés à un flux d'air propre, exempt de polluants. Les débits du flux d'air, la température, la durée d'exposition et les conditions de transport du laboratoire de culture au laboratoire d'exposition étaient strictement identiques à ceux appliqués aux inserts dédiés à l'exposition aux polluants. Ces contrôles permettaient d'isoler les effets spécifiquement liés aux polluants, indépendamment des effets liés au flux d'air.

Ensemble, l'utilisation de ces deux contrôles a permis de caractériser, valider et optimiser l'ensemble des modèles cellulaires développés ainsi que leur exposition. Ainsi, les paramètres cruciaux liés aux systèmes d'exposition ALI ont pu être identifiés et améliorés pour assurer la robustesse des conditions expérimentales (voir section 0.).

3.4.3.4. Débit du flux d'air au niveau des chambres d'exposition

Le débit du flux d'air constitue un paramètre critique en exposition ALI, un flux trop élevé pouvant induire un stress cellulaire important et favoriser le dessèchement apical (Buckley et al., 2024; Bredeck et al., 2025). Les recommandations diffèrent selon les dispositifs : 5 mL/min pour VitroCell® et 30 mL/min pour Cultex®. Toutefois, un débit de 5 mL/min peut limiter la déposition de polluants, tandis que 30 mL/min s'avère trop agressif pour des expositions longues (24 - 72 h). Pour trouver le compromis adapté, la coculture était exposée pendant 24 h à trois débits différent (10, 20 et 30 mL/min) dans le système Cultex®. Les résultats sont présentés sur la Figure 3. 5.

Le débit de 30 mL/min entraînait un assèchement marqué du tapis cellulaire, un décollement cellulaire lors de son rinçage, une augmentation significative de la LDH extracellulaire et une réduction de plus de 60 % de l'activité métabolique. À 20 mL/min, un dessèchement partiel, une cytotoxicité d'environ 20 % et une diminution de 50 % de l'activité métabolique ont été observés. Seul le débit de 10 mL/min permettait de maintenir une viabilité et une activité métabolique satisfaisantes, sans signe de cytotoxicité. Ce débit a donc été retenu pour l'ensemble des expositions, constituant un compromis optimal entre dépôt particulaire et préservation de l'intégrité cellulaire.

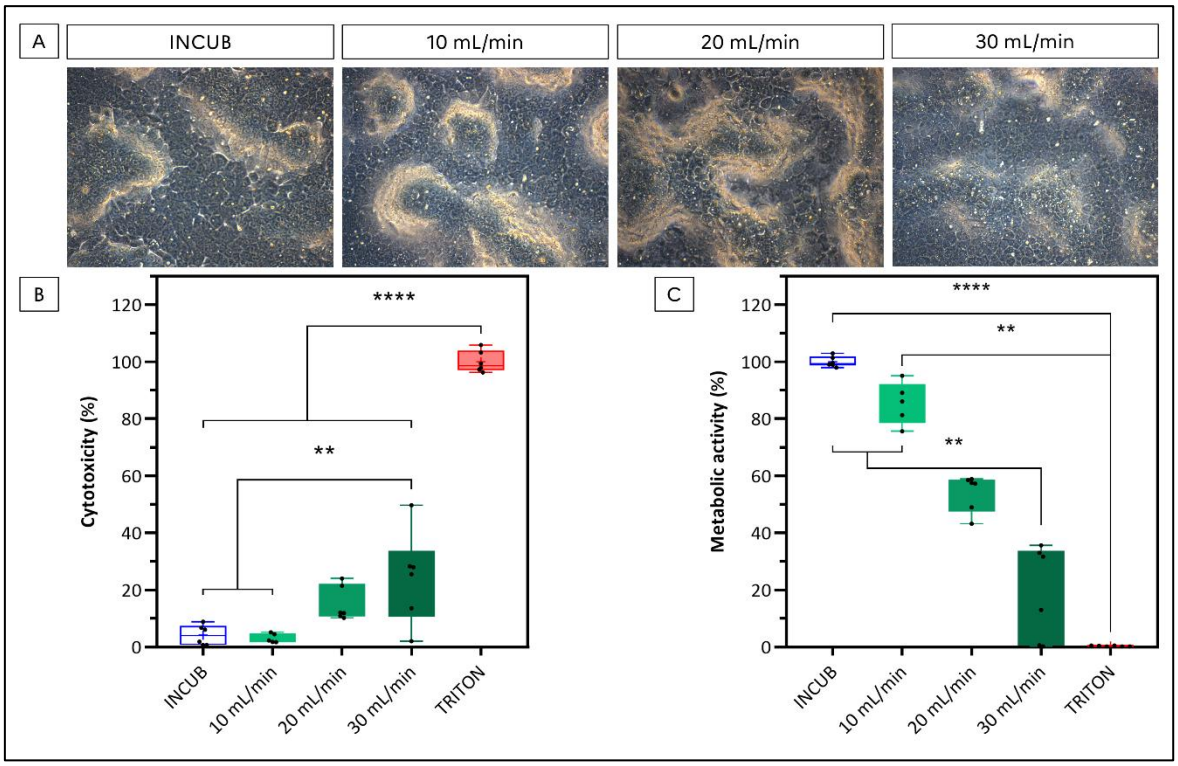


Figure 3. 5. : (A) Morphologie, (B) Cytotoxicité et (C) activité métabolique de la coculture A549/hAELVi après 24 h d'exposition à de l'air propre avec le système ALI Cultex® à trois différents débits (10, 20 et 30 mL/min). Comparaison avec des cellules laissées à l'incubateur (INCUB). Les résultats sont issus de deux expériences indépendantes (n = 6).

3.4.3.5. Maintien du pH du milieu de culture lors de l'exposition ALI

L'exposition à l'air peut entraîner des variations du pH du milieu basal, rendant indispensable le maintien d'un environnement physiologiquement stable. L'ajout de tampons tels que l'HEPES (acide 4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonique) peut contribuer à stabiliser le pH, mais son utilisation est limitée par des effets cytotoxiques, notamment en présence de lumière et d'oxygène (Zigler et al., 1985). Une alternative consiste à enrichir l'air exposé avec 5 % (v/v) de CO_2, proportion proche de celle retrouvée dans l'espace intra-alvéolaire et identique aux conditions d'incubation, permettant ainsi d'éviter l'ajout d'HEPES (Krogh and Lindhard, 1914; Mackay, 1940; van den Velde et al., 2007). Pour évaluer ces approches, la coculture était exposée pendant 24 h dans le Cultex® selon trois conditions : milieu supplémenté avec 25 mM d'HEPES, milieu supplémenté avec 25 mM et ajout de 5 % (v/v) de CO_2 dans l'air exposé, ou l'ajout de CO_2 seul (Figure 3. 6).

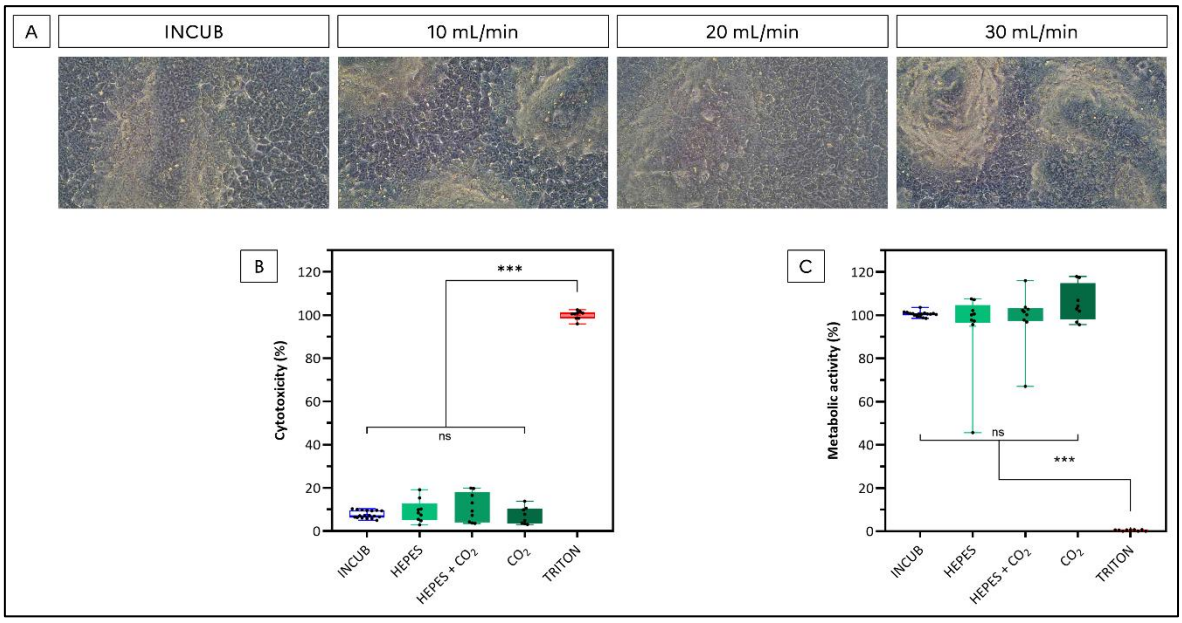


Figure 3. 6 : (A) Morphologie, (B) Cytotoxicité et (C) activité métabolique de la coculture A549/hAELVi après 24 h d'exposition à de l'air avec le système ALI Cultex® à 3 différentes conditions (25 mM HEPES, 25 mM HEPES + 5% v/v CO2, 5% v/v CO2) comparé à des cellules laissées à l'incubateur (INCUB). Les résultats sont issus de 3 expériences indépendantes, comportant chacun 3 replicats techniques (n = 9).

Les résultats ne montraient pas de différences significatives entre les conditions et en comparaison avec les cellules laissées à l'incubateur, mais les cellules exposées dans du milieu contenant de l'HEPES présentaient des niveaux de LDH légèrement plus élevés et une variabilité des données plus importante. En conséquence, l'enrichissement de l'air en CO_2 (5 % v/v)a été retenu afin de limiter le risque de cytotoxicité associé à l'HEPES et de se rapprocher des conditions physiologiques alvéolaires.

3.4.3.6. Maintien des paramètres physiologiques : l'auto-humidification

L'humidité relative (HR) et la température constituent des paramètres critiques en exposition ALI. Une humidité insuffisante (< 70 %) favorise le dessèchement apical, tandis qu'un contrôle inadéquat de la température peut induire un stress thermique. Le maintien d'une atmosphère proche de 37 °C et à forte humidité est donc indispensable pour préserver l'intégrité cellulaire. L'architecture des inserts joue un rôle majeur dans ce processus, en permettant l'auto-humidification du tapis cellulaire et le maintien de la température (Tsoutsoulopoulos et al., 2016).

L'humidification du flux d'air peut modifier les propriétés physico-chimiques des aérosols et entraîner des phénomènes de condensation avec l'apparition de gouttes liquides dans les tubulures et un impact sur les cellules. Pour éviter ces contraintes, une procédure de préchauffage a été appliquée avant chaque exposition (Aufderheide and Mohr, 1999; Aufderheide et al., 2013; Tsoutsoulopoulos et al., 2019). Le milieu préchauffé à 37 °C était maintenu à cette température par circulation d'eau, et le flux d'air était initié au moins 30 minutes avant l'introduction des inserts. Pour confirmer le maintien d'une humidité suffisante au niveau du tapis cellulaire lors de l'exposition, les expériences décrites par Tsoutsoulopoulos en 2016 ont été reproduites (Figure 3. 7.).

Des indicateurs d'humidité (#90801, Macherey-Nagel) réutilisables ont été placés dans les chambres des systèmes d'exposition. Une HR élevée correspondait à la couleur rose tandis qu'une HR faible correspondait à la couleur bleue. Les indicateurs consistaient en une série de sept carrés, chacun correspondant à une échelle de 10 % d'HR (20, 30, 40, 60, 70 et 80 % d'HR). Les carrés correspondant aux mesures de 60, 70 et 80 % d'HR étaient découpés et placés dans des inserts sur un bouchon les surélevant légèrement afin d'empêcher tout contact direct avec le milieu. Les chambres, remplies de milieu de culture, étaient chauffées ou non à 37 °C, et un flux d'air de 10 mL/min a été appliqué ou non afin de démontrer l'importance de chaque paramètre. Cette expérience était réalisée dans les deux systèmes d'exposition, Cultex® RFS et VitroCell®. Le système Cultex® RFS étant équipé de sondes de mesures, un suivi de l'HR et de la température a été effectué pendant 24 h.

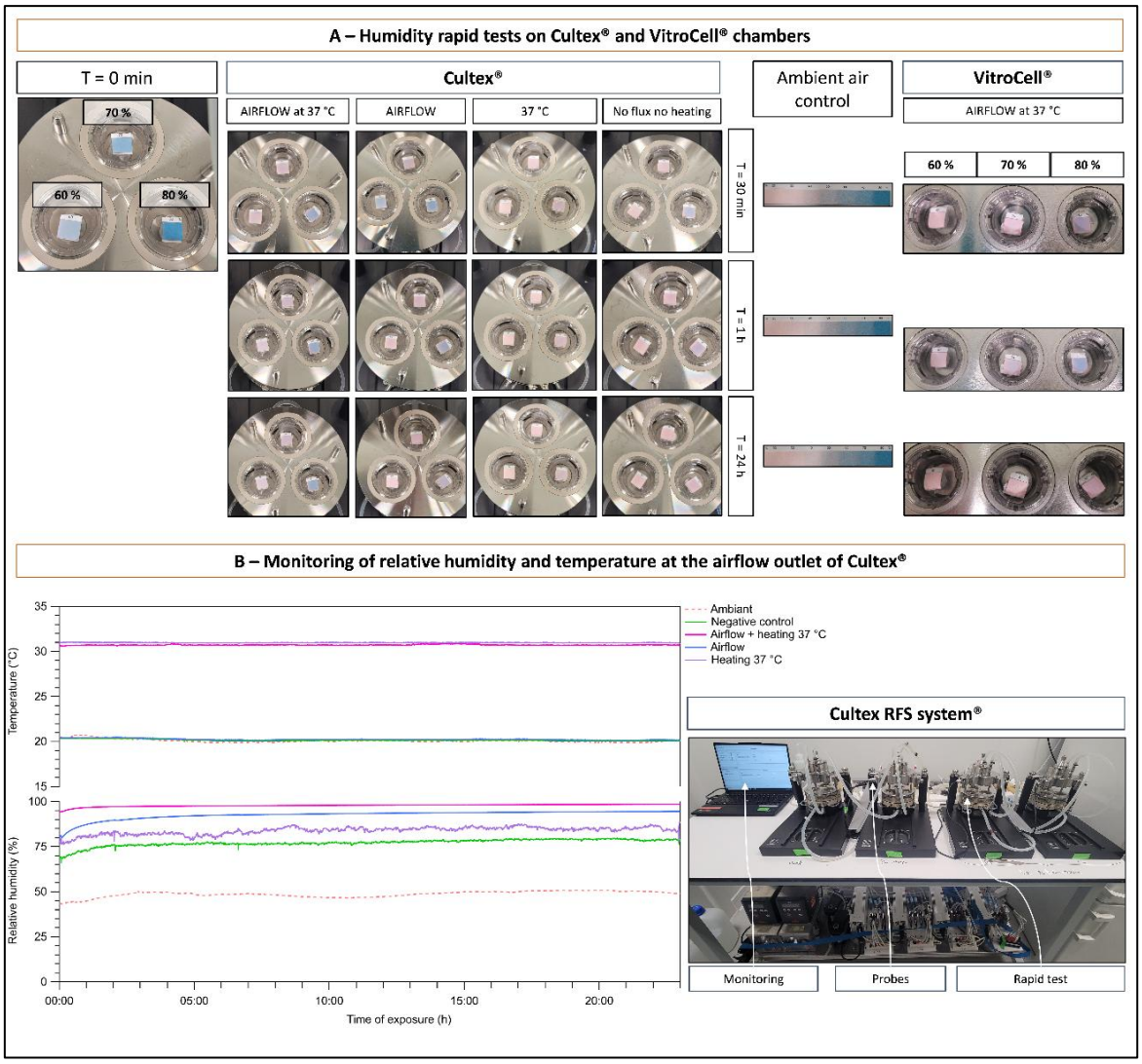


Figure 3. 7. : (A) Mesure de l'humidité relative (HR) au niveau du tapis cellulaire et (B) à la sortie du module lors d'une exposition de 24 h. (A) Photos des cartes indicatrices d'HR dans les 2 systèmes au départ puis après 1 et 24 h d'exposition. (B) Suivit de la température (°C) et de l'HR (%) à la sortie du système Cultex® durant 24 h.

Les mesures réalisées ont confirmé que les chambres des systèmes Cultex® et VitroCell® atteignaient une HR proche de 80 % après environ 30 min lorsqu'un débit d'air était présent et que le module était chauffé, conformément aux observations précédentes (Tsoutsoulopoulos et al., 2016). L'air en sortie de système était saturé en humidité à partir de 20 min d'exposition. Cette saturation résultait de l'évaporation du milieu et de sa recirculation dans les chambres, assurant une auto-humidification efficace. Le même comportement a été observé dans le système VitroCell®, également chauffé à 37 °C et utilisé avec un débit de 10 mL/min. D'autres expériences consistant à comparer les deux

systèmes entre eux ont montré qu'aucune différence n'était notable en termes de viabilité cellulaire entre les deux dispositifs.

Le choix des inserts s'est également avéré déterminant : les inserts CORNING® Transwell® ont été retenus en raison de leur capacité à maintenir une humidité locale élevée, liée à la densité de pores de leur membrane et, à la taille et au placement et des aérations. Ces observations ont été confirmées lors d'exposition réaliser avec d'autres type de d'insert tels que FALCON® et CellQart®. L'utilisation de ces derniers pendant des expositions de 6 à 24 h entrainait une diminution de l'activité métabolique cellulaire de 50 à 90 %. Ces résultats confirment la pertinence du concept d'auto-humidification et la robustesse du choix des inserts utilisés.

3.4.3.7. Gestion des contaminations

Une fois par mois, la recherche de mycoplasme était réalisée sur les cultures mères des deux lignées utilisées en routine (MycoAlert™ Assay Control Set, Lonza). Avant et après chaque exposition, un nettoyage complet du système d'exposition, des ustensiles (pinces, pipettes, béchers) et de l'environnement de travail était réalisé. Le milieu récupéré dans les chambres était conservé 48 h pour vérifier l'absence de contamination, puis les tubulures reliant les compartiments supérieurs et inférieurs des modules étaient vidées. Les chambres, tubulures et ustensiles étaient ensuite désinfectés à l'éthanol 70 %, puis avec un désinfectant de surface (Anios) avec un temps de contact minimal de 10 min, avant d'être nettoyés mécaniquement, rincés à l'eau Milli-Q, séchés et réassemblés.

3.4.4. Contrôles négatifs et positifs des tests toxicologiques

3.4.4.1. Contrôles négatifs et immunocytochimie

Pour chaque expérience d'immunocytochimie, des contrôles négatifs étaient réalisés en omettant l'anticorps primaire et en incubant les cellules uniquement avec l'anticorps secondaire, dans les mêmes conditions expérimentales. Ces contrôles permettaient de vérifier l'absence de marquage non spécifique et d'auto-fluorescence cellulaire. La fluorescence spécifique était visualisée à l'aide d'un microscope confocal Zeiss LSM 980 AiryScan2 IR. Les images étaient acquises et analysées (correction du bruit de fond et

ajustement de l'exposition) à l'aide du logiciel Zen 3.3 (Carl Zeis Microscopy GmbH). Seuls les signaux présentant une intensité > 1000 RFU (Relative fluorescence unit) étaient intégrés.

3.4.4.2. Traitement au Triton comme contrôle positif de la cytotoxicité

Les mono- et cocultures étaient exposées à une solution de Triton X-100 à 1 % (v/v) (T8787, Merck) diluée avec le milieu de culture cellulaire correspondant pendant 2 h. Un volume de 1 mL était ajouté au compartiment apical et, 1,5 mL au compartiment basolatéral des inserts. Le Triton X-100 induisait une perméabilisation membranaire par solubilisation de la bicouche lipidique, entraînant une lyse cellulaire. La durée d'exposition limitée à 2 h permet d'éviter la dégradation de la LDH tout en maintenant l'adhérence des cellules à la membrane des inserts, afin de permettre les analyses ultérieures. Ce contrôle positif permet de mimer la mort cellulaire nécrotique.

3.4.4.3. Lipopolysaccharide (LPS) comme contrôle positif de l'inflammation

Les mono- et cocultures ont été exposées à 5 µg/mL (pour le contrôle positif de l'inflammation de la mono- et de la coculture) et à 20 µg/mL (pour un contrôle positif de la réactivité de la coculture) de LPS (L2880, Merck), un agent pro-inflammatoire, pendant 24 h (sous forme d'exposition des cellules respiratoires) sur les parties apicales et basolatérales des inserts. La dose effective était sélectionnée pour induire l'expression spécifique de certaines cytokines, ce qui reflète généralement une réponse (pro)inflammatoire.

3.4.4.4. Génération d'un aérosol de ZnO comme contrôle positif de la réactivité de la coculture

Afin de vérifier la réactivité de la coculture en conditions d'exposition en ALI, un aérosol d'oxyde de zinc (ZnO, Sigma-Aldrich, 98 % pureté) était utilisé comme contrôle positif (condition « ZnO »), en raison de sa toxicité documentée en exposition en ALI (Stoehr et al., 2015; Tilly et al., 2020; Lovén et al., 2021; Stuetz et al., 2023). Les suspensions de ZnO étaient préparées à 10 g/L par dispersion de ZnO dans de l'eau Milli-Q. La suspension était homogénéisée avant la nébulisation et maintenue sous agitation magnétique continue afin d'assurer une génération stable et reproductible de l'aérosol, le ZnO étant insoluble dans

l'eau. La coculture était exposée à 1 et 2 mg/m^3 pendant 24 h. Ces doses élevées étaient choisies afin d'induire une diminution minimale de 40 % d'activité métabolique. Ces concentrations sont largement supérieures à celles généralement observées en environnement professionnel ou environnemental (Lenz et al., 2009, 2013; Hackenberg et al., 2011; Xie et al., 2012; Moratin et al., 2023).

La suspension de ZnO (10 g/L) était nébulisée à l'aide d'un générateur Palas AGK-2000 équipé d'un impacteur HCT, avec un débit total de 5 L/min. L'aérosol généré était ensuite dilué avec de l'air propre et sec (20 à 30 L/min) afin d'obtenir deux concentrations d'exposition distinctes. La distribution en taille des particules et les concentrations massiques étaient mesurées à l'aide d'un SMPS (TSI soft x-ray neutralizer 3088 et GRIMM SMPS+C with L-DMA). Les aérosols obtenus présentaient une distribution unimodale centrée autour de 800 nm. Les concentrations mesurées étaient de 1 et 2 mg/m^3, en considérant une densité de 5,6 g/cm^3 correspondante à celle du ZnO. L'humidité relative de l'aérosol était d'environ 30 % pour l'ensemble des expériences (Tableau 3. 6.). Les cocultures étaient exposées aux aérosols de ZnO pendant 24 h à l'aide du système d'exposition ALI Cultex® à un débit de 10 mL/min par puits.

Tableau 3. 6 : Caractéristiques de la génération de ZnO pour l'exposition en ALI de la coculture

Paramètres	**Contrôle**	**Concentration faible**	**Concentration forte**
Solution nébulisée	Eau Mili-Q	ZnO 10 g/L	ZnO 10 g/L
Flux nébulisé (L/min)	5	5	5
Dilution du flux (L/min)	30	30	20
Humidité relative (%)*	27	27	33
Concentration de l'aérosol (mg/m^3)*	0	1	2
Mode de l'aérosol (nm)*	-	800	810
Durée de l'exposition (h)	24	24	24

* L'humidité relative, la concentration massique des particules d'aérosol et la distribution en taille des particules sont issues des mesures SMPS.

3.4.5. Analyse, statistiques et présentation des données

Le logiciel GraphPad Prism 8.0 de Dotmatics était utilisé pour la représentation graphique et l'analyse statistique des données toxicologiques. Lorsque la normalité des données était prouvée par le test de Shapiro-Wilk, l'ANOVA unidirectionnelle était appliquée, suivie du test post-hoc de Dunnett lorsque la signification a été établie ($p < 0,05$). Si la normalité des données était réfutée, des tests de comparaison multiple de Kruskal-Wallis et Dunn étaient réalisés ($p < 0,05$). La majorité des données toxicologiques sont représentées sous forme de boîte à moustaches (boxplot). Les boîtes à moustaches représentent les 25ème et 75ème percentiles. Les lignes horizontales dans les encadrés et les croix représentent respectivement la médiane et la moyenne. Chaque point de données est représenté individuellement (points noirs). Les lignes verticales représentent l'écart-type (± SD) et la significativité était présentée comme suit : des étoiles (*) montre la significativité entre les conditions en incluant le contrôle positif tandis que les dièses (#) montrent la significativité entre les conditions en excluant le contrôle positif. **** = p <0,0001, *** = $p < 0,001$, ** = $p < 0,01$, * = $p < 0,05$ et #### = p <0,0001, ### = $p < 0,001$, ## = $p < 0,01$, # = $p < 0,05$.

Le logiciel Igor Pro 9.0 (Wavemetrics) a été utilisé pour la représentation graphique des données physico-chimiques. L'analyse des données Q-ACSM et EESI-TOF-MS a été réalisée à l'aide du logiciel Tofware version 4.1.1 (Tofwerk AG et Aerodyne Research) intégré dans Igor Pro. Les données EESI-TOF-MS originales ont été acquises à une résolution de 1 Hz et ont ensuite été moyennées sur 10 secondes, après quoi l'ajustement des pics haute résolution a été effectué sur la gamme m/z 100-400 et les pics ajustés ont été attribués à des formules moléculaires avec des nombres de carbone allant de C5 à C20. Les données des CPC et SMPS ont été acquises et traitées avec le logiciel constructeur Aim 10.3 (Aerosol

Chapitre 4 – Résultats et discussion

Chapitre 4 : Résultats et discussion

Ce chapitre présente et discute les résultats expérimentaux obtenus durant cette thèse. La première section est consacrée au développement et à la caractérisation d'un modèle alvéolaire *in vitro* en ALI. Elle comprend l'optimisation des conditions de culture, puis le développement et la validation d'un modèle de coculture A549/hAELVi. La deuxième section examine l'impact du flux d'air seul lors d'expositions dynamiques en ALI. Elle regroupe des résultats toxicologiques et transcriptomiques obtenus sur la coculture A549/hAELVi, ainsi qu'un ensemble de recommandations sur la réalisation d'exposition en ALI visant à harmoniser les paramètres les plus critiques à intégrer. La troisième section porte sur la génération d'AOS issus de l'oxydation de HAP et phénol, seuls ou en mélange, conditions de réactivité diurne (oxydation par le radical OH) ou nocturne (oxydation par le radical NO_3), leur caractérisation physico-chimique, et l'évaluation de leurs effets toxicologiques sur le modèle de coculture A549/hAELVi, avec une mise en perspective des relations entre leurs caractéristiques physico-chimiques et les réponses biologiques.

4.1. Développement et caractérisation d'un modèle simulant l'épithélium alvéolaire pour des études de toxicité *in vitro* en ALI

Cette section présente le développement et la caractérisation d'un modèle alvéolaire humain in vitro en ALI destiné aux études de toxicité respiratoire. Ces résultats et leurs discussions ont déjà fait l'objet d'une publication scientifique dans un journal international à comité de lecture, en accès libre (Alunni et al., 2026). Les conditions de culture des lignées A549 (PT2-like) et hAELVi (PT1-like) ont d'abord été optimisées afin d'assurer leur compatibilité en coculture, une croissance comparable et le maintien de leurs caractéristiques phénotypiques. Une attention particulière a été portée au choix du milieu nutritif utilisé pour la lignée A549, dont l'influence sur leur morphologie, leur croissance et leurs propriétés fonctionnelles a fait l'objet d'une caractérisation approfondie. Cette étape d'optimisation visait à établir des conditions expérimentales robustes et reproductibles, nécessaires à la mise en place d'un modèle de coculture cellulaire physiologiquement pertinent au regard de l'épithélium alvéolaire humain.

4.1.1. Optimisation des conditions de culture de la coculture A549/hAELVi

4.1.1.1. Choix des lignées

Compte tenu des objectifs du travail présenté ici et des connaissances bibliographiques, l'association de la lignée A549 (PT2-like) avec la lignée hAELVi (PT1-like) est apparue comme une stratégie prometteuse pour modéliser l'épithélium alvéolaire humain. Ces deux lignées ont largement été décrites et utilisées dans la littérature, et leur résistance aux expositions continues en ALI a été démontrée. La lignée A549, présentant un phénotype PT2-like est largement utilisée dans les études de toxicologie pulmonaire (Foster et al., 1998 ; Wu et al., 2018). Outre son utilisation routinière, le comportement de la lignée A549 en ALI a été largement caractérisé et son exposition continue en ALI a déjà été réalisée pour des durées prolongées (≤ 24 h) (Foster et al., 1998; Cooper et al., 2016; Wu et al., 2018; Gualtieri et al., 2024). La lignée hAELVi, décrite comme PT1-like, a été privilégiée par rapport à d'autres

modèles, tels que NCI-H441, dont le phénotype dépend des conditions de culture, notamment de l'ajout de dexaméthasone (Gazdar et al., 1990; Neuhaus et al., 2012; Kuehn, 2016; Ren et al., 2016). Cette lignée avait déjà été utilisée dans des études pharmacologiques ou d'infection pulmonaire (SARS-CoV-2), principalement en raison de l'intégrité de la barrière cellulaire qu'elles constituent, et l'exposition dynamique en l'ALI de cette lignée était assez fréquente (Heck et al., 2019; Leibrock et al., 2019; Brandt et al., 2020; Diem et al., 2020; Metz et al., 2020; Mills-Goodlet et al., 2020; Sakagami, 2020; Mache et al., 2022; Visigalli et al., 2022; Berggren-Nylund et al., 2023; Boulé et al., 2025; Fredoc-Louison et al., 2025; Simon et al., 2025).

La mise en place du modèle de coculture alvéolaire a nécessité l'optimisation rigoureuse de plusieurs paramètres expérimentaux, notamment le choix des conditions de culture, l'équilibre de croissance entre les deux lignées cellulaires et la détermination du temps maximal d'exposition compatible avec le maintien de l'intégrité cellulaire. Par ailleurs, l'optimisation des conditions de culture par supplémentation du milieu nutritif en acide rétinoïque appliquée à la lignée A549 a mérité une attention particulière. La réévaluation de ses caractéristiques phénotypiques, en parallèle du développement d'un modèle de coculture, est apparue comme une stratégie pertinente pour proposer une alternative simple et économiquement accessible.

4.1.1.2. Ratio d'ensemencement des lignées et son maintien dans le temps

Les tailles respectives des cellules hAELVi et A549 ne représentent pas celles observées *in vivo*, conditions dans lesquelles ce ratio entre les tailles des PT1 et des PT2 est d'environ de dix (Mason and Crystal, 1998; Williams, 2003; Mason, 2006). Cependant, le ratio des lignées hAELVi et A549 est de deux (Figure 4. 1.). Ainsi, pour mieux représenter la composition alvéolaire, le ratio d'ensemencement cellulaire a été choisi pour respecter les proportions de population : 40% de PT1 (hAELVi) et 60% de PT2 (A549) (Mason and Crystal, 1998; Williams, 2003; Mason, 2006).

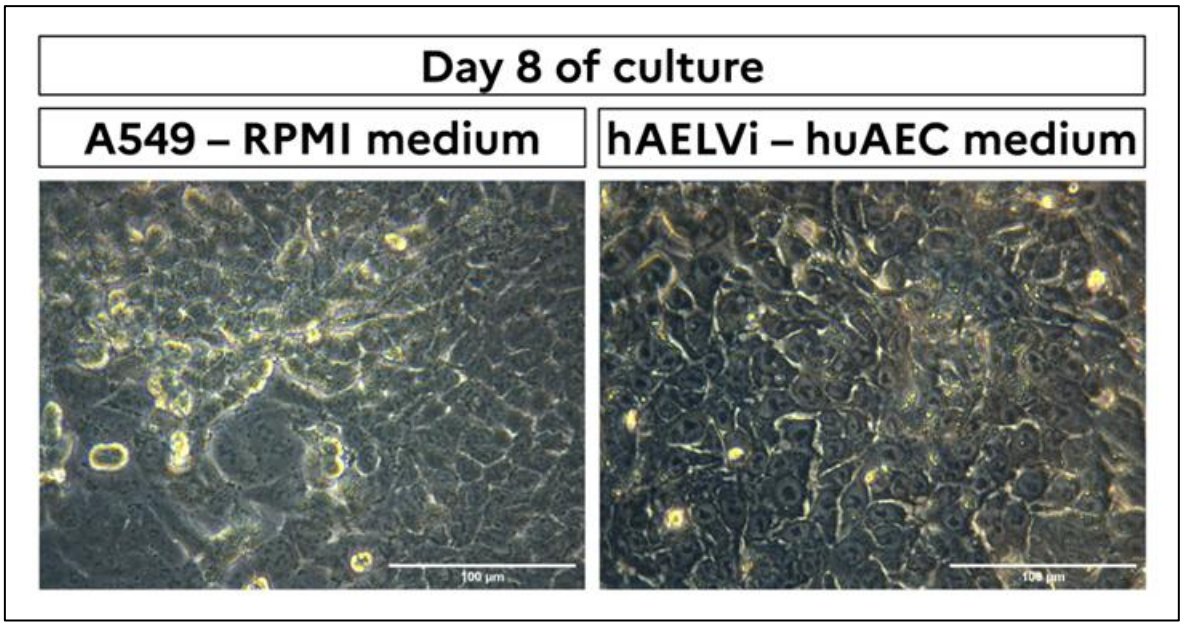


Figure 4. 1. : Morphologie des lignées cellulaires en monoculture dans leur milieu de culture respectif après huit jours de culture en condition submergée. Lignée A549 cultivées dans le milieu RPMI 1640 (gauche) et lignée hAELVi cultivées dans le milieu huAEC (droite). Images représentatives acquises au grossissement ×200. Barre d'échelle : 100 µm.

Les deux lignées alvéolaires ont un temps de doublement cellulaire différent : ≈ 20 h pour la lignée A549 contre ≈ 35 h pour la lignée hAELVi. Compte tenu de son origine cancéreuse, la lignée alvéolaire A549 se multiplie de façon anarchique. Cette prolifération excessive pouvait supplanter une lignée immortalisée plus stable et, par conséquent, changer le ratio original. En proliférant ainsi, les cellules A549 entravaient la coculture à long terme en formant des agrégats cellulaires multicouches empêchant une exposition homogène (Figure 4. 1.). Pour une culture et une exposition en ALI prolongée, il était nécessaire de définir des conditions de culture garantissant un ratio A549/hAELVi stable et cohérant avec la physiologie alvéolaire humaine.

4.1.1.3. Optimisation des conditions de culture

Chaque lignée possède son propre milieu nutritif. La lignée A549 est généralement cultivée dans du milieu synthétique non défini, RPMI 1640, tandis que la lignée hAELVi doit être cultivée dans un milieu synthétique défini, huAEC (selon les recommandations du fournisseur Inscreenex). Il est désormais établi que les conditions de culture continues, notamment le choix du milieu nutritif, la durée de différenciation ou de culture à l'ALI,

peuvent influencer significativement le phénotype et le comportement des cellules en culture (Cooper et al., 2016; Wu et al., 2018; Purkayastha et al., 2020).

L'objectif était d'identifier un milieu commun aux deux lignées cellulaires permettant de limiter la prolifération des A549, garantissant une croissance optimale et similaire des deux lignées. L'acide rétinoïque (AR) est un messager chimique dérivé de la vitamine A, impliqué dans les voies de signalisation essentielles, notamment la différenciation cellulaire, l'organogenèse précoce et le remodelage tissulaire (Duester, 2008; Fernandes-Silva et al., 2020). L'AR est également reconnu comme suppresseur de tumeurs en raison de sa capacité à arrêter le cycle cellulaire et à induire la différenciation cellulaire (Nagpal, 2004). Des études portant sur le potentiel de l'AR dans le traitement du cancer ont démontré une réduction significative de la prolifération de la lignée cancéreuse A549 (Li, Gao, et al., 2015; de Miranda Ramos et al., 2019).

En ce sens, des monocultures d'A549 et hAELVi en ALI ont été cultivées en condition submergée avec les milieux RPMI 1640 et huAEC supplémentés avec différentes concentrations d'AR (0, 1, 10 et 20 µM). Des courbes de croissances (Figure 4. 2.) ont été réalisées.

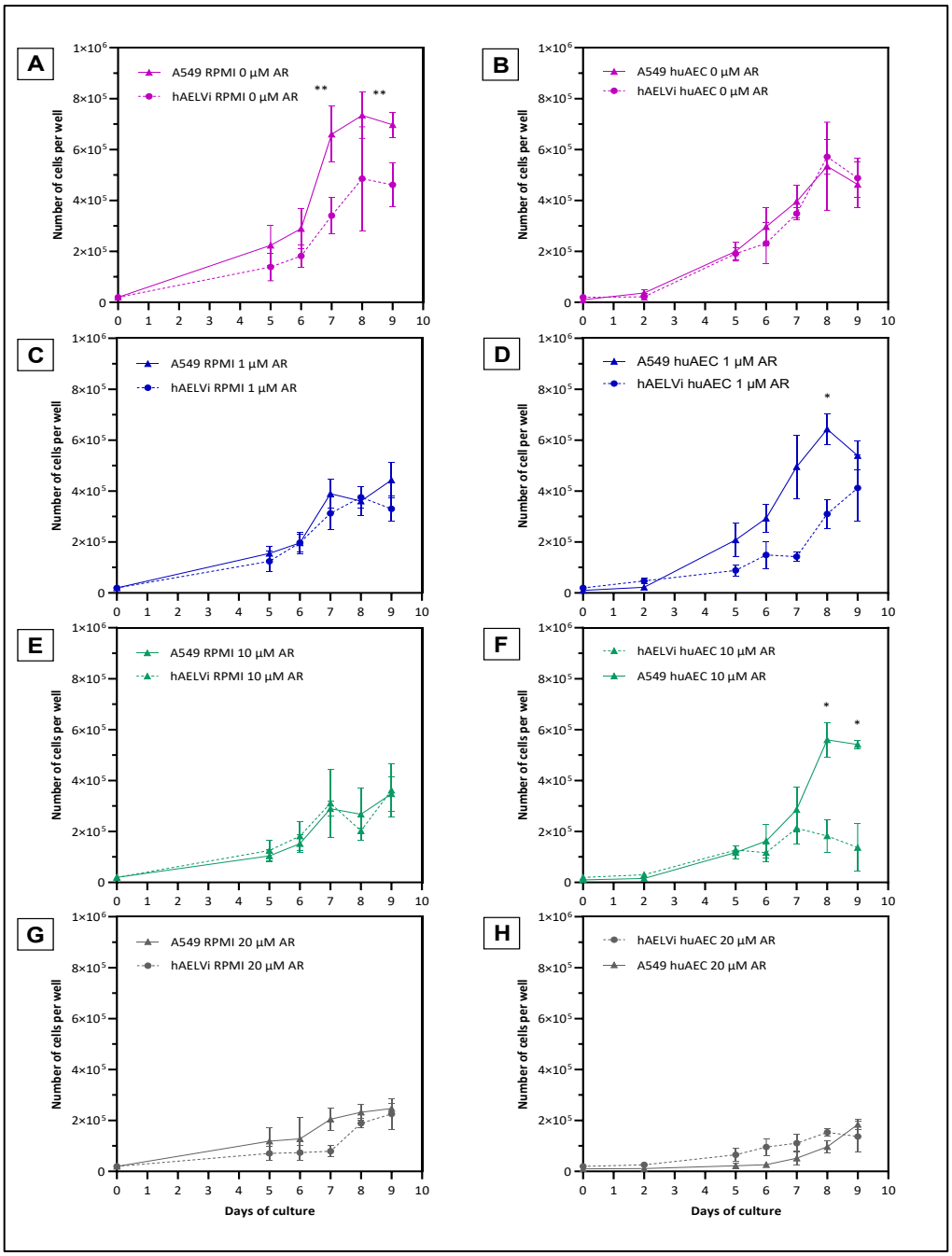
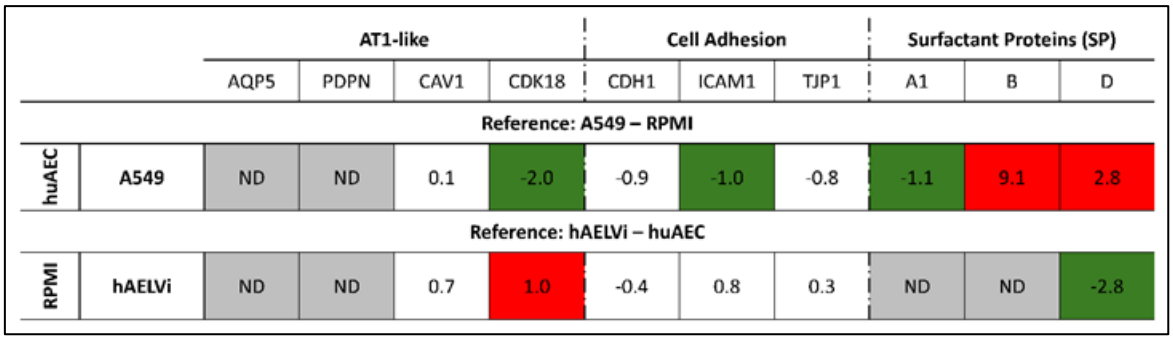


Figure 4. 2. : Courbes de croissance sur neuf jours des lignées cellulaires A549 et hAELVi cultivées dans les milieux RPMI 1640 (A, C, E, G) et huAEC (B, D, F, H), supplémentés avec des concentrations croissantes en acide rétinoïque (AR) : 0 µM (A, B), 1 µM (C, D), 10 µM (E, F) et 20 µM (G, H). Les lignes pleines correspondent à la lignée A549 et les lignes pointillées à la lignée hAELVi. Les données sont présentées sous forme de moyenne ± écart-type (n = 9) issues de trois expériences indépendantes (*p < 0,01, ; **p < 0,001).

Les courbes de croissance ont montré que le milieu RPMI 1640 seul n'était pas adapté à la mise en place de la coculture (Figure 4. 2. A). En absence d'AR, les deux lignées présentaient des cinétiques de prolifération significativement différentes avec des divisions plus importantes pour les cellules A549 par rapport aux cellules hAELVi. La supplémentation du milieu RPMI en AR réduit la prolifération des deux lignées de manière dose-dépendante et tend à homogénéiser leurs vitesses de croissance (Figure 4. 2. C, E, G). Toutefois, cette diminution importante de la prolifération allongeait considérablement le temps nécessaire à l'établissement du modèle cellulaire, rendant ces conditions peu adaptées à la coculture. De plus, une inhibition marquée de la multiplication cellulaire suggérait l'existence de modifications moléculaires importantes. Or, l'objectif derrière le développement de ce modèle était de limiter les perturbations pour préserver les caractéristiques intrinsèques des deux lignées et d'éviter l'apparition de changements biologiques majeurs.

Dans le milieu huAEC, les deux lignées présentaient des cinétiques de croissance très similaires (Figure 4. 2. B). Cette convergence semblait liée à une légère diminution de la prolifération des cellules A549 dans ce milieu, probablement due à la présence d'environ 0,1 µM d'AR dans sa formulation (informations du fournisseur Inscreenex). La supplémentation en AR (1 – 20 µM) a, en revanche, entrainé une diminution marquée de la croissance, en particulier pour la lignée hAELVi (Figure 4. 2. D, F, H).

Ces premiers résultats indiquaient que le milieu huAEC seul constituait la condition la plus adaptée pour obtenir une prolifération comparable des deux lignées, condition essentielle à l'établissement d'un modèle de coculture stable. Lors du suivi morphologique par imagerie microscopique (non présenté ici), peu de cellules mortes étaient visibles, indiquant une inhibition de la cinétique de croissance des cellules A549 et non une toxicité induite. Néanmoins, une prolifération similaire ne garantissait pas le maintien des caractéristiques phénotypiques propres à chaque lignée. Afin de vérifier si ces conditions de culture préservaient les phénotypes PT1 et PT2, l'expression de marqueurs spécifiques des pneumocytes a été évaluée par RT-qPCR sur des monocultures de cellules A549 et hAELVi après 24 h d'habituation à l'ALI (Figure 4. 3.).



		AT1-like				Cell Adhesion			Surfactant Proteins (SP)		
		AQP5	PDPN	CAV1	CDK18	CDH1	ICAM1	TJP1	A1	B	D
Reference: A549 – RPMI											
huAEC	A549	ND	ND	0.1	-2.0	-0.9	-1.0	-0.8	-1.1	9.1	2.8
Reference: hAELVi – huAEC											
RPMI	hAELVi	ND	ND	0.7	1.0	-0.4	0.8	0.3	ND	ND	-2.8

Figure 4. 3. : Expression relative de gènes spécifiques des PT1 (*Aquaporin-5, AQP5; Podoplanin, PDPN; Caveolin-1, CAV1*), de l'adhésion cellulaire (*Cadherin 1, CDH1; Intercellular adhesion molecule1, I-CAM 1; Tigh junction protein 1, TJP 1*) et des protéines du surfactant (*Surfactant protein, SP-A; B; D*) dans les lignées hAELVi et A549 après 24 h d'adaptation à l'ALI par RT-qPCR. Les lignées A549 cultivées en milieu huAEC sont comparées à leur condition de référence en RPMI, tandis que les lignées hAELVi cultivées en RPMI sont comparées à leur condition de référence en huAEC. Les résultats sont exprimés en Log2foldchange des valeurs RQ. Les valeurs en rouge correspondent à Log2FC ≥ 1, celles en vert à Log2FC ≤ -1, et les cases grisées indiquent des gènes non détectés (ND ; CT > 36). Les données sont issues de trois réplicas biologiques (n = 3) provenant d'une expérience indépendante.

De façon inattendue, la lignée hAELVi cultivée en milieu huAEC a montré une expression faible mais détectable de marqueurs PT2 tels que *SP-A1* et *SP-D* suggérant que le phénotype de cette lignée n'était pas pleinement stabilisé vers un phénotype PT1-like. A l'inverse, sa culture dans du milieu RPMI a présenté une surexpression de *CDK18* suggérant l'induction d'un stress cellulaire. L'extinction de l'expression de *SP-A1* et la sous-expression de *SP-D* dans ces conditions ont également suggéré une modulation des voies de signalisation associées aux protéines du surfactant, compatible avec un état de stress cellulaire.

La culture de la lignée A549 en milieu huAEC s'est accompagnée de modifications transcriptionnelles cohérentes avec l'inhibition de sa prolifération. La sous-expression de *CDK18* a suggéré une diminution du stress réplicatif et du cycle cellulaire (Barone et al., 2016; Matsuda et al., 2017; Pepino et al., 2021). L'expression de *ICAM-1*, classiquement induit lors de réponse (pro)-inflammatoire et dans les processus d'interaction cellules-cellules, a également diminué, ce qui pourrait refléter une atténuation de l'état (pro)-

inflammatoire observé dans les cellules cancéreuses (Collins et al., 1995; Fingar et al., 1997; Fraire et al., 2003; Dymicka-Piekarska and Kemona, 2009; Kotteas et al., 2014; Bui et al., 2020). Parallèlement, l'augmentation des niveaux d'expression de *SP-B* et *SP-D*, associée au maintien de l'expression de *SP-A1*, a supporté un renforcement du phénotype PT2 de la lignée A549 (Lieber et al., 1976; Foster et al., 1998; Mason, 2006; Mousseau, 2019). La régulation différentielle des protéines du surfactant pourrait refléter l'activation de mécanismes de sécrétion du surfactant et indiquer une adaptation des cellules à leur mise en contact avec l'air. Ces observations, en accord avec des études précédentes sur l'impact du temps de différenciation en ALI de la lignée A549 (Cooper et al., 2016), ont suggéré que 24 h d'habituation à l'ALI restaient insuffisantes pour atteindre un état stable. En effet, plusieurs études ont montré que la culture en ALI induisait chez cette lignée des modifications morphologiques et fonctionnelles progressives, nécessitant plusieurs jours pour se stabiliser (Figure 4. 4.) (Cooper et al., 2016; Wu et al., 2018).

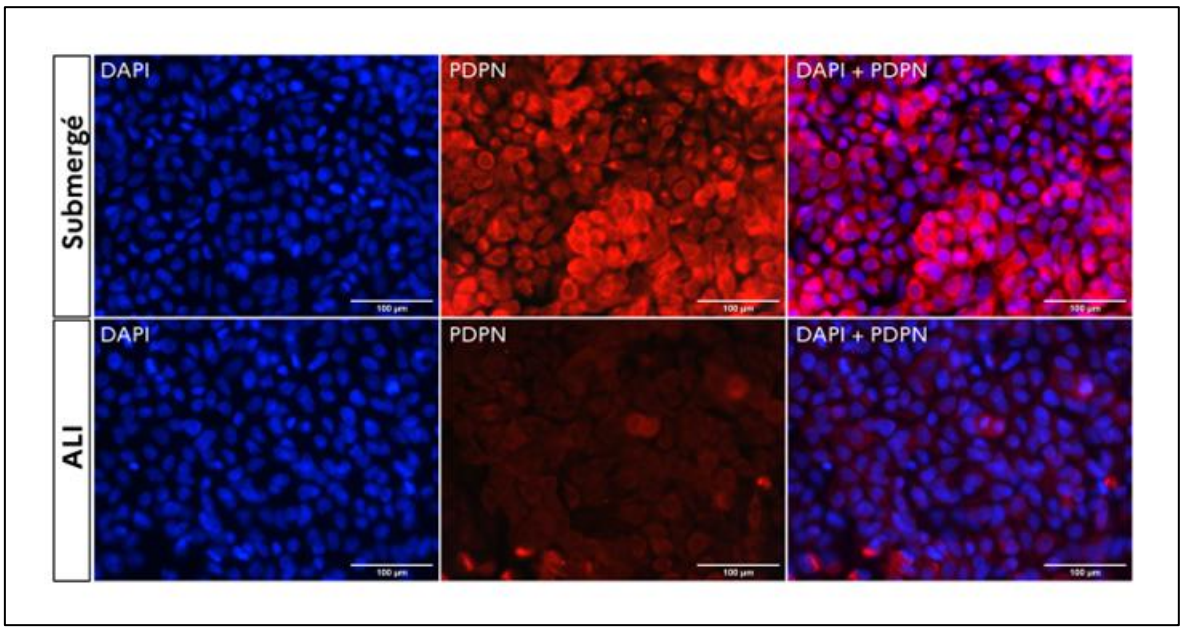


Figure 4. 4. : Immunomarquage de la podoplanine (PDPN) dans la lignée A549 en condition submergée et après 24 h d'habituation à l'ALI. PDPN, marqueur des PT1, est marquée en rouge tandis que le DAPI, marqueur nucléaire, a coloré les noyaux en bleu. Images représentatives acquises au microscope à épifluorescence au grossissement ×200. Barre d'échelle : 100 µm.

En condition submergée, les cellules exprimaient la protéine de surface podoplanine (PDPN) spécifique des PT1. Cependant, après seulement 24 h en condition ALI, l'expression du gène était indétectable (Figure 4. 3.) et la production protéique diminuait (Figure 4. 4.). Ces observations étaient en accord avec les résultats précédents suggérant que la culture en ALI induisait la différenciation des cellules A549 et les stabilisait vers un phénotype PT2-like.

Dans l'ensemble, ces résultats ont indiqué que le milieu huAEC apparaissait comme le plus adapté à la coculture des deux lignées alvéolaires. La présence d'AR et de composés anti-inflammatoires dans ce milieu semblait contribuer à la fois à l'inhibition de la prolifération des cellules A549 et à la diminution de leur état d'activation. Par ailleurs, la capacité de cette lignée à exprimer les gènes codant les protéines du surfactant en milieu huAEC constituait un élément important pour le développement d'un modèle *in vitro* représentatif de l'épithélium alvéolaire. Ces résultats ont également souligné l'importance d'une phase d'habituation en ALI avant l'exposition du modèle. Un temps de différenciation supérieur à 24 h pourrait s'avérer nécessaire pour stabiliser le profil des lignées cellulaires et par la même occasion, limiter les perturbations induites par les conditions d'expositions à l'ALI, qui pourraient avoir des effets significatifs sur l'état physiologique des cellules. Dans ce contexte, l'optimisation des conditions de culture des cellules A549 apparaissait nécessaire afin de mieux contrôler leur prolifération et de stabiliser leur phénotype en conditions ALI.

4.1.2. Optimisation du modèle A549 par supplémentation du milieu nutritif en acide rétinoïque (AR)

L'utilisation d'AR a également été explorée afin d'améliorer les caractéristiques phénotypiques de la lignée A549. Les propriétés de la lignée A549 cultivée avec de l'AR ont été réévaluées en parallèle du modèle de coculture dans l'objectif de proposer une alternative simple, rapide et peu coûteuse pour les études de toxicologie par inhalation en ALI. Bien que ce modèle ne reproduisait pas l'ensemble de la complexité de l'épithélium alvéolaire, il pouvait constituer une solution accessible pour les laboratoires souhaitant intégrer des expositions en ALI dans leurs études sur polluants atmosphériques.

4.1.2.1. L'AR inhibe la prolifération des A549

La supplémentation du milieu RPMI en AR s'est avérée intéressante pour la culture de la lignée A549, car elle induisait une inhibition dose-dépendante de la prolifération cellulaire (Figure 4. 5.). Cette optimisation des conditions de culture pouvait permettre l'utilisation de ce modèle sur des durées plus longues en limitant la prolifération excessive de la lignée. Ainsi, l'ajout d'AR pouvait contribuer à améliorer la stabilité temporelle de ce modèle simple, robuste et largement utilisé, tout en atténuant l'une de ses principales limites, à savoir sa prolifération rapide.

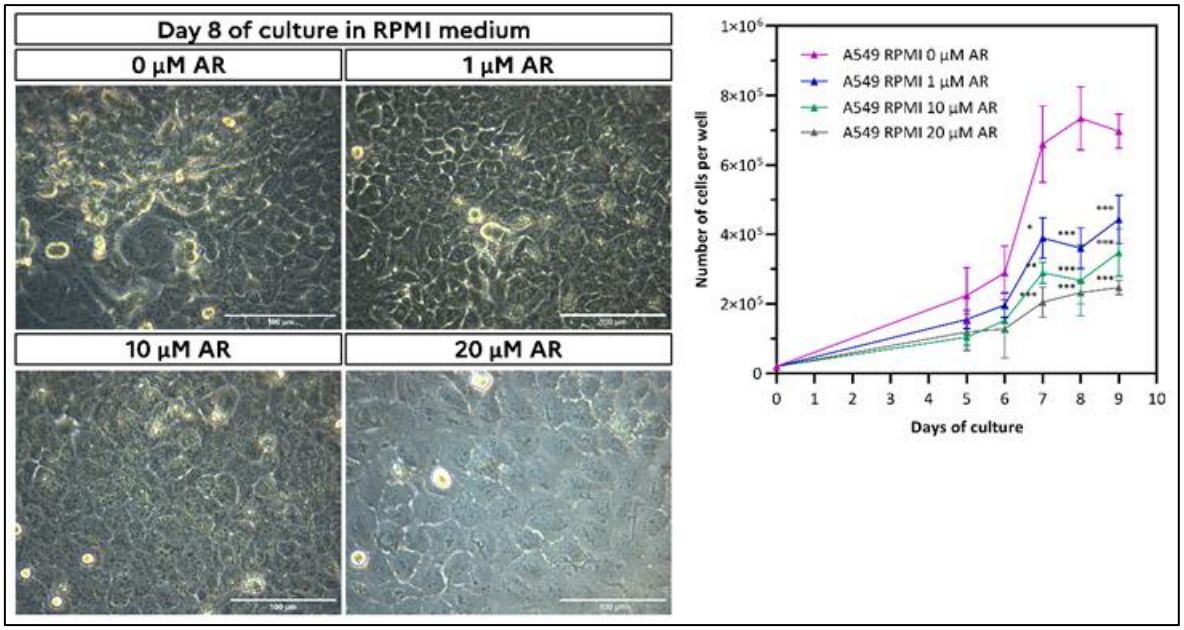


Figure 4. 5. : Morphologie et croissance cellulaire de la lignée A549 en monoculture cultivée en milieu RPMI 1640 supplémenté avec 0, 1, 10 et 20 µM d'AR en condition submergée. À gauche, images représentatives des A549 après huit jours de culture, acquises au grossissement ×200. Barre d'échelle : 100 µm. À droite, courbes de croissance des A549 après 9 jours de culture. Les données sont présentées sous forme de moyenne ± écart-type (n = 9) issues de trois expériences indépendantes. Les différences statistiques sont calculées par rapport à la condition 0 µM d'AR (*p < 0,01 ; **p < 0,001 ; ***p < 0,0001).

L'inhibition de la prolifération par l'AR s'accompagnait de modifications morphologiques du tapis cellulaire. Une homogénéisation de la monocouche a été observée, avec une diminution des agrégats cellulaires et une augmentation de la taille des

cellules, qui occupaient davantage la surface du support de culture. À la concentration de 20 µM, l'inhibition de la croissance était particulièrement marquée : après dix jours de culture, les cellules n'atteignaient toujours pas la confluence. Dans le cadre de l'amélioration d'un modèle destiné à être mis en place rapidement, cette condition n'a pas été retenue.

4.1.2.2. L'AR inhibe la migration de la lignée A549

Les cellules cancéreuses sont reconnues pour leur capacité migratoire et prolifératives très utiles en culture cellulaire. Pour compléter les résultats obtenus de l'influence de l'AR sur la prolifération cellulaire, un test de cicatrisation (« scrach assay ») a été réalisé pour étudier la capacité de migration des cellules A549 (Zadzinski, E., 2025). Les cellules ont été cultivées dans du milieu RPMI avec 0, 1 ou 10 µM d'AR en condition submergée. A confluence, les monocouches ont été griffées pour creuser une zone acellulaire de largeur similaire entre les différentes conditions. La fermeture de la griffure a ensuite été suivie par imagerie pendant 96 h (Figure 4. 6.).

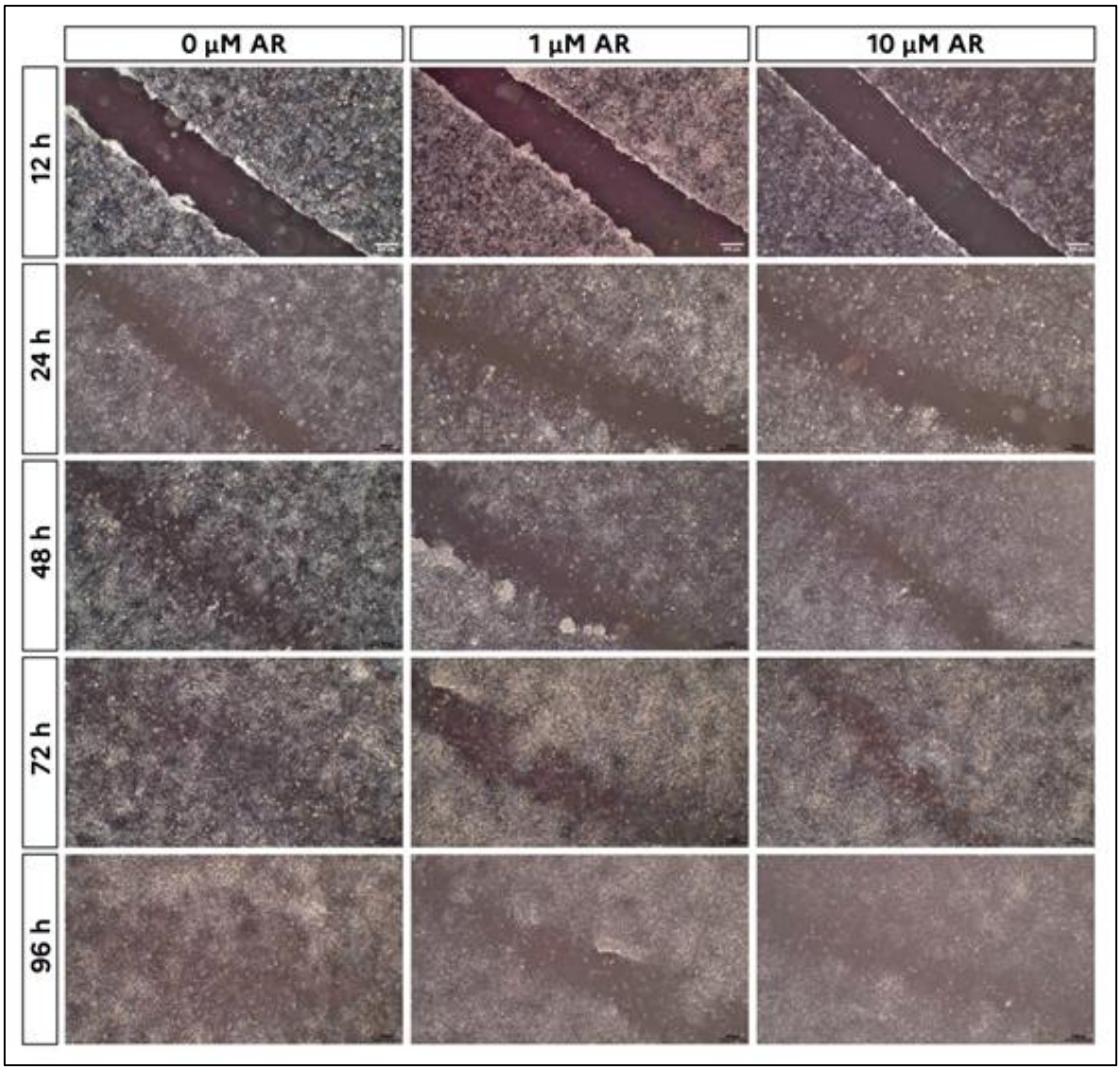


Figure 4. 6. : Suivi de la capacité de migration par test de griffure de la lignée A549 en culture dans du milieu RPMI supplémenté avec 0, 1 ou 10 µM d'AR en condition submergée. Les images ont été acquises après 12, 24, 72 et 96 h post-griffure au grossissement ×40. Barre d'échelle : 100 µM.

Les images ont montré que la fermeture de la griffure dépendait fortement de la concentration en AR. En absence de supplémentation, les cellules A549 recolonisent rapidement la zone acellulaire et la griffure est totalement refermée au bout de 48 h. En revanche, dans les conditions supplémentées avec 1 et 10 µM d'AR, la fermeture de la griffure était significativement plus lente et nécessitait environ 96 h pour être complète. Ces observations suggéraient que l'AR inhibait la capacité migratoire des cellules A549 en cohérence avec l'inhibition de leur prolifération précédemment observée. Cette perte de

capacité migratoire pouvait contribuer à stabiliser le tapis cellulaire et à limiter les agrégations cellulaires. Dans le contexte du développement d'un modèle cellulaire destiné à des expositions prolongées en ALI, cette propriété pouvait représenter un avantage en favorisant une organisation cellulaire plus stable et homogène au cours du temps.

L'inhibition de la prolifération et de la migration cellulaire étaient cohérentes avec les travaux précédemment rapportés par Miranda-Ramos et al (2019) (de Miranda Ramos et al., 2019). Toutefois, ces modifications morphologiques et physiologiques induites par l'AR pouvaient également s'accompagner de changements fonctionnels au niveau cellulaire. En effet, l'AR est un régulateur bien connu de la différenciation cellulaire et peut moduler l'expression de gènes impliqués dans l'identité phénotypique des cellules épithéliales.

4.1.2.3. L'AR impact peu le phénotype de la lignée A549

Afin d'évaluer l'impact de la supplémentation en AR sur le phénotype alvéolaire des cellules A549, l'expression de marqueurs spécifiques des PT1 et PT2 a été analysée par RT-qPCR (Figure 4. 7.).

		AT1-like				Cell Adhesion			Surfactant Proteins (SP)		
		AQP5	PDPN	CAV1	CDK18	CDH1	ICAM1	TJP1	A1	B	D
Reference: A549 – RPMI 0 µM AR											
RPMI	1 µM AR	ND	ND	0.4	0.1	-0.7	1.6	-0.2	0	ND	-0.2
	10 µM AR	ND	ND	-0.4	-0.2	-0.9	2.3	-0.1	ND	ND	-0.2

Figure 4. 7. : Expression relative de gènes spécifiques des PT1 (*Aquaporin-5, AQP5; Podoplanin, PDPN; Caveolin-1, CAV1*), de l'adhésion cellulaire (*Cadherin 1, CDH1; Intercellular adhesion molecule1, I-CAM 1; Tigh junction protein 1, TJP 1*) et des protéines du surfactant (*Surfactant protein, SP-A; B; D*) dans les lignées A549 après 24 h d'habituation à l'ALI par RT-qPCR. Les lignées A549 ont été cultivées cultivée en milieu RPMI supplémenté avec 1 ou 10 µM d'AR et ont été comparées à leur condition de référence en RPMI non supplémenté. Les résultats sont exprimés en Log2foldchange des valeurs RQ. Les valeurs en rouge correspondent à Log2FC ≥ 1, celles en vert à Log2FC ≤ -1, et les cases grisées indiquent des gènes non détectés (ND ; CT > 36). Les données sont issues de trois réplicas biologiques (n = 3) provenant d'une expérience indépendante.

Les résultats indiquaient que la supplémentation du milieu en AR induisait une surexpression dose-dépendante du gène *ICAM-1*. Parallèlement, l'expression du gène *SP-A1* a diminué avec l'augmentation de la concentration d'AR. À la concentration la plus élevée testée (10 µM), l'expression de ce gène n'était pas détectable. Bien qu'efficace pour limiter la prolifération cellulaire, la supplémentation en AR induisait également des modifications transcriptionnelles pouvant moduler l'état (pro)-inflammatoire de la lignée A549. La surexpression de *ICAM-1,* molécule d'adhésion impliquée dans les interactions cellulaires et les réponses inflammatoires, peut-être induite par différent stimuli tels que les cytokines IL-1β ou TNF-α, mais également par le stress oxydant (Wertheimer et al., 1992; Lo et al., 1993; Ledebur and Parks, 1995; Dymicka-Piekarska and Kemona, 2009; Kotteas et al., 2014; Bui et al., 2020). Dans ce contexte, l'augmentation de son expression pouvait refléter un état inflammatoire transitoire lié à la mise en ALI, susceptible d'induire un léger stress oxydant suggérant une meilleure sensibilité du modèle aux stimuli exogènes. Contrairement au milieu huAEC, le milieu RPMI ne contient pas de composés anti-inflammatoires pouvant atténuer cette réponse cellulaire.

Ces observations ont souligné l'importance d'un temps d'habituation suffisant en ALI avant l'utilisation du modèle pour des études toxicologiques. Par ailleurs, l'AR est un régulateur majeur de la différenciation cellulaire *via* l'activation des récepteurs nucléaires RAR/RXR, capables de moduler l'expression de nombreux gènes impliqués dans la différenciation épithéliale et les réponses inflammatoires. Ainsi, bien que l'AR contribue à stabiliser la croissance des cellules A549, il pourrait également influencer la sensibilité et donc la réponse du modèle aux conditions d'expositions ALI. L'optimisation de sa concentration et du temps d'adaptation à l'ALI apparaissait donc essentielle afin de maintenir les caractéristiques du modèle et d'améliorer sa stabilité lors d'expositions prolongées.

4.1.2.4. L'AR stabilise la lignée A549 lors d'une exposition prolongée à l'ALI

Afin d'évaluer l'intérêt de la supplémentation en AR pour l'utilisation du modèle A549 dans des conditions d'expositions prolongées, les cellules ont été cultivées en milieu RPMI supplémenté avec 0, 1 ou 10 µM d'AR, puis habituées 48 h à l'ALI avant d'être exposées à de l'air propre pendant 78 h *via* le système ALI Cultex®. Plusieurs paramètres physiologiques ont été évalués pour caractériser la réponse du modèle à cette exposition prolongée, notamment la cytotoxicité (LDH extracellulaire), l'activité métabolique, l'intégrité du tapis cellulaire (TEER) et le nombre de cellules présentes dans les inserts (Figure 4. 8.).

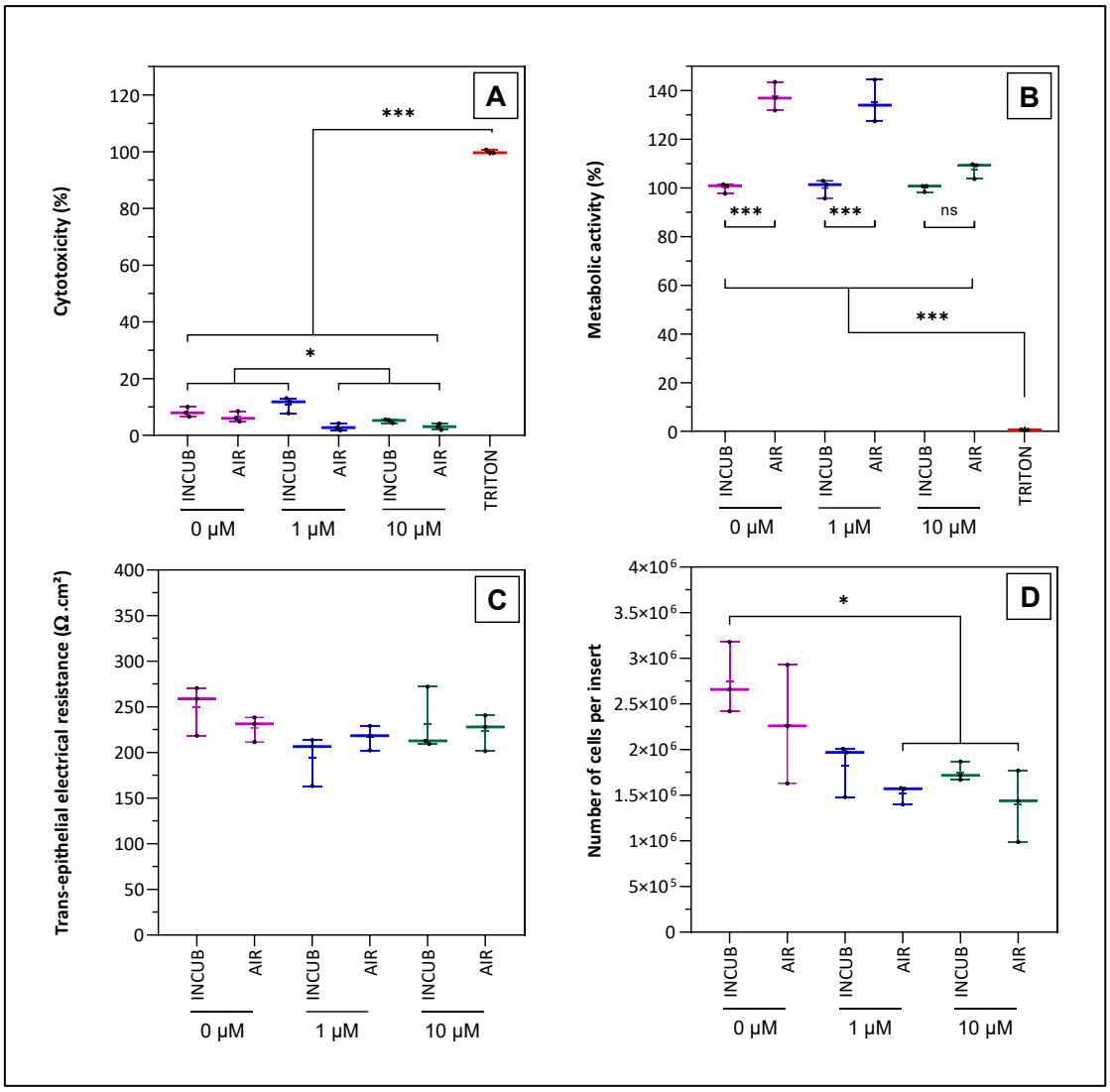


Figure 4. 8. : Cytotoxicité, Activité métabolique, intégrité du tapis cellulaire et nombre de cellules par insert des cellules A549 cultivée en milieu RPMI avec 0, 1 ou 10 µM d'AR, après 48 h d'habituation à l'ALI et 78 h d'exposition à de l'air propre avec le système Cultex®. (A) Évaluation des altérations de la membrane cellulaire par dosage de la lactate déshydrogénase (LDH). Les données sont exprimées en pourcentage du contrôle positif. (B) Évaluation de l'activité métabolique cellulaire par le test PrestoBlue™. Les données sont exprimées en pourcentage du contrôle négatif INCUB de chaque condition. (C) Evaluation de l'intégrité du tapis cellulaire par mesure de TEER. (D) Comptage du nombre de cellules par insert. Les données sont issues de deux expériences indépendantes (n = 6), dont deux expériences indépendantes (*p < 0,01 ; **p < 0,001 ; ***p < 0,0001).

L'exposition prolongée à l'air propre n'a pas entraîné d'altération majeure de l'intégrité du modèle. Cependant, les niveaux de LDH ont diminué significativement dans la condition supplémentée par 10 µM d'AR, aussi bien pour les cellules restées à l'incubateur que pour les cellules exposées à l'air propre, suggérant une diminution de la cytotoxicité dans cette condition. Par ailleurs, l'activité métabolique a augmenté significativement dans les conditions exposées à l'air propre pour les concentrations 0 et 1 µM d'AR, ce qui pourrait refléter une réponse métabolique liée au stress induit par l'exposition en ALI. En revanche, aucune différence n'a été observée entre les cellules restées à l'incubateur et celles exposées à l'air pour la condition 10 µM d'AR, suggérant que la supplémentation en AR atténuait l'impact de l'exposition prolongée. La mesure de la TEER n'a révélé aucune différence significative entre les conditions exposées et non exposées, ni entre les différentes concentrations d'AR. En revanche, le comptage cellulaire a mis en évidence une diminution progressive du nombre de cellules avec l'augmentation de la concentration en AR, confirmant l'effet inhibiteur de l'AR sur la prolifération des cellules A549. De plus, la réduction des écarts types observée dans les conditions supplémentées en AR a suggéré une meilleure homogénéité et reproductibilité du modèle, probablement liée au contrôle de la prolifération cellulaire.

Dans l'ensemble, ces résultats ont montré que la supplémentation du milieu en AR permettait de contrôler la prolifération des cellules A549 et d'améliorer la stabilité du modèle lors d'expositions prolongées en ALI, sans altérer l'intégrité de la barrière épithéliale. La diminution de la cytotoxicité et l'atténuation de la réponse métabolique observées dans les conditions supplémentées en AR ont suggéré que cette approche contribuait à renforcer la robustesse du modèle face aux contraintes expérimentales liées aux expositions prolongées. Ainsi, bien que reposant sur une seule lignée cellulaire et ne reproduisant pas l'ensemble de la complexité de l'épithélium alvéolaire, ce modèle de cellules A549 supplémentées en AR constituait une approche simple, rapide et reproductible pour l'étude d'expositions en ALI.

Dans la continuité de cette approche visant à améliorer la pertinence physiologique des modèles *in vitro*, le modèle de coculture alvéolaire associant les lignées A549 et hAELVi a été développé et caractérisé en parallèle afin de mieux représenter l'organisation cellulaire

de l'épithélium alvéolaire. Les données supplémentaires sont disponibles dans l'Annexe 1 de ce manuscrit de thèse.

4.1.3. Coculture des lignées cellulaires A549 et Ci-hAELVi comme nouveau modèle d'épithélium alvéolaire humain pour l'exposition à l'interface air-liquide

La pollution atmosphérique, notamment les gaz et les particules fines, menace la santé respiratoire en atteignant la région alvéolaire, représentée par les cellules PT1 et PT2, en ALI. Pour limiter l'usage des modèles animaux, des modèles *in vitro* pertinents sont nécessaires. Cette étude présente un modèle de coculture alvéolaire humaine simple et robuste en ALI, basé sur les lignées A549 (PT2-like) et hAELVi (PT1-like), en évaluant deux temps d'acclimatation (24 h et 6 jours) en conditions contrôlées et d'exposition à l'air.

La coculture a présenté une activité métabolique stable, une prolifération contrôlée et une variabilité réduite par rapport à la monoculture. Le modèle a exprimé des marqueurs complémentaires associés aux PT1 (podoplanine, *cavéoline-1*, aquaporine-5, HTI56) et PT2 (protéines tensioactives et HTII280) aux niveaux génique et protéique, aboutissant à un phénotype mixte. De manière significative, le modèle de coculture a maintenu l'intégrité épithéliale et la stabilité fonctionnelle lors d'une exposition prolongée de 72 h à l'ALI, dépassant ainsi la durée d'exposition typique d'un système de monoculture. De plus, la réactivité de la coculture à l'aérosol de ZnO et aux lipopolysaccharides a été testée, démontrant sa pertinence fonctionnelle. En conclusion, ce modèle de coculture pertinent constitue un outil *in vitro* précieux pour le criblage toxicologique préliminaire.

Lien de l'article : https://doi.org/10.1016/j.tiv.2026.106200

Toxicology in Vitro 112 (2026) 106200

Contents lists available at ScienceDirect

Toxicology in Vitro

journal homepage: www.elsevier.com/locate/toxinvit

A549 and Ci-hAELVi cell lines coculture as a new human alveolar epithelium model for air-liquid interface exposure

Aurelia Alunni [a,*], Ophélie Simonin [b], Guillaume Barbier [a], Maxime Floreani [a], Alexandre Albinet [a], Guillaume Garçon [c], Bénédicte Trouiller [a,*]

[a] Ineris, Parc technologique Alata BP2, 60550 Verneuil en Halatte, France
[b] Univ. Lille, CHU Lille, Institut Pasteur Lille, ULR 4483 - IMPECS - IMPact de l'Environnement Chimique sur la Santé humaine, F-59000 Lille, France
[c] Univ. Lille, Inserm, CHU Lille, U1172 - LilNCog - Lille Neuroscience & Cognition, F-59000 Lille, France

ARTICLE INFO

Editor: Maxime Culot

Keywords:
In vitro alveolar model
Surfactant production
ALI
Pulmonary toxicity
Prolonged air exposure
NAM

ABSTRACT

Air pollution represents a growing threat to human health, particularly affecting the respiratory system through the inhalation of gaseous pollutants and fine particles that reach the alveolar region composed mainly of alveolar epithelial type I (AT1) and type II (AT2) cells at the air-liquid interface (ALI). To reduce reliance on animal models, physiologically relevant and experimentally accessible *in vitro* models are increasingly needed for inhalation toxicology. In this study, we developed and characterized a simple and robust human alveolar coculture model at ALI using commercially available cell lines, A549 (AT2 phenotype-like) and Ci-hAELVi (AT1 phenotype-like). Two ALI acclimatization periods (24 h and six days) were evaluated under incubator control and clean air exposure conditions. The coculture exhibited stable metabolic activity, controlled proliferation, and reduced variability compared to monoculture. The model expressed complementary AT1- (Podoplanin, Caveolin-1, Aquaporin-5, HTI56) and AT2 pneumocyte-associated markers (surfactant proteins and HTII280) at the gene and protein levels, resulting in a mix of both the alveolar epithelial phenotypes. Importantly, the coculture model maintained epithelial integrity and functional stability during prolonged ALI exposure for up to 72 h, exceeding the typical exposure window of monoculture system. In addition, responsiveness of coculture with ZnO aerosol and lipopolysaccharides exposure, was tested demonstrating its functional relevance. Overall, this relevant coculture model provides a valuable *in vitro* tool for preliminary toxicological screening.

1. Introduction

Air pollution is a major environmental threat that contributes to a wide range of cardiovascular, neurological and respiratory effects, ranging from mild disorders to chronic diseases (Arfin et al., 2023; de Bont et al., 2022; Fu et al., 2019; Fuller et al., 2022; Heal et al., 2012; Kim et al., 2015, 2018; Landrigan, 2017; Lelieveld et al., 2015; Rajagopalan et al., 2018; Turner et al., 2020; World Health Organization, 2024). The updated Global Air Quality Guidelines (AQGs) issued by the World Health Organization (WHO) and the European and national legislations worldwide for key airborne pollutants, such as ozone (O_3), nitrogen oxides (NO_x), sulfur dioxide (SO_2), carbon monoxide (CO), volatile organic compounds (VOCs), particulate matter (PM), metals and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), are grounded in robust scientific evidence demonstrating significant adverse health effects, even at concentrations lower than previously considered harmful (Directive - EU - 2024/2881; WHO, 2025). However, despite extensive research efforts, a deeper comprehensive and detailed mechanistic understanding of the causal relationship between air pollutants and their adverse health effects remain needed. To do so, having physiologically relevant *in vitro* models of human alveolar epithelium for inhalation toxicology is essential for reducing and replacing animal use To better understand the causal relationship between air pollutants and their adverse lung effects, scientists notably need physiologically relevant *in vitro* models of human alveolar epithelium for reducing and replacing animal use (Hubrecht and Carter, 2019; Tannenbaum and Bennett, 2015; Russell and Burch, 1960).

The respiratory tract is lined by a continuous epithelial layer that plays a critical role in preserving lung homeostasis, particularly in alveoli which represent 99% of lung surface area (Guillot et al., 2013). This epithelium acts as a physical and biochemical barrier against air pollutants, supporting lung defense mechanisms through mucociliary

* Corresponding authors.
E-mail addresses: aureliaalunni@gmail.com (A. Alunni), benedicte.trouiller@ineris.fr (B. Trouiller).

https://doi.org/10.1016/j.tiv.2026.106200
Received 19 September 2025; Received in revised form 20 December 2025; Accepted 21 January 2026
Available online 27 January 2026
0887-2333/© 2026 The Authors. Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

clearance and secretion of protective substances such as mucus, surfactant proteins, and antimicrobial peptides (Fehrenbach, 2001; Mason, 2006; Williams, 2003). In constant contact with inhaled air, alveoli are particularly vulnerable to atmospheric pollutants. They are constituted of three main cell-types: alveolar type I and alveolar type II pneumocytes (AT1 and AT2, respectively), and alveolar macrophages (AM). AT1 pneumocytes account for around 40% of the cell population and cover 95% of the alveolar surface. Thanks to their large surface area and thinness, they enable gaseous exchanges between inhaled air and blood (Stone et al., 1992; Williams, 2003). These cells represent the most surface in direct contact with air pollutants. AT2 pneumocytes of cuboidal shape, round nucleus, and granular cytoplasm, are the second cell type predominating in alveoli in number (60%). They periodically interrupt AT1 pneumocytes continuity and serve as their progenitors (Mason, 2006). Their specific feature is having lamellar bodies responsible for surfactant production. This surface-active agent covers the alveolar epithelium and functions as a continuous, biophysically active thin film, which is crucial for lung function as it stabilizes proportions of alveoli and prevents their collapse (Fehrenbach, 2001). Moreover, this protective layer can act as the final barrier against air pollution, trapping some of its particle or gaseous components (Alcorn, 2017; Siebert and Rugonyi, 2008).

In vitro lung models generally used in toxicology studies vary from basic cell-free biochemical assays to submerged cell monoculture systems, as well as more recent and advanced multicell-type coculture systems grown at air-liquid interface (ALI). In addition, to offering a more realistic simulation of real physiological conditions, ALI culture conditions provide a unique opportunity to expose lung *in vitro* cell systems to realistic complex aerosols (gas and particles). The defining characteristic of ALI culture is that the basal surface of the exposed cells is in contact with the liquid culture medium, while their apical surface is in contact to air (Baldassi et al., 2021; Cao et al., 2021; Jaber and Billet, 2024; Lacroix et al., 2018; Navarrete-Aliaga et al., 2025; Paur et al., 2011; Salana and Verma, 2024). Using cell coculture systems exposed at ALI could be more relevant for a deeper knowledge of the underlying cellular and molecular mechanisms of toxicity triggered by the exposure to air pollutants (Salana and Verma, 2024).

At present, particular interest is currently being shown for alveolar cell models based on alveolar epithelial cells, traditionally recognized for their critical roles in gas exchange and now understood to have a broader range of functions, playing a crucial role in respiratory host defense (Hiemstra et al., 2019; Salana and Verma, 2024). The primary sources of alveolar epithelial cells include immortalized or tumor-derived cell lines, primary cells isolated from lung tissues, and differentiated induced pluripotent stem cells (iPSC) (Selo et al., 2021). However, most established cell lines only partially mimic characteristics of epithelial cells found *in vivo* and generally lack proper differentiation profiles. In contrast, primary cells retain the advantage of not being modified for proliferation, which allows them to exhibit physiological behavior more representative of human alveolar epithelium. Historically, their limited lifespan, high cost, and inter-donor variability have favored the use of immortalized or tumor-derived lines, which are more practical and economical (Tanabe et al., 2024). However, recent advances in culture and propagation of primary or iPSC-derived human alveolar stem cells now make it possible to obtain stable and functional populations for *in vitro* studies (Abo et al., 2022; Hurley et al., 2020; Jacob et al., 2017; Kathiriya et al., 2022). iPSC models readily generate AT2-like cells, whereas the production of AT1-like phenotypes remains more complex, with maturity and stability often declining over time (Abo et al., 2022; Bluhmki et al., 2021). Primary organoids derived from stem cells also provide relevant models, but they have not yet been adapted to ALI conditions (Barkauskas et al., 2013, 2017; Kathiriya et al., 2022). Thus, models based on primary cells or human stem cells represent a new generation of physiologically relevant alveolar cultures despite significant technical constraints. These systems are more suited to physiological than toxicological studies but remain difficult to implement in real-world experiments. While more complex, stable and ALI-compatible models are likely to emerge in near future, our current focus is on developing a rapid and simple coculture model that can be easily established in any cell culture laboratory. The use of such easier-to-use models allows for preliminary toxicological screening of air pollutants while preserving physiological relevance, and can subsequently be validated using the models based on primary cells or human stem cells adapted for ALI culture.

To date, most of research on air pollutant-induced lung toxicity relied on A549 cell line (Navarrete-Aliaga et al., 2025; Salana and Verma, 2024). A549 cells (ATCC: CRM-CCL-185™) are human alveolar epithelial cells characterized as AT2 phenotype (Berger et al., 1999; Wu et al., 2018). Despite their relatively good ability to survive at ALI for several hours, this cell line does not faithfully represent alveolar epithelium. A combination of different alveolar cell lines, cocultured and exposed at ALI, may offer a more practical and relevant model that better reflects human alveolar environment for studying air pollutant-induced cellular and molecular adverse effects. A coculture of Ci-hAELVi (InScreenEx: INS-CI-1015, considered as AT1 pneumocytes) and NCI-H441 (ATCC: HBT-174™, considered as AT1 or AT2 pneumocytes) cell lines have been tested for barrier functions but prolonged exposure at ALI has not been assessed (Brookes et al., 2021). Recently, Mitchell et al. (2024) have developed a coculture model of TT1 cells (RRID: CVCL_G005) as AT1 pneumocytes, NCI-H441 as AT2 pneumocytes, and THP-1 cells (ATCC: TIB-202™) as macrophages (Mitchell et al., 2024). A large characterization has been carried out but TT1 cells do not express tight junctions. The TT1 cell line has not been extensively characterized, thus has not been frequently used for toxicological studies (Selo et al., 2021).

Hence, in this work, with the aim of getting closer to human *in vivo* conditions, we sought to develop a new alveolar coculture model of two commercially available cell lines, expressing specific characteristics of human alveolar epithelium, and suitable for relatively prolonged exposure periods at ALI. This new relevant model should be simple and quick to set up in any laboratory, and integrate also A549 cell line, considered in the literature as AT2 (Berger et al., 1999; Foster et al., 1998), in coculture with Ci-hAELVi, considered as AT1 (Kuehn et al., 2016). Through the development of this new alveolar cell model, derived from commercially available cell lines and attentively optimized for ALI exposure, our objective was to offer a relevant tool for *in vitro* inhalation toxicology to facilitate preliminary screening of air pollutant-induced adverse effects prior to employing other more differentiated and complex *in vitro* models.

2. Materials and methods

2.1. Cell culture

Human alveolar epithelial lentivirus immortalized cells (Ci-hAELVi, InScreenEx: INS-CI-1015) were purchased from InSCREENeX GmbH (Braunschweig, Germany) and cultured on huAEC coating solution in huAEC cell culture medium (InSCREENeX GmbH, Brunswick, Germany) added with 1% (*v*/v) penicillin/streptomycin (Gibco® – Sigma-Aldrich – Merck, Darmstadt, Germany). Human lung adenocarcinoma epithelial cells (A549, ATCC number: CCL-185 ™) were purchased from Sigma-Aldrich – Merck, Darmstadt, Germany, and maintained in RPMI 1640 cell culture medium (Gibco® – Sigma-Aldrich – Merck, Darmstadt, Germany) added with 10% (v/v) of heat-inactivated (65 °C for 60 min) fetal bovine serum (Gibco® - Sigma-Aldrich – Merck, Darmstadt, Germany) and 1% (v/v) penicillin/streptomycin (Gibco® - Sigma-Aldrich – Merck, Darmstadt, Germany). For both the cell lines, cells were used under 20 passages. Passages were performed when cells reach 80–90% confluence in T75 flasks (Tissue Culture Flask from TRP; Switzerland), with 0.05% (v/v) trypsin-EDTA (Gibco® – Sigma-Aldrich – Merck, Darmstadt, Germany). After centrifugation, A549 and Ci-hAELVi cells were resuspended in fresh huAEC cell culture medium for counting.

Each cell type was then recovered for use as described below. Once a month, a mycoplasma test was performed (MycoAlert™ Assay Control Set, Lonza, Rockland, ME USA).

2.1.1. Cell monoculture

Ci-hAELVi or A549 cells were seeded to confluence at 1.1×10^5 cells/cm^2 on Transwell® 6-well inserts (Corning 3450; polyester membrane; growth area: 4.67 cm^2, thickness: 10 µm, pore size: 0.4 µm, density: 4×10^6 pores/cm^2) by adding 1 mL of cell suspension in huAEC cell culture medium to the apical part of the insert and 1.5 mL of huAEC cell culture media to the basolateral part of the insert. All inserts were pre-coated with 500 µL of coating solution for 2 h at 37 °C and 5% CO_2, then washed with PBS. After 24 h of incubation, cells adherence to membrane support was checked. Medium in apical part of insert was removed and cells were washed with HBSS^{++} buffer supplemented with Mg^{2+} and Ca^{2+} (Gibco® - Sigma-Aldrich – Merck, Darmstadt, Germany) to establish ALI acclimatization. After 24 h of ALI for the short-term established model or 6 days of ALI for the prolong-term established model, cells were either ready for air exposure (named "AIR" condition) or maintained in incubator at 37 °C with 5% CO_2, as control (named "INCUB" condition).

2.1.2. Cell coculture

After harvesting, as described above, Ci-hAELVi and A549 cells were mixed to recover a proportion of 60% AT1 (also represented by Ci-hAELVi) and 40% AT2 (also represented by A549) pneumocytes, as reported in human alveolar epithelium *in vivo* (Mason and Crystal, 1998). After homogenization, cells were seeded to confluence (1.1×10^5 cells/cm^2) on Transwell® 6-well inserts, placed at ALI under same conditions as in monoculture in huAEC culture medium. The rationale to choose the huAEC cell culture medium for coculture is because the A549 cell line showed a slower growth in huAEC cell culture medium than in RPMI cell culture medium (Fig. S1 A), allowing both cells to stay stable at the initially intended ratio. In RPMI cell culture medium (Fig. S1 A), the respective growths of the two cell lines were significantly different while in huAEC cell culture medium (Fig. S1 B), they were almost similar.

2.2. ALI exposure

Two different exposure systems were used: a VitroCell® 6 PT-*CF* Module (VitroCell®, Gutach, Germany) for coculture characterization to expose cell mono- and coculture to clean air, and a Cultex® Radial Flow System (RFS) (Cultex® Technology GmbH, Hannover, Germany) to expose the coculture to clean air during 8, 24 and 72 h to characterize the air flow impact and positive control. The Cultex® RFS, more recently developed and acquired by our laboratory, allowed for prolonged dynamic exposure to airflow (up to 72 h). The VitroCell® system at our disposal, acquired more than 10 years ago, did not allow for prolonged exposure exceeding 24 h. The change in the type of dynamic ALI exposure system allowed us to demonstrate the reproducibility of the coculture model.

2.2.1. Conditions of air exposure

Clean air was obtained by pumping the ambient air from the laboratory room and treated through an activated carbon scrubber (Carbon activated, Chem-Lab, #CL00.1101.1000) and a HEPA particle filter (TSI, HEPA Capsule Filter, #1602051) before entering the ALI systems. Ambient air relative humidity (RH) and temperature of the room were regulated at 30–45% RH and 22 ± 0.5 °C. The temperature of the modules was adjusted to 37 °C with a regulated recirculation water bath. Incoming flow at each insert was adjusted at 10 mL/min of air and completed with pure CO_2 to obtain an atmospheric concentration of about 5% (*v*/v). Thirty minutes before each exposure, culture medium, was added into each chamber of the VitroCell® system or the Cultex® system, further heated at 37 °C with a heated water circulating system; only thereafter, airflow was initiated. This allowed the humidity to reach saturation inside the exposure chambers, initiating self-generated humidity. Thus, after 30 min, inserts with cultured cells were placed into exposure chambers where relative humidity was close to 80% and temperature was 37 °C (Tsoutsoulopoulos et al., 2016). Cell layer was not at risk of drying out or being impacted by water droplets due to condensation during exposure. Air flows were checked daily (or before and at the end of each experiment) using a calibrated flowmeter (Mass Flow Meter GMF, Analyt, #GMFS - 010449). Incorporating CO_2 into the

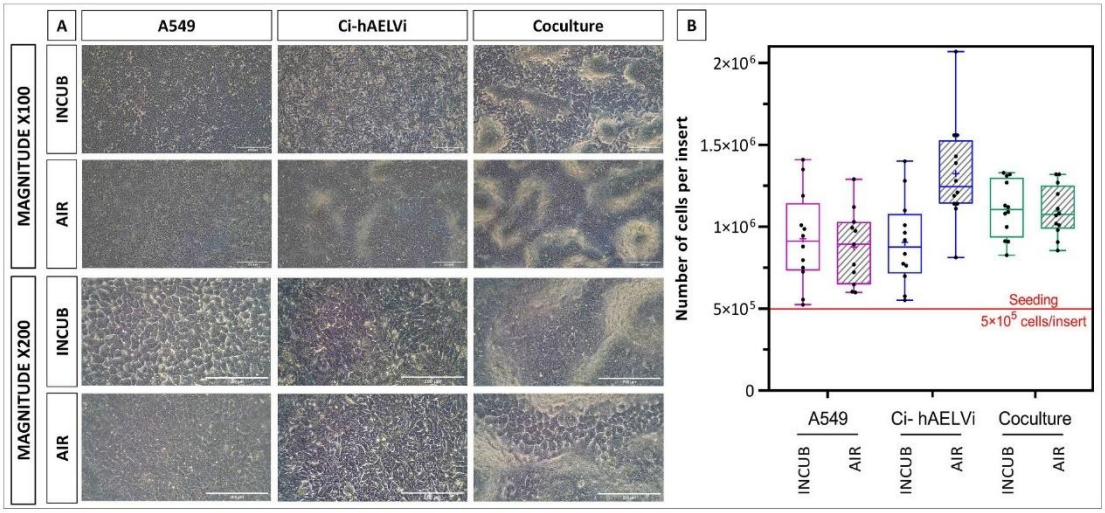


Fig. 1. Morphology and growth of A549 and Ci-hAELVi cells, in mono- and cocultures after six days of air-liquid interface (ALI) acclimatization and 24 h of air exposure with VitroCell® system. (A) Pictures of A549 and Ci-hAELVi cells in mono-and co-culture at the ALI after 24 h in incubator or exposure to air with an inverted optic microscope (× 100 and × 200). (B) Cell counts of A549 cells (pink boxplots), Ci-hAELVi cells (blue boxplots) and coculture cells (green boxplots) after 24 h in incubator (empty boxplots) or exposure to air control (hatched boxplots), red line represents initial number of seeded cells. The boxes represent the 25th and 75th percentiles of the data. The horizontal lines in the boxes and cross symbols represent the median and the mean values, respectively. All the data points are shown individually (black dots), the vertical lines represent ± SD (n = 12) from four independent experiments. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

incoming airflow allowed the alveolar microenvironment to be more accurately simulated, reflecting the typical human alveolar CO_2 concentration of 5–6% (v/v). (Bessaguet and Desmoulière, 2021; Krogh and Lindhard, 1914; Mackay, 1940; van den Velde et al., 2007). This also helped preserve physiological pH in the cell environment after removal from the cell incubator. Cells were either exposed to clean air (AIR) or kept in the incubator (INCUB) at 37 °C and 5% CO_2 as negative controls.

2.2.2. ALI exposure using the VitroCell® system

The ALI VitroCell® exposure device and protocol have been previously described in detail elsewhere (Loret et al., 2016). To study physiological changes in cell lines during air exposure, the ALI VitroCell® device was connected directly to clean air as control air (AIR). For all exposures, 17 mL of heated huAEC cell culture medium was added in each compartment below cell inserts. Inserts with either A549, Ci-hAELVi or coculture were exposed during 24 h in three modules in parallel. Three inserts per module were exposed (n = 3 inserts/condition). Experiments were repeated two times for the short-term acclimatization (24 h of ALI acclimatization) and four times for the prolonged acclimatization (six days of ALI acclimatization). Chambers of the ALI system including the heated medium and the inserts are equipped with temperature and humidity probes.

2.2.3. ALI exposure using the CULTEX® system

The ALI Cultex® exposure device and protocol for exposure to clean air (AIR) have been previously described in detail elsewhere (Tsoutsoulopoulos et al., 2019). The exposure conditions used during the characterization of the coculture with the ALI VitroCell® exposure system were transposed to 8, 24 and 72 h exposures with the ALI Cultex® exposure system (see Section 2.2.1.). The coculture inserts were exposed in two modules in parallel. Three inserts/module were exposed using the ALI Cultex® system (n = 3 inserts/condition), on 24 mL of huAEC cell culture medium in apical part of each well.

2.3. Positive controls

Triton X-100 (T8787, Sigma-Aldrich – Merck, Darmstadt, Germany), lipopolysaccharides from *Escherichia coli* (LPS, L2880, Merck, Darmstadt, Germany) and Zinc oxide (ZnO, CL00.2626.0250, Chem-Lab, Belgium) were used to exposed positive control cells to assess cytotoxicity and inflammation respectively.

2.3.1. Triton X-100 as positive control for cytotoxicity

Mono- and coculture were exposed to 1% (v/v) of Triton X-100 diluted with huAEC cell culture medium during 2 h on apical and basolateral part of inserts. Triton X-100 perforated cell membranes by solubilizing lipid bilayer, leading to cell death. The 2 h exposure prevented lactate dehydrogenase (LDH) from being degraded and allows cells to remain adhered to insert membrane, for further analysis.

2.3.2. LPS as positive control for inflammation

Mono- and coculture were exposed to 5 µg/mL (for positive control of inflammation of mono- and coculture) and 20 µg/mL (for positive control of responsiveness of coculture) of LPS (L2880, Merck, Darmstadt, Germany), a pro-inflammatory agent, during 24 h (as air cell exposure) on apical and basolateral part of inserts. The effective dose was selected to induce the specific expression of some cytokines, which generally reflects (pro)-inflammatory response.

2.3.3. ZnO aerosol as positive control for air pollutants

To verify the responsiveness of the coculture under ALI exposure conditions to air pollutants, ZnO aerosol was used as positive control (named "ZnO" condition) due to their toxicity at ALI (Lovén et al., 2021; Stoehr et al., 2015; Stuetz et al., 2023; Tilly et al., 2020). ZnO suspensions were prepared at 10 g/L by dispersing ZnO crystals in Milli-Q water. The suspension was homogenized prior to nebulization and maintained under continuous magnetic stirring during nebulization to ensure stable and reproducible aerosol generation due to insolubility in water of ZnO. Coculture was exposed at 1 and 2 mg/m^3 during 24 h, corresponding to high doses to ensure a minimum 40% decrease in viability. Note that such concentration were largely higher tant dose typically observed in occupational or environmental environment (Hackenberg et al., 2011; Lenz et al., 2009, 2013; Moratin et al., 2023; Xie et al., 2012).

The 10 mg/mL ZnO suspension was nebulized using a Palas AGK-2000 generator equipped with an HCT impactor at a total flow rate of 5 L/min. The resulting aerosol was diluted with clean dry air four to six times (20 to 30 L/min) to produce two distinct exposure concentrations. Particle size distributions and mass concentrations were obtained using a Scanning Mobility Particle Sizer (TSI soft x-ray neutralizer 3088, Shoreview, USA and GRIMM aerosol Technik SMPS+C with L-DMA, Hamburg, Germany). Resulting aerosol in these conditions showed a monomodal distribution centered at about 800 nm and aerosol ZnO concentrations obtained were of 1 and 2 mg/m^3 considering an aerosol density of 5.6 g/cm^3 equivalent to the ZnO density. The aerosol relative humidity was also measured and was about 30% for all experiments (Table 1). Cocultures were exposed to the ZnO aerosols for 24 h using the Cultex® ALI exposure system at an exposure flow rate of 10 mL/min.

2.4. Morphological and phenotypical study of cell

To characterize cell morphology and expression of specific alveolar markers, optical microscopy and immunocytochemistry have been performed.

2.4.1. Optical microscopy

The morphology of both A549 and Ci-hAELVi cells in mono-and coculture were monitored by optical microscopy (Leica DMIL, #356764), at different periods, such as cell seeding, during cell growth, and at ALI, before and after exposure. Photos have been captured by using the XCAM1080P2MPA camera and the associated software (ToupView, Digital Camera) at ×200 magnification with automatically adjusted light exposure.

2.4.2. Immunocytochemistry

To study some specific markers of alveolar epithelial cells, immunocytochemical techniques were used. After 24 h of clean air exposure, basal medium was removed, and inserts were washed with PBS and fixed with 4% (v/v) paraformaldehyde (PFA) in PBS for 10 min at room temperature. PFA was then washed three times with tris-buffer saline (TBS). Membranes of inserts were then cut into four equal parts. Cells were then permeabilized with TBS containing 10% (v/v) FBS; 0.2% (v/v) Triton X-100 and 2% (m/m) bovine serum albumin (BSA) during 1 h at room temperature. Membranes were incubated using specific primary antibodies (Table 2), washed with TBS, and incubated with appropriate secondary antibodies in TBS solution with 10% (v/v) FBS solution and 2% (v/v) BSA (Table 2). To stain cell nuclei, membranes were washed with TBS and incubated with DAPI (1/5000 dilution). Finally, membranes were washed three times in TBS and once in distilled water before

Table 1
Characteristics of the ZnO aerosols generated for ALI exposure.

Parameters	Control	ZnO Low	ZnO High
Nebulized solution	Mili-Q water	ZnO 10 g/L	ZnO 10 g/L
Nebulizer airflow (L/min)	5	5	5
Dilution airflow (L/min)	30	30	20
Relative humidity (%)[a]	27	27	33
Aerosol concentrations (mg/m^3)[a]	0	1	2
Aerosol mode (nm)[a]	–	800	810
Exposure duration (h)	24	24	24

[a] Relative humidity, aerosol particle mass concentration, and size distribution derived from scanning mobility particle sizer (SMPS) measurements.

Table 2
Coupling, protocol and specificity of antibodies used for immunolabeling of cells.

	Co-staining		Co-staining	
Primary antibody				
Markers	Human Lung AT1, 56 kDa (HT1–56) AT1-specific transmembrane protein	Human Lung AT2, 280 kDa (HT2–280) AT2-specific transmembrane protein	Podoplanin (PDPN) AT1-specific transmembrane protein	Aquaporin 5 (AQP5) Water transporter AT1-specific
Host	Mouse / IgG1	Mouse / IgM	Goat / IgG	Rabbit / IgG
Specificity species	anti-human	anti-human	anti-human	anti-human
Dilution	1:150	1:150	1:500	1:500
Incubation	30 min at RT	30 min at RT	O/N at +4 °C	O/N at +4 °C
Suppliers	Terrace Biotech	Terrace Biotech	R&D Systems	Novusbio
References	TB-29AHTI-56	TB-27AHT2–280	AF3244	NBP2–39043
Secondary antibody				
Markers	Alexa Fluor™ 633 Deep red	Alexa Fluor™ 488 Green	Secondary Antibody 680 Deep red	Alexa Fluor™ Plus 488 Green
Host	Goat	Goat	Donkey	Goat
Specificity species	Anti-mouse IgG1	Anti-mouse IgM	Anti-goat IgG	Anti-rabbit IgG
Dilution	1:500	1:500	1:1000	1:1000
Incubation	30 min at RT	30 min at RT	2 h at RT	2 h at RT
Emission	650	520	704	520
Excitation	631	499	687	499
Suppliers	Thermo Fisher	Thermo Fisher	Thermo Fisher	Invitrogen
References	A-21126	A-21042	A32860	AB_2633280

being mounted on glass slides in mounting medium Fluoromount-G™ (Thermo Fisher, # 00–4958-02). Negative controls were carried out in parallel using the same protocol without primary antibodies. Specific fluorescence was visualized with confocal microscope Zeiss LSM 980 AiryScan2 IR and photos were taken and analyzed (*e.g.*, elimination of background noise and sur-exposure) with Zen 3.3 software (blue edition; Carl Zeis Microscopy GmbH, UK). Only protein markers with a signal intensity greater than 1000 RFU were considered as positively detected.

2.5. Cell model characterization

2.5.1. Cytotoxicity

Extracellular LDH released was measured in the huAEC cell culture media retrieved from all conditions. The apical parts of the inserts were washed with 500 µL of heated huAEC cell culture medium and three aliquots of 100 µL of the collected huAEC cell culture medium were placed on 96-well plate (100 µL/well) to assess the extracellular LDH activity. CytoTox-ONE Homogeneous Membrane Integrity assay (G7890, Promega Corporation, Madison, USA) was used according to the supplier recommendations. Fluorescence was monitored (excitation wavelength: 560 nm, emission wavelength: 590 nm) using a multimode microplate reader (Varioskan™ LUX, Thermo Fisher scientific, Waltham, USA). Values of each sample were normalized with the maximum LDH released by the cells exposed to positive control, Triton X-100 at 1% (*v*/v), as a percentage of cell viability (see also 2.3.1. Triton as positive control for cytotoxicity).

2.5.2. Metabolic activity

PrestoBlue™ assay, based on the use of a cell-permeable resazurin solution, was performed to assess metabolic activity of cells retrieved from all conditions. As described in Section 2.5.1., after cell washing, basolateral cell culture medium was removed and cells were then incubated at 37 °C, in 5% CO_2 for 1 h submerged with 1 mL in apical side and 2 mL in basolateral side of PrestoBlue™ solution (A13262, Thermo Fischer Scientific) diluted to 10% (v/v) in cell culture medium. After 1 h of incubation, three aliquots of 200 µL of basolateral cell culture medium containing metabolized PrestoBlue™ were transferred in a 96-well plate and fluorescence was monitored using Varioskan™ LUX multimode microplate reader (excitation wavelength: 550 nm, emission wavelength: 590 nm). Values of each sample were normalized to negative control, which consisted of the cells kept in the incubator for characterization or cells exposed to control air (AIR) for ALI exposure.

2.5.3. Barrier properties

2.5.3.1. Transepithelial electrical resistance (TEER). Transepithelial electrical resistance (TEER) values were measured using a voltohmmeter (EVOM™ Epithelial Volt/Ohm (TEER) Meter 3, WPI, Sarasota, USA) to compare the development of tight junctions between mono- and coculture of A549 and Ci-hAELVi cells. TEER values were measured at the end of the culture protocol. Cell culture media of basolateral and apical part of the inserts were replaced with 1 mL to apical part and 2 mL to basolateral part of $HBSS^{++}$ solution (with Ca^{2+} and Mg^{2+}, Gibco – Sigma Aldrich, Darmstadt, Germany) and TEER was read after achieving a stable potential for approximately 15 to 30 min, to avoid any temperature fluctuation-induced TEER changes (Srinivasan et al., 2015). Before each measurement, three inserts, without cells, with the same volume of $HBSS^{++}$ in apical and basal part of insert were used as blanks. TEER expressed in $\Omega.cm^2$ was calculated multiplying by the insert area (Eq. 1).

$$TEER = (RM - Rb) \times A \quad (1)$$

where: TEER = the transepithelial electrical resistance ($\Omega.cm^2$), RM = the resistance reading obtained for mono- or coculture (Ω), Rb = the resistance reading obtained for the blank, acellular insert (Ω), A = the surface area of insert (cm^2).

2.5.3.2. Apparent permeability coefficient: P_app. Just after TEER determination, Lucifer Yellow permeability assay (Sigma Aldrich, Darmstadt, Germany) was performed to complete the analysis of the barrier properties. A Lucifer Yellow donor solution in apical portion of insert yield a Lucifer Yellow concentration in basal portion of insert; the molecule's rate of passage was measured as follows. The donor solution used was 100 mM stock solution of Lucifer Yellow diluted with $HBSS^{++}$ and the receiver solution used was only $HBSS^{++}$. One milliliter of donor solution was added to apical side and 2 mL of $HBSS^{++}$ were added to basolateral side of insert. Plate was placed at 37 °C and 5% of CO_2 in incubator for 60 min. Then 50 µL of the solution of the receiver part, were transferred to a black microplate and 200 µL of the 4-fold diluted receiver solution were also transferred and fluorescence was read using a Varioskan™ LUX multimode microplate reader (excitation wavelength: 424 nm; emission wavelength: 540 nm). The quantification was based on a 6-points calibration curve (gravimetrically diluted Lucifer Yellow stock standard solution from 0.01 to 50 µg/mL; $r^2 > 0.995$ with linear regression). Total concentration of lucifer yellow was verified by adding concentrations of apical and basolateral sides of each insert. P_app was

calculated using the calibration curve in cm/s. Each P_app was compared with the blank (acellular insert) to calculate an apparent passage percentage. P_app was expressed in cm/s and calculated by multiplying the insert area and concentration of lucifer yellow (Eq. 2).

$$P_app = Cb \times T\left(\frac{1}{A \times Ci}\right) \times 10^{-6} \quad (2)$$

where: P_app = the apparent coefficient partage (cm/s), Cb = the basolateral concentration of Lucifer Yellow (μg/mL), T = the time of the experimentation (3600 s), A = the surface area of insert (cm^2), Ci = the initial concentration of Lucifer Yellow (μL/mL).

2.5.4. Gene expression study

To detect differential gene expressions in mono- and coculture, cell lysates containing mRNA were collected separately. Expression levels of specific genes (Table 3) were analyzed by reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). According to miRNeasy Mini Handbook kit protocol (217,004, QIAGEN), immediately after exposure, 700 μL QIAzol Lysis Reagent® (QIAGEN) were added at apical side of insert. Cells were then scraped, and suspensions were collected in 1.5 mL Eppendorf tubes and stocked at −80 °C until further analysis. mRNAs were extracted and purified with the miRNeasy Mini Handbook kit according to the manufacturer's recommendations. cDNAs were generated with the Hight Capacity cDNA Reverse Transcription KIT (4,374,967, Thermo Fischer Scientific) following the manufacturer's instructions using thermocycler Applied Biosystems™ Thermocycleur SimpliAmp™ (Fischer Scientific) for 10 min at 25 °C, 120 min at 37 °C, 5 min at 85 °C and then returned to 4 °C. cDNAs generated were analyzed by qPCR using the TaqMan™ Fast Advanced Master Mix kit (A44360, Thermo Fischer Scientific), according to the manufacturer's instructions. The amplification reaction (5 μL TaqMan Fast Advanced Master MIX 2× Assay Buffer, 0.5 μL probe, 2.5 μL RNAse free water, 2 μL cDNA diluted twice) took place in real-time using a PCR detection system StepOnePlus™ (Thermo Fisher Scientific) for three steps: denaturation on DNA at 95 °C for 20 s, primer hybridization at 60 °C for 3 s, and elongation at 72 °C for 30 s. The amplification data were analyzed using the Thermo Fisher Scientific Cloud application (Thermo-Fisher Scientific®). Expression levels of target genes were normalized to housekeeping gene *RNA18S* and exposed conditions were compared to unexposed conditions using the comparative cycle threshold (CT) method (Schmittgen and Livak, 2008), then expressed as log (2). The obtained CT, except CT > 36 considered as no detected (ND), were subtracted from the RNAs18S to homogenize the responses. ΔCT, ΔΔCT and Relative Quantification (RQ) were calculated and transformed into log(2) using the following equations:

$$\Delta CT = CT_{gene\ interest} - CT_{housekeapping\ gene} \quad (3)$$

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT_{gene\ interest} - \Delta CT_{control} \quad (4)$$

$$RQ = 2^{-\Delta\Delta CT} \quad (5)$$

The final result of this method is presented as the log (2) of fold change (FC) of target gene expression in a target sample relative to a reference sample, normalized to a reference gene. In this study, target genes were considered differentially expressed when the log (2) FC > 1 (up-regulation) or <−1 (down-regulation), and the *p*-value was <0.05.

2.5.5. Cytokine secretion

Remaining of the cell culture media samples (2 × 100 μL aliquots/insert) retrieved from the cells incubated under AIR, ZnO, and INCUB conditions (see also 2.5.1. Cytotoxicity) were stored at −80 °C until cytokine determination. Concentrations of interleukin-1β (IL-1β), interleukin-6 (IL-6), interleukin-8 (IL-8), and tumor necrosis factor-α (TNF-α) were also simultaneously measured using the Proinflammatory Panel 1 (human) V-Plex Assay (Kit No. K15345D-2, Meso Scale Discovery, UK) in accordance with the manufacturer's instructions. Values of each sample were compared to pro-inflammatory cytokines released by cells exposed to positive control, which consisted of cells exposed to LPS (see also 2.3.2. LPS as positive control for inflammation). Plates were analyzed using a MSD plate reader (MESO QuickPlex SQ 120MM, MSD) and data were treated with the Methodological Mind of Discovery Workbench software (MSD).

2.5.6. Surfactant protein assay

Levels of the surfactant protein (SP)-B and -D) were quantified in the same cell culture media samples as those analyzed for cytokines (see also 2.5.5. Inflammation cytokines secretion), using commercially available sandwich ELISA kits (Human Pulmonary Surfactant-Associated Protein B ELISA Kit, Abbexa, UK; Human Pulmonary Surfactant-Associated Protein D ELISA Kit, Abbexa, UK), following the manufacturer's instructions, standards and undiluted basal level samples, half-diluted LPS positive control samples, and quarter-diluted ZnO samples were added

Table 3
Names and functions of the genes under study and references of the primers used in RTqPCR.

Genes	Genes name	Assay identifying	Function	Objective
RNA18S	*RNA ribosomal 18S*	Hs03928990_g	Housekeeping gene	Control
KRT14	*Keratin 14*	Hs00265033_m1	Keratinocyte	AT1 and AT2 marker
AQP5	*Aquaporin 5*	Hs00387048_m1	Aquaporin	AT1-specific markers
CAV1	*Caveolin 1*	Hs00971716_m1	Caveola	
PDPN	*Podoplanin*	Hs00366766_m1	Differentiation	
CDH1	*Cadherin 1*	Hs01023895_m1	Adhesion protein	
I-CAM1	*Intercellular adhesion molecule 1*	Hs00164932_m1		
TJP1	*Tigh junction protein 1*	Hs01551871_m1		
SPA1	*Surfactant protein A1*	Hs00831305_s1	Surfactant protein	AT2-specific markers
SPB	*Surfactant protein B*	Hs00167036_m1		
SPC	*Surfactant protein C*	Hs00951326_g1		
SPD	*Surfactant protein D*	Hs01108490_m1		
KEAP1	*Kelch-like ECH-associated protein 1*	Hs00202227_m1	Oxidative stress	Cell signaling pathway activation
NFE2L2	*Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2*	Hs00975961_g1		
HMOX1	*Heme oxygenase 1*	Hs01110250_m1		
SOD1	*Superoxide dismutase 1*	Hs00533490_m1		
AhR	*Aryl hydrocarbon receptor*	Hs00169233_m1	Detoxification	
AhRR	*Aryl hydrocarbon receptor repressor*	Hs01005075_m1		
CYP1A1	*Cytochrome P450 family 1 subfamily A member 1*	Hs01054796_g1		
CYP2E1	*Cytochrome P450 family 2 subfamily E member 1*	Hs00559367_m1		
TP53	*Tumor protein p53*	Hs01034249_m1	Cellular cycle	
MUC2	*Mucin 2*	Hs03005103_g1	Mucus (bronchial)	Mucus synthesis
MUC5AC	*Mucin 5 AC*	Hs01365616_m1		
MUCB	*Mucin B*	Hs00861595_m1		

to pre-coated microplate wells and incubated to allow antigen capture. After washing, a horseradish peroxidase-conjugated detection antibody was applied. Colorimetric detection was performed using tetramethylbenzidine as substrate, and absorbance was measured at a wavelength of 450 nm with a Varioskan™ LUX multimode microplate reader. SP-B and -D concentrations were determined from standard curves respectively generated for each ELISA test. The CurveExpert 1.4 software was used to determine the best polynomial regression ($y = ax^2 + bx + c$) from the standard range of ELISA assays and to obtain the best estimate of the levels of secreted *SP*. All samples were analyzed in technical duplicates.

2.6. Statistics

GraphPad Prism 8.0 Software from Dotmatics® was used for graphical representation and statistical analysis of the data. When normality of data was proven by the Shapiro-Wilk test, one-way ANOVA was applied, followed by Dunnett's post-hoc test when significance was established ($p < 0.05$). If the normality of data was refuted, a Kruskal-Wallis and Dunn's multiple comparisons tests were performed ($p < 0.05$).

3. Results

In the following section, only results, arising from the six days acclimatization of cells before 24 h ALI exposure to air, were shown. Results from the 24 h acclimatization of cells before 24 h ALI exposure to air were also reported in the supplemental data, although they were described in this Result section and thereafter discussed in the Discussion section.

3.1. Evaluation of optimal coculture conditions for ALI exposure, after six days of ALI acclimatization and clean air exposure with VitroCell® device

To confirm the choice of the coculture conditions, cell morphology, growth, cytotoxicity and viability of A549 and Ci-hAELVi cells, were evaluated in mono- and coculture after 24 h as INCUB or AIR-exposed cells with VitroCell® device.

3.1.1. Morphology and growth of A549 and Ci-hAELVi cell lines in mono- and coculture, after six days of ALI acclimatization and clean air exposure with VitroCell® device

A549 cell line is of cancer origin, while Ci-hAELVi is an immortalized cell line. Combining two cell lines with different origins can be complex due to their different behavior and proliferation profile in culture. The A549 cell line is known to form cell aggregates due to its anarchic proliferation, thus the challenge here was to find coculture optimal conditions for both cell lines together after six days of ALI acclimatization and clean air exposure with VitroCell® device (Fig. 1).

To ensure compatible growth conditions for both cell lines, monocultures of A549 and Ci-hAELVi cells were first compared in each cell culture medium (*i.e.*, RPMI 1640 and huAEC). A549 cell proliferation was markedly higher in RPMI cell culture medium than in huAEC cell culture medium (Fig. S1A and B), whereas Ci-hAELVi cells exhibited optimal growth only in huAEC cell culture medium (Fig. S1A and B). When both cell lines were maintained in huAEC cell culture medium, their proliferation rates became comparable, and A549 cells no longer formed aggregates, resulting in a smooth and homogeneous cell monolayer (Fig. S1E). Consistently, TEER monitoring over eight days confirmed tight junction formation only for Ci-hAELVi cells in huAEC cell culture medium, validating this latest as the most appropriate cell culture medium for establishing the coculture model (Fig. S1C and D).

After 6 days of ALI acclimatization, mono- and cocultures of cells incubated as INCUB and AIR conditions showed a confluent cell layer (Fig. 1A). Coculture showed clusters of A549 and Ci-hAELVi cells. Cells from the mono- and coculture exposed to AIR (– AIR) presented a more blurred cell layer. By increasing the magnification, no major structural difference was visible. After seven days of culture, there was a 1.8-fold increase of the A549 cells as INCUB conditions (– INCUB) and A549 cells – AIR, which corresponded to 0.8 division compared to the baseline seeding number (Fig. 1B, pink boxplots). Ci-hAELVi cells – INCUB reached an average of 0.8 division and Ci-hAELVi cells– AIR about 1.25 divisions (Fig. 1B, blue boxplots). In both conditions, coculture reached 1.0 division. For the coculture, cell number was similar between INCUB and AIR conditions (Fig. 1B, green boxplots); approximately 1×10^6 cells/insert *i.e.*, one cell division. It is noteworthy that standard deviations for coculture were lower than those of monoculture, demonstrating a lower variability. Coculture model seemed to be more stable and reproducible than each of the monoculture.

After 24 h of ALI acclimatization, coculture formed smaller groups because growth was lower than prolonged acclimatization model (Fig. S2A and B).

3.1.2. Cytotoxicity and viability of A549 and Ci-hAELVi cell lines, in mono- and coculture, after six days of ALI acclimatization and clean air exposure with VitroCell® device

A controlled cell culture microenvironment is absolutely needed to recover cell line characteristics. In addition to cell culture medium selection (Fig. S1), it was relevant to compare mono- and coculture abilities to be exposed to clean air for 24 h with VitroCell® device after six days of ALI acclimatization (Fig. 2).

After 6 days of ALI acclimatization, LDH levels (Fig. 2A) in both mono- and cocultures – AIR were not significantly different from those –INCUB, and their metabolic activity (Fig. 2B) also remained comparable to that of the INCUB controls.

After 24 h of ALI acclimatization, similar results were obtained (Fig. S2). No cytotoxicity was detected (Fig. S2D); however, the metabolic activity of the AIR condition (Fig. S2C) differed significantly from that of the INCUB condition ($p < 0.01$).

3.2. Expression of specific AT1 and AT2 markers in A549 and Ci-hAELVi cell lines, in mono- and coculture after six days of ALI acclimatization and clean air exposure with VitroCell® device

We have just reported above that the coculture model demonstrated excellent metabolic activity, no significant cytotoxicity, and no apparent morphological change after 6 days of ALI acclimatization and clean air exposure with VitroCell® device. To extend our investigation and achieve a more thorough characterization of this new relevant coculture model, we also evaluated the gene and protein expression of some specific alveolar epithelial markers in mono- and cocultures.

3.2.1. Comparison of mRNA expression of specific AT1 and AT2 markers in A549 and Ci-hAELVi cell lines, in mono- and coculture after six days of ALI acclimatization and clean air exposure with VitroCell® device

To characterize similarity of coculture with normal human alveolar physiology, mRNA levels of some alveolar cell-specific markers were assessed and compared between different cell lines and exposure conditions (Fig. 3A). The coculture model was developed to be exposed at ALI. Therefore, AIR – condition setup will serve as the future reference. This is why it is necessary to characterize this condition as thoroughly as possible. The quantities of SP-B (Fig. 3B) and SP-D (Fig. 3C) secreted were measured under these same conditions.

After 6 days of ALI acclimatization, first comparison of Fig. 3A presents relative gene expression of monocultures – AIR normalized to coculture – AIR. RQ values are specified in Table S1. Coculture – AIR showed expression of specific AT1-like markers, either from both cell lines, such as *caveolin-1* (*CAV1*), necessary for caveolae formation, or only from Ci-hAELVi cells, such as *keratin-14* (*KRT14*), which is crucial for cytoskeleton formation. *Aquaporin 5* (*AQP5*) *and Podoplanin* (*PDPN*) mRNA, two specific AT1-like markers, have not been detected in any of these cell lines in the conditions we applied. Coculture also expressed

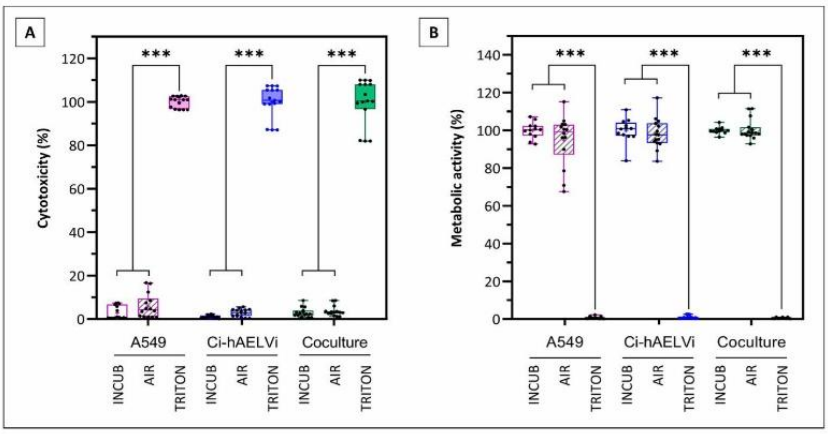


Fig. 2. Cytotoxicity and metabolic activity of A549 and Ci-hAELVi cells in mono- and coculture after six days of air-liquid interface (ALI) acclimatization and 24 h of air exposure with VitroCell® system. (A) Assessment of cell membrane alterations with lactate dehydrogenase (LDH) dosage. Data are expressed as a percentage of positive control. (B) Assessment of cell metabolic activity with PrestoBlue assay. Data is expressed as a percentage of INCUB negative control. Pink boxplots represent data obtained for A549 cells, blue boxplots for Ci-hAELVi cells and green boxplots for cell coculture. Cells kept in incubator (INCUB) are depicted by empty boxplots, cells exposed to 24 h air control in hatched boxplots, and positive control (TRITON X-100) in plain boxplots. A, B: Boxes represent 25th and 75th percentiles of data. Horizontal lines in boxes and cross symbols represent median and mean values, respectively. All the data points are shown individually (black dots), the vertical lines represent ± SD ($n = 12$) from four independent experiments (***: $p < 0.001$). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

important cell adhesion protein gene, *CDH1* and *ICAM-1*, primarily from Ci-hAELVi cells. Mucin genes, which *in vivo* are transcriptionally active in bronchial cells, were also expressed by A549 cancerous cell line (*i.e.*, *MUC2, MUC5AB* and *MUC5B*), but gene expression of all these mucin genes was clearly down-regulated in coculture – AIR compared to A549 cells in monoculture. An important feature of the coculture model we developed was its capacity to secrete SP, a noteworthy specificity of AT2 pneumocytes *in vivo*. Coculture expressed mRNA of the four most abundant SP, where *SPA-1*, *SP-D*, and *SP-C* genes were expressed in Ci-hAELVi cells, and *SP-B*, *SP-C*, and *SP-D* genes in A549 cells. Finally, gene expressions of *SP-B* and *SP-D* seemed to be more abundant in coculture than in each of the monocultures.

Second comparison of Fig. 3A presented relative gene expression of coculture – AIR normalized to coculture – INCUB. RQ are specified in Table S2. In AIR condition, *CAV-1* gene was down-regulated in coculture whereas *KRT14* gene was up-regulated. No difference was noticed for cell adhesion markers. *MUC2*, *MUC5AC* and *MUC5B* mRNA were down regulated in AIR compared to INCUB condition. Finaly, *SP-A* gene was up-regulated, whereas *SP-B* and *SP-D* genes were down-regulated.

After 24 h of ALI acclimatization and air exposure with VitroCell® device, coculture exhibited similar characteristics to the prolonged acclimatization model (six days), as shown in Fig. S3. First comparison of Fig. S3 presented relative gene expression of monocultures – AIR normalized to coculture – AIR. RQ are specified in Table S3. AT1-like markers and cell adhesion markers were mainly expressed by Ci-hAELVi cells. Mucins markers were only expressed by A549 cells and therefore by coculture. Unlike with prolonged ALI acclimatization, Ci-hAELVi cells did not express *SP-C* gene. More notably than under prolonged ALI acclimatization, after 24 h of ALI, expression levels of *SP-A*, *SP-B*, and *SP-D* genes were lower in each of the monocultures than in coculture. Second comparison of Fig. S3 presented relative gene expression of coculture – AIR normalized to coculture – INCUB. RQ are specified in Table S4. Coculture – AIR showed up-regulation of cell remodeling-related genes (*CAV1*, *KRT14* and *ICAM)*. Coculture also exhibited up-regulation of *SPA-1* and *SP-B* genes, but a downregulation of *MUC5AB* and *MUC5B* genes.

3.2.2. Quantification of the most abundant surfactant proteins SP-B and SP-C in mono- and coculture after 6 days of ALI acclimatization and clean air exposure with VitroCell® device

Fig. 3B and C shows SP-B and SP-D protein secretion in mono- and coculture after six days of ALI acclimatization. SP-B protein levels (Fig. 3B) remained stable across exposure conditions, with no significant difference between -AIR and -INCUB for either mono- nor coculture. A slight downward trend, also non statistically significant, was observed under AIR exposure. Coculture secreted approximately four-fold more SP-B protein than each of the monocultures, highlighting the functional complementarity between A549 and Ci-hAELVi cells within the coculture model we developed ($p < 0.0001$). SP-D protein levels (Fig. 3C) were low in both mono- and coculture under AIR exposure. Under INCUB conditions, A549 cells secreted relatively low levels of SP-D protein (≈ 7 ng/mL), whereas Ci-hAELVi produced around three-fold lower levels (≈ 2.5 ng/mL). In contrast, the coculture secreted roughly three-fold more SP-D protein than A549 cells under INCUB conditions, suggesting an enhanced secretory capacity when both cell types are combined in the coculture model ($p < 0.0001$). However, under AIR exposure, coculture SP-D levels decreased and became non significantly different to those of monocultures.

3.2.3. Localization of AT1 and AT2-like markers in mono- and cocultures after six days of ALI acclimatization and clean air exposure with VitroCell® device

Coculture model expressed AT1 and AT2-like markers. Immunostainings were performed to confirm protein expression of some of these specific markers and their localization in mono- and coculture after six days of ALI acclimatization and clean air exposure with VitroCell® device, thereby offering a better characterization of their respective phenotypes. Firstly, DAPI staining showed once again that A549 cells form a homogeneous cell monolayer, and the Ci-hAELVi cells a more tightly packed cell monolayer. Some AT1 and AT2-like markers were expressed at protein level in both mono- and cocultures (Fig. S4 and Fig. S5). Coculture showed expression of human AT1-specific HTI-56 (Dobbs et al., 1999) and AT2-specific HTII-280 (Gonzalez et al., 2010) membrane proteins (Fig. 4A).

Cocultures –AIR and –INCUB showed similar patterns, with no apparent difference in the expression of these specific proteins. The

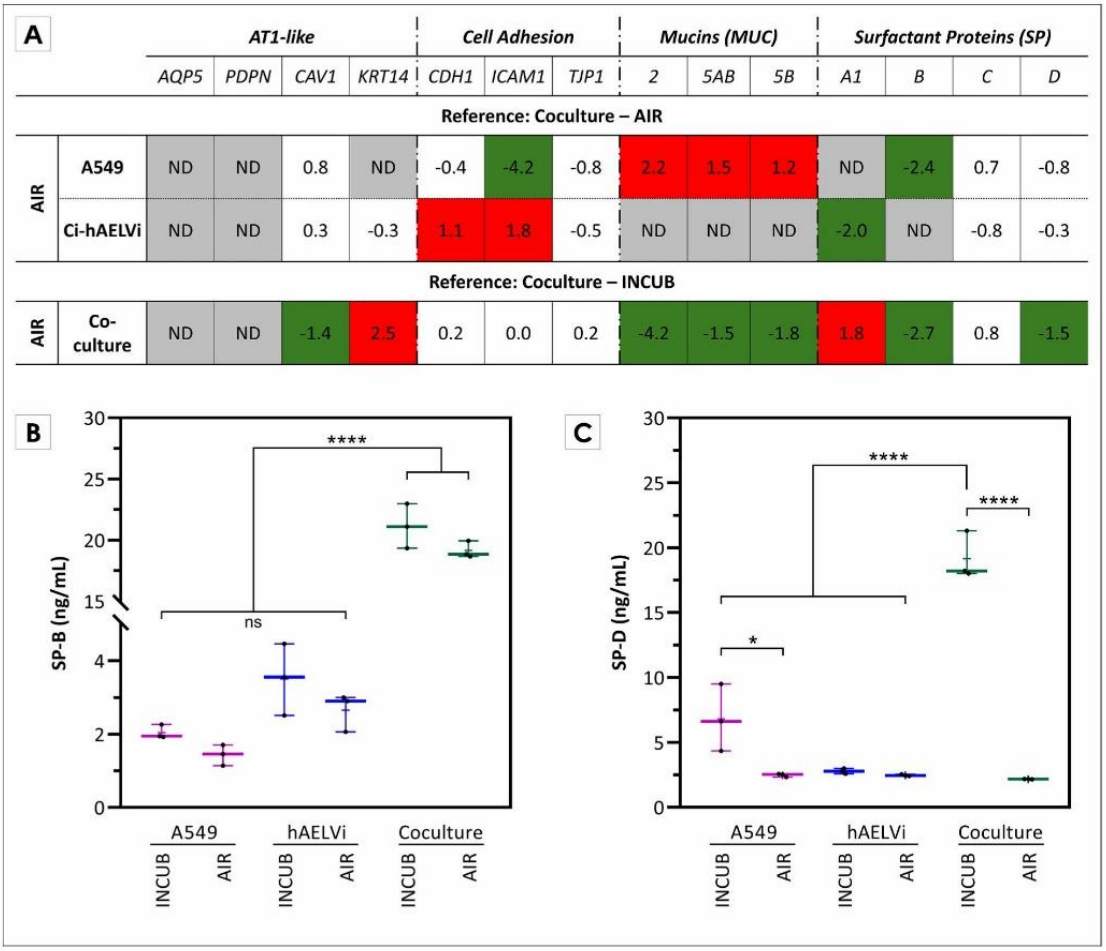


Fig. 3. Gene expression and surfactant proteins (SP) excretion in A549 and Ci-hAELVi cells, in mono- and coculture, after six days of air-liquid interface (ALI) acclimatization and 24 h of air exposure with VitroCell® system. (A) 1st comparison: log(2) RQ of mono- (A549 and Ci-hAELVi – AIR) and cell coculture (Coculture – AIR) were compared. 2nd comparison: log(2) RQ of cell coculture exposed to air (Coculture – AIR) were compared to log(2) RQ of coculture remained at incubator (Coculture – INCUB). Comparison was expressed in fold change represented by log(2) of RQ calculated (Table S1 and S2). ND corresponds to non-detected, was set at CT > 36. A, B: Data results are shown as a heat map ($n = 3$) from one experiment. Chosen markers represent key alveolar-type 1 (AT1) markers (*Aquaporin 5, AQP5; Podoplanin, PDPN; Caveolin 1, CAV1; Keratin 14, KRT14*) and functions in cell adhesion (*Cadherin 1, CDH1; Intercellular adhesion molecule1, I-CAM 1; Tigh junction protein 1, TJP 1*), secretum (*Surfactant protein, SP-A; B; C; and D; Mucin 2; 5 AC and 5B, MUC2; MUC5AC; MUC5B*). SP concentrations ($n = 3$) from one experiment, (B) SP-B and (C) SP-D protein concentration. in A549 cells (pink boxplots), Ci-hAELVi cells (blue boxplots) and cell coculture (green boxplots) after 24 h in incubator (empty boxplots) or exposure to air control (hatched boxplots). The boxes represent the 25th and 75th percentiles of the data. The horizontal lines in the boxes and cross symbols represent the median and the mean values, respectively. All the data points are shown individually (black dots), the vertical lines represent ± SD (n = 12) from one experiment (*: $p < 0.05$, ****: $p < 0.0001$, ns: not significant). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

intensity of these two markers in monocultured cells from both cell lines exceeded 1000, and the negative controls (omission of the primary antibody) showed no signal, confirming the specificity of the labeling (Fig. S4). A549 cell line seemed to have more stronger staining HTII280 than the Ci-hAELVi one and, conversely, Ci-hAELVi cell line more HTI56 than the A549 one.

To assess both localization and expression of some AT1-specific markers, not previously detected at gene levels by RT-qPCR, and to distinguish A549 cells from Ci-hAELVi cells, highly specific antibodies directed towards PDPN and AQP5 proteins were used (Fig. 4B). PDPN seemed to colocalize with AQ5 either in mono- or cocultures exposed to air or not (Figs. 4B and S6). Ci-hAELVi cells displayed uniform AQP5 labeling but weaker PDPN labeling. A549 cells showed AQP5 and PDPN staining in only a few cells (Fig. S5). In coculture, Ci-hAELVi cells co-expressed AQP5 and PDPN (yellow staining, blue arrow in Fig. 4B), whereas A549 cells did not show detectable levels of either protein (pink arrow in Fig. 4B). No change in labeling was detected between the AIR and the INCUB conditions.

3.3. *Functional validation of the coculture after six days of ALI acclimatization and toxic compound exposures with Cultex® device*

To validate the reactivity and physiological relevance of the coculture model after six days of ALI acclimatization, exposure protocols to two different reference compounds (*i.e.*, ZnO and LPS) were performed. Firstly, ZnO, a well-known cytotoxic compound, was nebulized at two different doses using the Cultex® exposure system. Secondly, LPS, a canonical inflammatory agent, was applied to the coculture model under submerged conditions. Both these reference compounds were delivered directly onto the apical surface of the cocultures for 24 h. Following

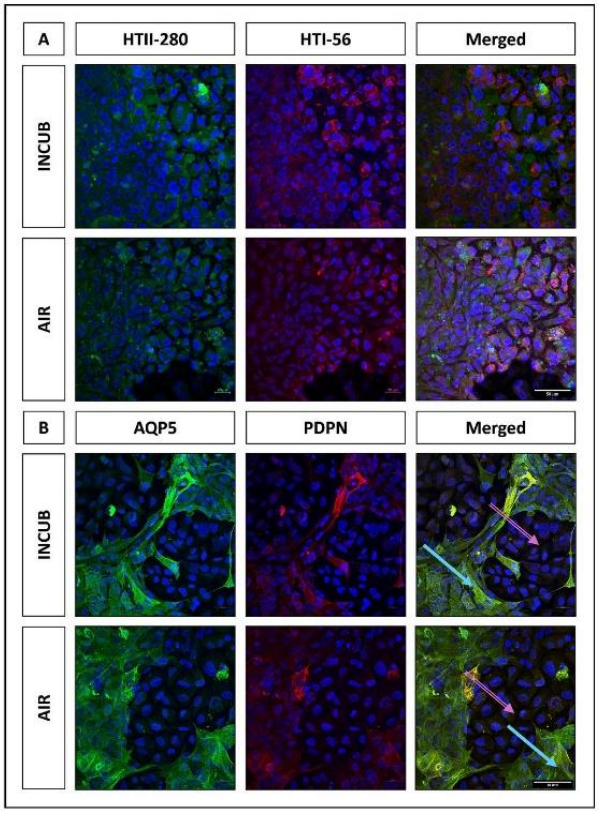


Fig. 4. Immunostaining of specific alveolar-type 1 (AT1) and alveolar-type 2 (AT2) markers in cell coculture after six days of air-liquid interface (ALI) acclimatization and 24 h of air exposure with VitroCell® system. After 24 h air exposure (AIR) or kept at incubator (INCUB), (A) HTI56, a marker for AT1, was marked in red, HTII280, a marker for AT2, was marked in green and nuclei were marked in blue and (B) Podoplanin (PDPN), a marker for AT1, was marked in red, Aquaporin 5 (AQP5), a marker for AT1, was marked in green and nuclei were marked in blue. Blue arrow shows hAELVi cell line and double pink arrow shows A549 cell line. Scale bar (right bottom): 50 μM. Magnitude: × 200. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

exposure, cell metabolic activity, cytotoxicity, surfactant protein (SP-B and SP-D) levels and (pro)-inflammatory cytokine secretion were also quantified (Fig. 5). The results obtained for ALI exposure to ZnO with the Cultex® RFS device were compared to AIR controls, while those observed for submerged exposure to LPS within the incubator were compared to INCUB controls, thereby ensuring a better representativeness of these experimental conditions.

3.3.1. Metabolic activity and cytotoxicity on coculture after six days of ALI acclimatization and 24 h of ZnO or LPS exposure

After 24 h of ALI exposure with Cultex® RFS, highly concentrated ZnO and LPS was nebulized and exposed in submerged condition respectively, onto the coculture for 24 h to induce strong cytotoxic effects. ZnO aerosol induced a concentration-dependent decrease in metabolic activity in coculture compared to AIR controls (Fig. 5A, $p < 0.0001$). At 1 mg/m^3, the metabolic activity was significantly reduced by approximately 25% and caused a significant increase in extracellular LDH (Fig. 5C, $p < 0.0001$). At 2 mg/m^3, metabolic activity significantly dropped by approximately 60%, without any significant LDH release, likely due to extensive cell detachment (data not shown), resulting in high cell loss and therefore reduced responsiveness in downstream assays.

Similarly, submerged exposure to highly contrate LPS (20 μg/mL) significantly decreased metabolic activity by approximately 30% (Fig. 5B, $p < 0.0001$), without significantly modifying extracellular LDH levels (Fig. 5C) compared to INCUB controls, suggesting sublethal cellular stress rather than acute membrane cytotoxicity.

3.3.2. SP-B and SP-C secretion by coculture after six days of ALI acclimatization and 24 h of ZnO or LPS exposure

Coculture exposure to ZnO significantly modulated SP-B and SP-D secretion in a dose-dependent manner (Fig. 5D and E, $p < 0.05$). In particular, SP-B protein levels were significantly decreased at 1 mg/m^3, with an even greater reduction at 2 mg/m^3 compared to AIR controls ($p < 0.0001$). In contrast, SP-D protein levels were significantly increased at 1 mg/m^3 and 2 mg/m^3, to a higher extend ($p < 0.05$).

Submerged exposure to LPS resulted in a non-significant decrease in SP-B protein levels, with high variability in the observed response, whereas SP-D protein levels showed a statistically significant increase compared to INCUB controls ($p < 0.0001$).

3.3.3. (Pro)-inflammatory cytokine secretion in coculture after six days of ALI acclimatization and 24 h of ZnO aerosol or LPS exposure

There was a statistically significant secretion of (pro)-inflammatory cytokines (*i.e.*, IL-1β, IL-8, and TNF-α) in the coculture model exposed to increasing doses of ZnO aerosol particles confirming the activation of inflammatory stress pathways (Fig. 5-F, -H and -I, respectively, $p < 0.05$). Conversely, there was no significant secretion of IL-6 by the coculture model exposed to ZnO aerosol particles (Fig. 5G).

As expected, significant increases of all the cytokines under study (*i.e.*, IL-1β, IL-6, IL-8, and TNF-α) were observed after cell coculture exposure LPS at 5 g/mL (except for TNF-a) and highly concentration of 20 μg/mL (Fig. 5F–I, respectively, $p < 0.001$).

3.4. Air flow impact on coculture after six days of ALI acclimatization and clean air exposure with Cultex® device

Having confirmed that coculture responds appropriately to well established positive stimuli (*e.g.*, ZnO and LPS), we next investigated whether continuous exposure to clean air under ALI conditions could influence some specific cellular functions. To evaluate the coculture suitability for ALI exposure, the coculture model was subjected to filtered clean air for 8, 24, and 72 h after six days of ALI acclimatization and exposure with Cultex® devise, which is particularly suited for prolonged exposure experiments. Typical toxicological endpoints, particularly cytokine secretion, was assessed after 24 h of exposure.

3.4.1. Influence of exposure duration on cytotoxicity and metabolic activity in coculture after six days of ALI acclimatization and clean air exposure with Cultex® device

Cytotoxicity and metabolic activity levels were measured to assess the impact of time exposure on cell coculture (Fig. 6). LDH levels (Fig. 6A) released by cell cocultures remained unchanged after 8, 24 and 72 h of air exposure (AIR), and their metabolic activity (Fig. 6B) did not differ from INCUB controls, thereby indicating the capacity of the coculture model for prolonged ALI exposure. However, when coculture was exposed to AIR for 72 h, a non-significant trend to increase in metabolic activity has been observed.

3.4.2. (Pro)-inflammatory cytokine secretion from the coculture after exposure to air flow after six days of ALI acclimatization and clean air exposure with Cultex® device

To evaluate the inflammatory response induced by a 24 h airflow exposure on the cell coculture, secretion of IL-1β, IL-8, and TNF-α was evaluated. Results were compared between coculture – INCUB and – AIR exposed during 8, 24 or 72 h to air flow (Fig. 7). Significant time and/or dose-dependent increases of both IL-1β and IL-8 concentrations, and to a lesser extent of IL-6 concentrations, were observed upon exposure of the

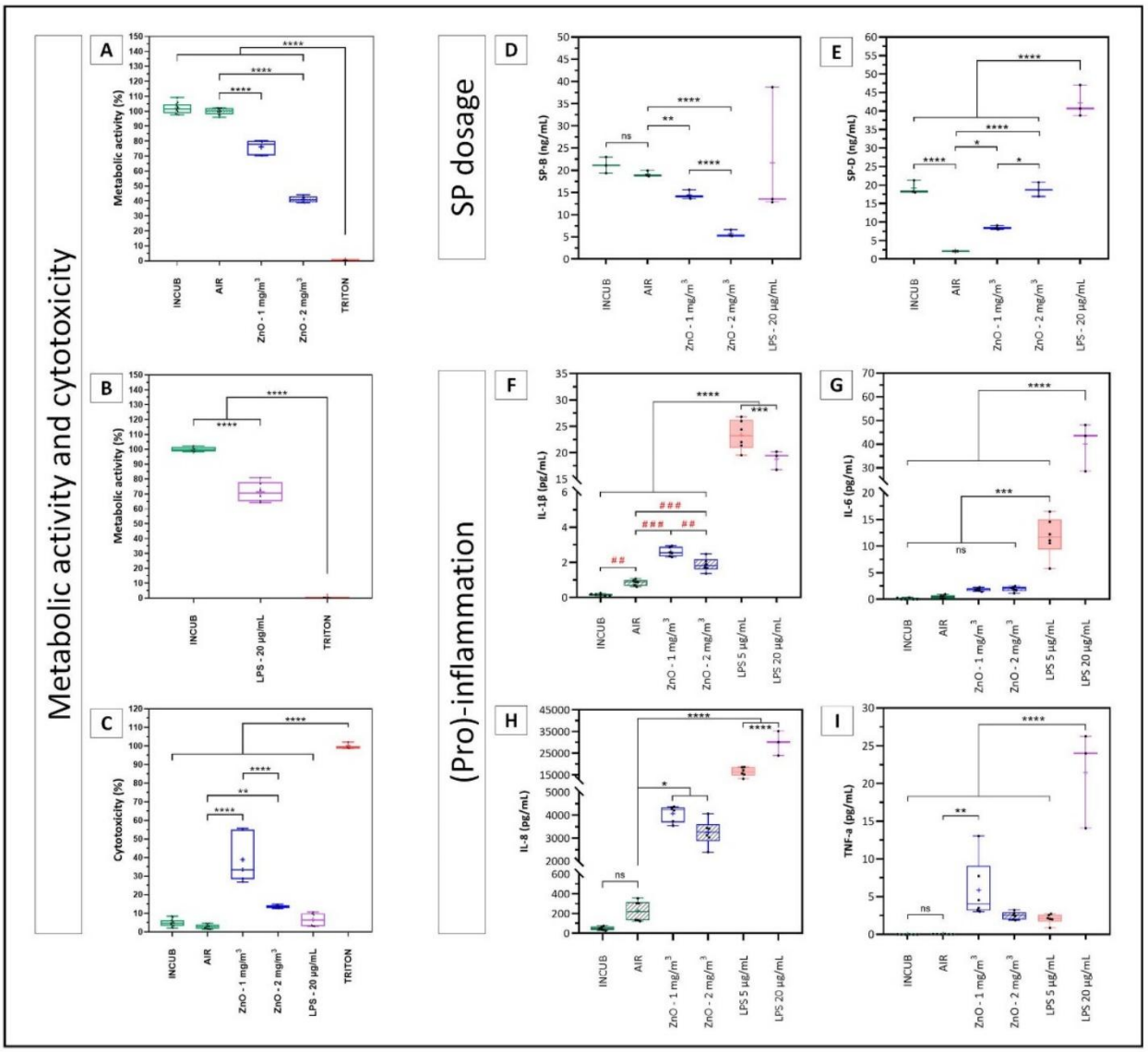


Fig. 5. Toxicological responses of cell coculture after different toxics exposure of coculture after six days of air-liquid interface (ALI) acclimatization and 24 h of air exposure with Cultex® system. Metabolic activity, cytotoxicity, protein surfactant (SP) dosage and (pro)-inflammation response of coculture after 24 h in incubator (INCUB – green empty boxplots) exposed to clean air (AIR – green hatched boxplots), exposed to ZnO at 1 mg/m^3 (blue empty boxplots), 2 mg/m^3 (blue hatched boxplots), and to lipopolysaccharide (LPS) at 20 µg/mL (purple empty boxplots) were measured. Metabolic activity and cytotoxicity ($n = 6$) from 2 independent experiments. (A) Assessment of cell metabolic activity with PrestoBlue assay. Especially for ZnO ALI exposure, data is expressed as a percentage of AIR negative control. (B) Assessment of cell metabolic activity with PrestoBlue assay. Especially for LPS submerged exposure keep at the incubator, data is expressed as a percentage of INCUB negative control. (C) Assessment of cell membrane alterations with LDH dosage. Data are expressed as a percentage of positive control of TRITON (red boxplot). SP concentrations ($n = 3$ and $n = 2$ for LPS) from one experiment, (D) SP-B and (E) SP-D protein concentration. (Pro)-inflammation (n = 6) from 2 independent experiments except for LPS 20 µg/mL (n = 3) from 1 experiment, (F) Interleukin 1β (IL-1β), (G) Interleukin 6 (IL-6), (H) Interleukin 8 (IL-8), (I) Tumor necrosis factor-α (TNF-α). LPS condition (red boxplots) corresponded to the conventional positive inflammation control (5 µg/mL). Boxes represent 25th and 75th percentiles of data. Horizontal lines in boxes and cross symbols represent median and mean values, respectively. All the data points are shown individually (black dots), the vertical lines represent ± SD (*$p < 0.05$, **$p < 0.01$, ****$p < 0.0001$). Two statistical tests have been performed for (Pro)-inflammation part (F), (G), (H) and (I), one including LPS positive control (*$p < 0.05$, **$p < 0.01$, ***$p < 0.001$, ****$p < 0.0001$, ns: not significant) and one excluding LPS positive control (##p < 0.01, ###p < 0.001). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

coculture model to air (Fig. 7A, C and B, respectively, $p < 0.05$). In contrast, no statistically significant change has been reported for TNF-α secretion (Fig. 7D).

3.4.3. Activation of some cell signaling pathways to airflow on coculture after six days of ALI acclimatization and clean air exposure with Cultex® device

To characterize further this new coculture model, mRNA levels of some of the genes specifically involved in AhR, antioxidants, and cell cycle signaling pathways were studied after 24 h of exposure to airflow

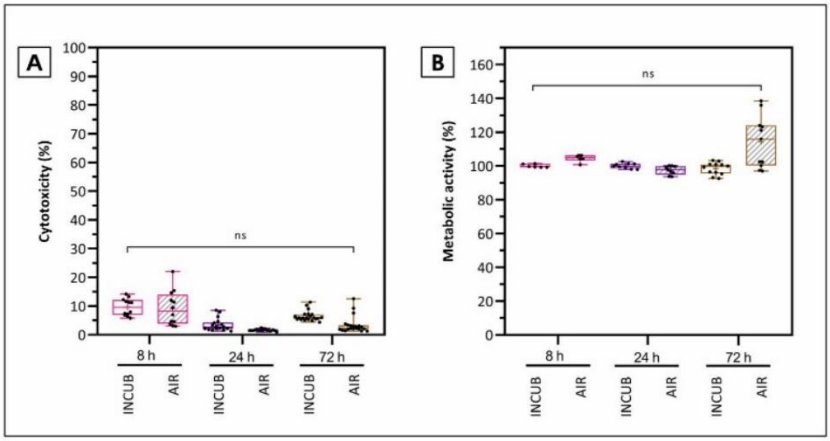


Fig. 6. Influence of air flow exposure duration on the cytotoxicity and viability of cell coculture after six days of air-liquid interface (ALI) acclimatization and 24 h of air exposure with Cultex® system. (A) Cell membrane alteration was assessed by extracellular lactate dehydrogenase (LDH) activity in the apical medium. Each sample is reported as a percentage of TRITON X-100 positive control where 100% of the cell membranes were significantly altered. (B) Cell metabolic activity was measured. Each data is reported as a percentage of the INCUB negative control, where 100% of cells should have an optimal metabolic activity. Pink boxplots represent 8 h exposure, purple boxplots 24 h exposure and brown boxplots 72 h exposure. Cells kept at incubator (INCUB) are represented with empty boxplots and cells exposed by hatched boxplots. (A), (B) Boxes represent 25th and 75th percentiles of data. Horizontal lines in boxes and cross symbols represent median and mean values, respectively. All the data points are shown individually (black dots), the vertical lines represent ± SD ($n = 18$) for cytotoxicity and ($n = 9$) for metabolic activity from three independent experiments (ns: not significant). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

(AIR), and thereafter compared to INCUB conditions (Fig. 8). Gene expressions of coculture –AIR were normalized to coculture – INCUB. RQ values are specified in Table S6. Results of monoculture – AIR normalized to coculture – AIR and monoculture – AIR normalized with monoculture – INCUB are presented on Fig. S6 with RQ values on Tables S5 and S6.

After six days of ALI acclimatization, in response to airflow exposure, cell coculture differentially expressed the *CYP1A1* gene, also closely involved in the AhR cell signaling pathway, and the *HMOX-1* gene, also highly implicated in the antioxidant cell signaling pathway. Accordingly, coculture – AIR showed an overexpression of *CYP1A1* gene (Fig. 8), also already found in A549 cell line (Fig. S5). Results for 24 h of ALI acclimatization are presented on (Fig. S7).

4. Discussion

In this *in vitro* study, we aimed to develop a new alveolar coculture model using two commercially available cell lines that mimic key features of the human alveolar epithelium and are suitable for prolonged ALI exposure. The coculture model also combined A549 cells, *i.e.* AT2 pneumocyte-like cells, with Ci-hAELVi cells, *i.e.* AT1 pneumocyte-like cells. This innovative coculture model would provide a practical *in vitro* tool highly useful for inhalation toxicology, thereby enabling preliminary screening of air pollutant-induced adverse effects before using more differentiated and complex cell models for validation.

4.1. Design of a new alveolar coculture model using Ci-hAELVi and A549 cell lines

The A549 cell line, originated from adenocarcinoma human alveolar basal epithelial cells, (Foster et al., 1998) and the Ci-hAELVi cell line, issued from human alveolar epithelial lentivirus immortalized cells (Kuehn et al., 2016), were used to develop this new alveolar coculture model. The Ci-hAELVi cell line, only recently available, has been newly described as AT1 pneumocytes (Brandt et al., 2020; Kletting et al., 2018; Kuehn et al., 2016; Metz et al., 2020). Among the available AT1 cell lines Ci-hAELVi cells would be more appropriate than the NCI-H441 ones, which exhibit some of the AT2 pneumocyte characteristics or AT1 pneumocyte-like features dependent on dexamethasone addition, an anti-inflammatory drug (Gazdar et al., 1990; Neuhaus et al., 2012; Ren et al., 2016). A new AT1 cell line, the Arlo cell line, a monoclonal human alveolar epithelial cells (Carius et al., 2023), has recently been proposed with improved barrier capacity, but remains rarely used to date. Conversely, A549 cell line has been the most widely used and characterized in ALI cultures (Navarrete-Aliaga et al., 2025; Salana and Verma, 2024; Selo et al., 2021; Wu et al., 2018), due to its alveolar epithelial origin, and easy and rapid growth. This coculture model was designed to replicate key features of the human alveolar microenvironment. Although A549 and Ci-hAELVi cell lines differ in size, they are not fully representative of the *in vivo* situation. A549 cells were approximately twice as small as the Ci-hAELVi cells (Fig. S1A), whereas AT2 cells are about 10-fold smaller than AT1 cells *in vivo* (Mason, 2006; Mason and Crystal, 1998; Williams, 2003). Therefore, to better represent the *in vivo* alveolar cell composition, cell seeding ratio was chosen to respect the population number proportions as follow: 40% of AT1 pneumocytes (Ci-hAELVi cells) against 60% of AT2 pneumocytes (A549 cells) (Mason, 2006; Mason and Crystal, 1998; Stone et al., 1992). Together, both cell lines formed some clusters. However, to ensure both stability and physiological relevance of this coculture model, the choice of culture conditions was as critical as cell selection.

It has been well established that sustained culture conditions, such as choice of cell culture medium, duration of differentiation, or acclimatization to ALI, can significantly influence phenotype and behavior of cultured cells (Cooper et al., 2016; Wu et al., 2018). Formulation of cell coculture medium is critical and its composition must be well defined to interpret any phenotypic or functional variations. One major limitation of A549 cell line is its anarchic proliferation due to their cancerous origin. This aggressive growth could potentially outcompete more slowly immortalized cell lines such as Ci-hAELVi cells. The excessive proliferation of A549 cell line could also impede long-term culture as they tend to overgrow and form multilayered cell aggregates. To ensure selection of appropriate coculture conditions, preliminary monoculture assays were performed. The huAEC cell culture medium was the most suitable compromised for cell coculture, as it provided a balanced growth for both cell lines. This cell culture medium enabled to upregulate AT2-specific *SP-B* and *-D* gene expression in A549 cells, while

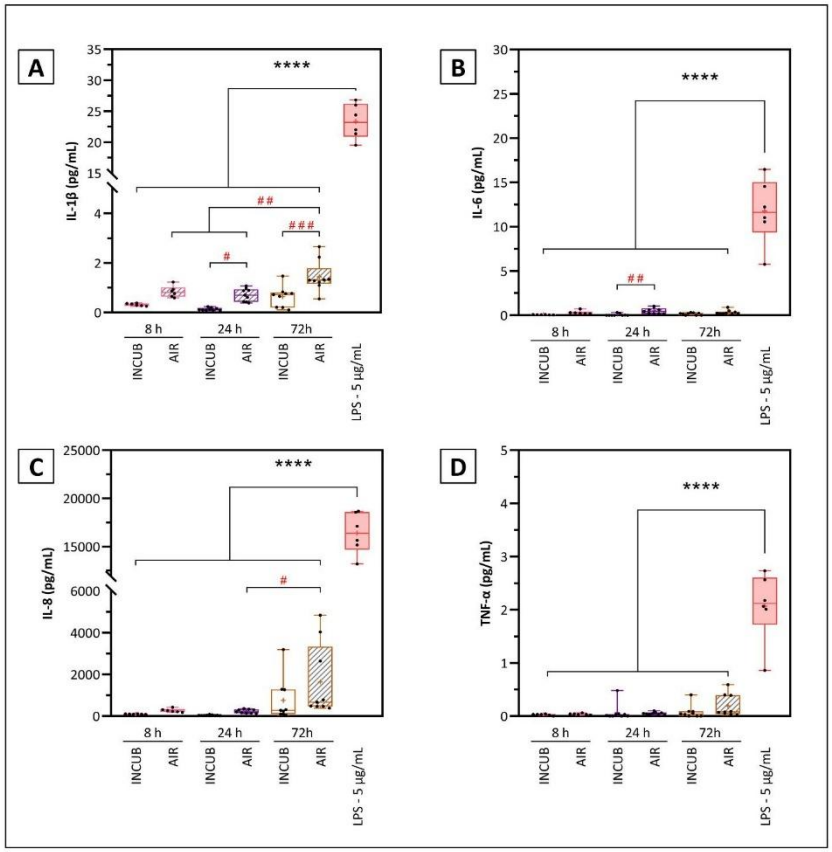


Fig. 7. (Pro)-inflammatory cytokines secreted by cell coculture exposed to clean air flow for 8, 24 and 72 h with Cultex® system after six days of air-liquid interface (ALI) acclimatization. (Pro)-inflammatory cytokine levels secreted by the cell coculture exposed to clean air (AIR – hatched boxplots) or after 24 h in incubator (INCUB – empty boxplots) during 8 h (pink boxplots), 24 h (purple boxplots) and 72 h (brown boxplots) were measured using a specific multiplex MSD assay. (A) Interleukin 1β (IL-1β), (B) Interleukin 6 (IL-6), (C) Interleukin 8 (IL-8), (D) Tumor necrosis factor α (TNF-α). Lipopolysaccharide (LPS) condition (red boxplots) corresponds to the positive inflammation control. Boxes represent 25th and 75th percentiles of data. Horizontal lines in boxes and cross symbols represent median and mean values, respectively All the data points are shown individually (black dots), the vertical lines represent ± SD (n = 6) from 2 independent experiments for 8 h exposure condition and (n = 9) from three independent experiments for 24 and 72 h exposure. Two statistical tests have been performed, one including LPS positive control (****$p < 0.0001$) and one excluding LPS positive control (#$p < 0.05$, ##$p < 0.01$, ###$p < 0.001$, ####$p < 0.0001$). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

		AhR pathway				*Oxidative stress*				*Cellular Cycle*
		AhR	*AhRR*	*CYP1A1*	*CYP2E2*	*KEAP1*	*NRF2*	*HMOX1*	*SOD1*	*TP53*
Reference: Coculture – INCUB										
AIR	**Coculture**	0.0	-0.5	3.6	0.3	-0.1	0.9	1.6	0.7	0.5

Fig. 8. Influence of air flow exposure on the expression of some specific genes of the aryl hydrocarbon receptor (AhR) and antioxidant signaling pathways and cell cycle control, in mono- and cocultures, after six days of air-liquid interface ALI acclimatization dans 24 h of exposure with Cultex® system by comparison of mRNA expression with RTqPCR – Six days ALI acclimatization model. 1st comparison: log(2) RQ of mono (A549 and Ci-hAELVi – AIR) and coculture (Coculture – AIR) were compared. 2nd comparison: log(2) RQ of coculture exposed to air (Coculture – AIR) were compared to log(2) RQ of coculture remained at incubator (Coculture – INCUB). Comparison is expressed in fold change represented by log(2) of RQ calculated (Tables S5 and S6). ND corresponds to non-detected, was set at CT > 36. A, B: Data results are shown as a heat map (n = 3) from one experiment. Chosen markers represent the aryl hydrocarbon receptor pathway (*AhR; Aryl hydrocarbon receptor Repressor - AhRR; Cytochrome P450 family 1 subfamily A member 1, CYP1A1; Cytochrome P450 family 2 subfamily E member 1, CYP2E1*), oxidative stress pathway (*Kelch like ECH associated protein 1, KEAP1; Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (NFE2F2), NRF2; Heme Oxygenase 1, HMOX1; Superoxide Dismutase 1, SOD1*) and cellular cycle markers (*Tumor protein p53, TP53*).

downregulating AT1 tight junction gene expression (Fig. S9). Thus, huAEC cell culture medium was selected for this coculture model for its

benefits on A549 behavior while preserving Ci-hAELVi cell line integrity and for its low fetal bovine serum content.

The absence of cytotoxicity and high metabolic activity after six days of ALI demonstrated the biocompatibility of the two cell lines together, in coculture. In contrast, cell coculture accustomed to ALI for only 24 h behaved differently: the A549 cell line showed higher cell numbers than the Ci-hAELVi one during 24 h ALI acclimatization. In addition, the metabolic activity observed for the short acclimatization model after AIR exposure showed higher levels than those of INCUB controls supporting the importance of acclimatization to ALI allowing a turnover in cell proliferation, which could confer a certain stability to the coculture model, as already shown for A549 cell line (Wu et al., 2018). Under ALI conditions, A549 cells could reconstitute epithelial cell layers and partially mimic properties of human alveolar epithelium by expressing key cell markers such as *AQP5*, *SP-C* or *ZO-1*. Wu et al. (2018) have also concluded that A549 cells could constitute an alternative model to study the key roles and underlying mechanisms occurring within human alveolar epithelium *in vitro*.

Another key criterion of physiological relevance lay in the ability of the coculture model to reproduce some of the critical hallmarks of the alveolar function, such as pulmonary surfactant production. This function is not only essential for maintaining alveolar integrity and preventing collapse but also reflects maturation and specialization of alveolar epithelium cells within the model (Fehrenbach, 2001).

4.2. Coculture of Ci-hAELVi and A549 cell lines exhibited properties of human alveolar epithelium

In human alveolar tissues, pulmonary surfactants form a lining over alveoli, acting as the final physical barrier that protects pneumocytes. This protective function is made possible by its hydrophobic lipid-protein composition (Castillo-Sánchez et al., 2022; Fehrenbach, 2001; Lopez-Rodriguez and Pérez-Gil, 2014). Synthetized by AT2 cells, the surfactant is stored in lamellar bodies and subsequently secreted into alveolar space, where it reduces surface tension (Olmeda et al., 2017). This prevents alveolar collapse, promotes stabilization of alveoli of varying sizes, limits overdistension of larger alveoli, and preserves small airway patency (Dushianthan et al., 2012; Raghavendran et al., 2011). In A549 cell line, expression of key surfactant proteins, including SP-B, SP-C, and SP-D, has been previously reported (Das et al., 2024; Wu et al., 2018). Accordingly, our results confirmed the absence of *SP-A gene* expression in A549 cells (Das et al., 2024; Yang et al., 2022). Although Ci-hAELVi cell line is generally considered to exhibit an AT1 pneumocyte-like phenotype, *SP-A*, *SP-C*, and *SP-D* gene expression have been detected in the cell system. This finding contrasts with some other studies that reported the absence of *SP* expression, including *SP-C* (Kuehn et al., 2016). Such discrepancies may arise from the difference in cell culture conditions and/or ALI exposure, or incomplete phenotypic characterization. These new observations could suggest that the Ci-hAELVi cell line may not be fully differentiated into a mature AT1 pneumocyte phenotype under certain conditions, and support the recent creation of the new Arlo cell line (Carius et al., 2023). At the protein level, SP-B and SP-D were quantifiable under all culture conditions, and co-cultures produced higher amounts than monocultures, suggesting an enhanced secretory functional phenotype. This is consistent with previous studies showing that A549 cell line and other immortalized lung epithelial cell lines can secrete SP-B and SP-D under specific culture conditions (Kamio et al., 2015; Nova et al., 2020). Although the concentrations measured *in vitro* remained almost 10-fold lower than those reported for primary human AT2 cells, our data nevertheless demonstrated that the cell coculture was capable of producing higher, measurable, and culture condition-dependent amounts of SP-B and SP-D, highlighting increased physiological relevance compared to monocultures (Beresford and Shaw, 2003; Mao et al., 2015). It is important to note that this capacity is enhanced under ALI conditions, which is known to promote functions associated with SP (Fehrholz et al., 2017). In our effort to establish a coculture model that reproduces as better as possible the alveolar microenvironment, the detection and modulation of SP in the cell coculture further supports its added value for respiratory toxicology as the presence of surfactant is a key determinant of particle interaction, deposition, and cellular responses.

Other key features of the human lung epithelial cells were reported in A549 cell line such as *mucins* (*MUC*) as published elsewhere (Berger et al., 1999; Kishimoto et al., 2024). In healthy human lungs, mucus is primarily secreted by the bronchial epithelial cells, not the alveolar ones. Nevertheless, as detected in the coculture model, A549 cells expressed several gel-forming mucins such as *MUC2*, *MUC5AC* and *MUC5B* likely due to their cancerous origin and ambiguous phenotype. Although mucin expression is non-physiological, it may be advantageous for toxicological studies. Like *SP*, *mucins* can be used as biomarkers of respiratory toxicity (Sánchez-Gasca et al., 2025; Kishimoto et al., 2024; Thornton et al., 2008; Yang et al., 2022).

AT1-specific markers were also detected in the coculture model, including *CAV1*, *KRT14* and cell adhesion proteins. Cell adhesion markers were downregulated in the A549 cells compared to the Ci-hAELVi ones, according to their respective barrier-forming capacities (Fig. S8) and other results (Brookes et al., 2021; Kletting et al., 2018; Kuehn et al., 2016; Metz et al., 2020). After six days at the ALI, A549 cells still exhibited low TEER and high P_app (> 60%) (Fig. S8A and B), indicating weak barrier properties. In contrast, Ci-hAELVi cells developed a strong barrier after six days of ALI, characterized by high TEER and low P_app (< 30%). In the coculture, the relatively weak barrier properties of A549 cells seemed to compromise the overall epithelial integrity. Immunostaining of E-cadherin and Claudin-1 (data not shown) confirmed that the Ci-hAELVi cell line preferentially formed tight junction among themselves in the coculture, unlike the A549 cell line. Because Ci-hAELVi cells forms only clusters and not a full cell layer, the coculture of Ci-hAELVi and A549 cell lines maintained a relatively low TEER ($\approx 300\ \Omega.cm^2$) and a relatively high P_app (> 50%) compare to Ci-hAELVi alone, $\approx 1000\ \Omega.cm^2$ at same time of ALI acclimatization (Kuehn et al., 2016).

Acute exposure of cell coculture to both positive controls, ZnO and LPS, induced toxicological and inflammatory responses, further suggesting the biological sensitivity and relevance of our coculture model. ZnO is well-known to trigger oxidative stress, inflammatory and epithelial cell injury (Fernández-Bertólez et al., 2024; Liao et al., 2020; Liu et al., 2020; Sahu et al., 2013; Xie et al., 2012). During the experiments of exposure to ZnO, acute inflammatory injury was associated with a marked decrease in SP-B expression, which aligned with the reduction observed after LPS exposure (Beers et al., 1999; Bein et al., 2013; Gregory et al., 1991; Veldhuizen et al., 1995). Conversely, SP-D behaved as an inducible SP whose expression increased during inflammation and epithelial damage, contributing to the protection of surfactant lipids and resident macrophages from oxidative damage (Bridges et al., 2000; Kuroki et al., 1998). In our experiments, LPS also proved to be a robust positive control for both cytokine and surfactant secretion, offering a simple and reproducible reference that can be readily implemented in similar *in vitro* assays.

Compared with primary alveolar epithelial models, coculture model exhibited surfactant production, as evidenced by the presence of multilamellar bodies and lipid droplets in A549 and hAELVi cell lines (Cooper et al., 2016; Kuehn et al., 2016; Lehmann et al., 2011). The squamous epithelial phenotype typical of primary AT1 cells is also supported by the expression of *KRT14* in the Ci-hAELVi cell line. Consistent with primary cell models, both A549 and Ci-hAELVi cells expressed key markers of alveolar epithelium, including AQP5, PDPN, and *CAV-1*, thereby suggesting the formation of caveolae which are needed for surfactant signaling (Diem et al., 2020). Nevertheless, expression levels of the studied markers could differ from those observed in human tissues *in vivo*, leading to different responses to air pollutant exposure. Recent studies showed that both Ci-hAELVi and A549 cell lines display comparable expression profiles and functional activity of

pulmonary efflux transporters to those observed in primary AT1 and AT2 cells, respectively (Simon et al., 2025).

The short-term acclimatization model (24 h of ALI), showed a weaker barrier function (Fig. S8B, D) than the prolonged acclimatization model (six days of ALI) (Fig. S8A, C) highlighting the importance of ALI acclimatization duration. In the short acclimatization model, A549 cells expressed few adherent proteins and Ci-hAELVi cells could not form a tight barrier (Fig. S8B and D). When comparing short- and long-term acclimatization models, *SP* expression levels were different between the two cell lines: A549 cells expressed *SP-A1* gene while Ci-hAELVi cells did not express *SP-C* gene. The expression levels of SP were also different depending on air exposure. These results underscore the importance of characterizing cell models in relation to their acclimatization period at the ALI and subsequent exposure conditions. Once an appropriate ALI adaptation phase has been identified and validated, the next essential step is to replicate alveolar microenvironment through carefully controlled air exposure.

4.3. ALI exposure conditions of Ci-hAELVi and A549 cell lines in coculture

While *in vivo* animals models enable to study lung tissue and respiratory function, *in vitro* cell models require careful design, particularly regarding cell type selection and exposure method to mimic breathing dynamics. Thanks to optimized culture conditions, our coculture model provided a robust alveolar model compatible with ALI conditions, closely reflecting pulmonary physiology. ALI enable realistic exposure to gas and airborne particles (Baldassi et al., 2021; Cao et al., 2021; Jaber and Billet, 2024; Lacroix et al., 2018; Navarrete-Aliaga et al., 2025; Upadhyay and Palmberg, 2018). However, air exposure is technically challenging and can rapidly induce irreversible damage including membrane lesions, oxidative stress or desiccation of the cell layer (Baldassi et al., 2021; Paur et al., 2011; Petersen et al., 2021; Upadhyay and Palmberg, 2018). To simulate alveolar microenvironment while minimizing cytotoxicity, our exposure protocol was carefully optimized to maintain about 80% relative humidity, 5% CO_2, and a constant airflow supply consistent with physiological intra-alveolar condition (Krogh and Lindhard, 1914; Mackay, 1940; van den Velde et al., 2007; Zavala et al., 2017). Based on preliminary tests and manufacturer guidelines of Cultex® and VitroCell® systems, cells were exposed to airflow at 10 mL/min supplemented with 5% CO_2. This CO_2 supplementation maintained physiological pH without the need for HEPES, a buffer known to be cytotoxic (Zigler et al., 1985). Temperature-humidity checking further confirmed that heating the culture medium to 37 °C provided sufficient internal humidification, avoiding the need for external devices.

The established conditions we developed allowed also the coculture model to be directly transferred from one ALI exposure system to another (see Section 2.2). The cell coculture exposed to AIR remained stable over 8 – 72 h of exposure, displaying normal metabolic activity, viability, cell morphology, or barrier function dynamics. Moreover, whatever the exposure time, air exposure appeared to induce a weak inflammatory response, although this was not statistically significant. In Ci-hAELVi cell line, exposure to air elicited a weak secretion of (pro)-inflammatory cytokine (Fig. S10). Although any increase of cytokine secretion was not reported in coculture, it is important to note that exposure to clean air could activate some cell signaling pathways as previously shown (Bredeck et al., 2025; Zimmermann et al., 2025). However, it is well established that ALI exposure can influence cellular morphology and gene expression (Kuehn et al., 2016; Wu et al., 2018). Accordingly, in the cell coculture, *CYP1A1* gene expression was significantly increased after air exposure, supporting the AhR signaling pathway activation. Although this signaling pathway has been shown to be activated by exogenous ligands such as PAHs or dioxins (Vogel et al., 2020). It has also been demonstrated that AhR can respond to mechanical stimuli, particularly shear stress (Conway et al., 2009; Han et al., 2008; Lano et al., 2020). Accordingly, the significant decrease in *CAV-1* expression (Fig. 3) observed in our model is consistent with previous works showing increased caveolae formation and reduced *CAV-1* expression under mechanical stress (Boyd et al., 2003). Caveolae play a key mechano-transducer role by responding to mechanical stress induced by artificial ventilation in humans (Diem et al., 2020). At the plasma membrane level, this stress stimulates the entry of Ca^{2+}, leading to a transient accumulation of intracellular ATP, which is likely to activate the NLRP3 inflammasome, and trigger IL-1β secretion (Gicquel et al., 2017; Liang et al., 2019). This increase in ATP also promotes SP secretion, as shown in our study (Diem et al., 2020). These reactions are more pronounced following the abrupt cessation of physical stress (Milovanova et al., 2008). Increased *KRT14* expression levels following air exposure therefore suggest cytoskeletal remodeling that compensates for physical damage caused by air exposure. Thus, concomitant activation of the AhR and cell remodeling-signaling pathways appeared to result primarily from the mechanical stress exerted by airflow. These findings warrant further investigation to better characterize airflow impacts and optimize ALI exposure conditions. The weak activation of all the cell signaling pathways under study and the reported (pro)-inflammatory cytokines secretion both indicated that cells implemented a defense system. Similar activation of these signaling pathways was observed in the 24 h ALI acclimatized model, indicating that acclimatization time did not influence this response but that it was instead driven by a mechanistic effect of air exposure.

Taken these results together, the A549/Ci-hAELVi coculture provided a simple, rapid, and cost-effective relevant cell coculture model that better reproduced *in vitro* some of the key features of the human alveolar epithelium than monocultures. Moreover, huAEC cell culture medium strengthened the AT2 pneumocyte-like phenotype of A549 cells by increasing SP expression, while the cell coculture carefully preserved the complementary AT1 and AT2 phenotype markers and maintained the physiological integrity during prolonged ALI exposure. The new alveolar epithelial coculture model responded consistently to the two toxicants tested, under both ALI and submerged conditions, confirming its functional relevance. Nonetheless, standard ALI exposures can trigger post-translational changes affecting specific cell signaling pathways such as AhR, antioxidant, cell remodeling and inflammation.

4.4. Limitations

As with all the other *in vitro* models, simulation of physiological human reality by the cell coculture model developed here remains imperfect. The main objective of our work was to reproduce human alveolar physiology as faithfully as possible. Despite its human alveolar physiological relevance, differences were observed between control cells maintained in an incubator and those exposed to clean air. Although exposure to airflow at the ALI did not significantly affect major toxicological endpoints, there were relatively slight transcriptional changes in some of the critical cell signaling pathways classically induced in the alveolar epithelium in response to toxic insults, notably indicating the occurrence of a mechanical stress induced by the airflow itself. These effects are consistent with other dynamic exposure studies and highlight the need to consider mechanical stress as an intrinsic component of current ALI systems (Bredeck et al., 2025). Our coculture model lacked physiological mechanical stimulation such as cyclic stretching and shear stress, which are inherent to breathing dynamics and alveolar microcirculation. This limitation, still common to all the ALI exposure systems, could influence gene expression and the behavior of the cell model in the same way as with exposure to air alone. Further refinements, such as sequential seeding (*e.g.*, Ci-hAELVi cells first, followed by A549 cells), may improve barrier formation for permeability testing and particles crossing quantification. The addition of cell lines such as THP-1 could enhance inflammatory responses and support intracellular signaling. The simplicity of the co-culture model makes such improvements feasible and will strengthen its reliability for evaluating barrier-related

parameters in future inhalation toxicology studies.

5. Conclusion

Reproducing physiologically relevant inhalation conditions *in vitro* remains challenging due to the complexity of the alveolar environment. Here, we proposed a new coculture model of A549 and Ci-hAELVi cells that recapitulated some of the key features of the human alveolar epithelium under ALI. The cell coculture constrained the uncontrolled proliferation of A549 cells, enhanced SP expression, and maintained stable metabolic activity and epithelial integrity without cytotoxicity. Complementary AT1- and AT2 phenotype-specific gene and protein expression profiles yield a physiologically relevant mixed alveolar epithelial phenotype. The cell culture model triggered an appropriate inflammatory response and retained structural and functional stability during prolonged ALI exposures (up to 72 h), providing a substantial advantage over many existing *in vitro* systems restricted to shorter exposure windows. Overall, this relevant cell coculture model offered an effective balance between physiological relevance and practical accessibility, making it well suited for preliminary inhalation toxicology screening particularly in contexts requiring rapid deployment, low cost, and strong reproducibility while serving as a strategic entry point before engaging more complex or primary cell-based models.

CRediT authorship contribution statement

Aurelia Alunni: Writing – original draft, Visualization, Validation, Methodology, Investigation, Formal analysis, Data curation, Conceptualization. **Ophélie Simonin:** Writing – review & editing, Methodology, Investigation. **Guillaume Barbier:** Writing – review & editing, Methodology, Investigation. **Maxime Floreani:** Writing – review & editing, Methodology, Investigation. **Alexandre Albinet:** Writing – review & editing, Validation, Supervision, Resources, Project administration, Methodology, Funding acquisition. **Guillaume Garçon:** Writing – review & editing, Visualization, Supervision, Resources, Methodology, Investigation, Formal analysis, Data curation, Conceptualization. **Bénédicte Trouiller:** Writing – review & editing, Validation, Supervision, Resources, Project administration, Methodology, Investigation, Funding acquisition, Formal analysis, Data curation, Conceptualization.

Funding

This work has been performed within the framework of the SOTOX project funded by the French air quality penalty and the French Ministry of Environment.

Declaration of competing interest

The authors declare the following financial interests/personal relationships which may be considered as potential competing interests:

Alunni Aurelia reports financial support was provided by French Ministry of Environment. If there are other authors, they declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

The authors thank Jean-Marc Lo Guidice for providing access to the IMPECS laboratory and for generously supplying RT-qPCR consumables and chemicals.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at https://doi.org/10.1016/j.tiv.2026.106200.

Data availability

Data will be made available on request.

References

Abo, K.M., Sainz de Aja, J., Lindstrom-Vautrin, J., Alysandratos, K.-D., Richards, A., Garcia-de-Alba, C., Huang, J., Hix, O.T., Werder, R.B., Bullitt, E., Hinds, A., Falconer, I., Villacorta-Martin, C., Jaenisch, R., Kim, C.F., Kotton, D.N., Wilson, A.A., 2022. Air-liquid interface culture promotes maturation and allows environmental exposure of pluripotent stem cell–derived alveolar epithelium. JCI Insight 7, e155589. https://doi.org/10.1172/jci.insight.155589.

Alcorn, J.L., 2017. Chapter 4 - pulmonary surfactant trafficking and homeostasis. In: Sidhaye, V.K., Koval, M. (Eds.), Lung Epithelial Biology in the Pathogenesis of Pulmonary Disease. Academic Press, Boston, pp. 59–75. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803809-3.00004-X.

Arfin, T., Pillai, A.M., Mathew, N., Tirpude, A., Bang, R., Mondal, P., 2023. An overview of atmospheric aerosol and their effects on human health. Environ. Sci. Pollut. Res. 30, 125347–125369. https://doi.org/10.1007/s11356-023-29652-w.

Baldassi, D., Gabold, B., Merkel, O.M., 2021. Air–liquid interface cultures of the healthy and diseased human respiratory tract: promises, challenges, and future directions. Adv. NanoBiomed Res. 1, 2000111. https://doi.org/10.1002/anbr.202000111.

Barkauskas, C.E., Cronce, M.J., Rackley, C.R., Bowie, E.J., Keene, D.R., Stripp, B.R., Randell, S.H., Noble, P.W., Hogan, B.L.M., 2013. Type 2 alveolar cells are stem cells in adult lung. J. Clin. Invest. 123, 3025–3036. https://doi.org/10.1172/JCI68782.

Barkauskas, C.E., Chung, M.-I., Fioret, B., Gao, X., Katsura, H., Hogan, B.L.M., 2017. Lung organoids: current uses and future promise. Development 144, 986–997. https://doi.org/10.1242/dev.140103.

Beers, M.F., Atochina, E.N., Preston, A.M., Beck, J.M., 1999. Inhibition of lung surfactant protein B expression during *Pneumocystis carinii* pneumonia in mice. J. Lab. Clin. Med. 133, 423–433. https://doi.org/10.1016/S0022-2143(99)90019-7.

Bein, K., Di Giuseppe, M., Mischler, S.E., Ortiz, L.A., Leikauf, G.D., 2013. LPS-treated macrophage cytokines repress surfactant protein–B in lung epithelial cells. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 49, 306–315. https://doi.org/10.1165/rcmb.2012-0283OC.

Beresford, M.W., Shaw, N.J., 2003. Bronchoalveolar lavage surfactant protein A, B, and D concentrations in preterm infants ventilated for respiratory distress syndrome receiving natural and synthetic surfactants. Pediatr. Res. 53, 663–670. https://doi.org/10.1203/01.PDR.0000054653.89527.F8.

Berger, J.T., Voynow, J.A., Peters, K.W., Rose, M.C., 1999. Respiratory carcinoma cell lines. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 20, 500–510. https://doi.org/10.1165/ajrcmb.20.3.3383.

Bessaguet, F., Desmoulière, A., 2021. Les poumons. Actual. Pharm. 60, 55–59. https://doi.org/10.1016/j.actpha.2020.12.017.

Bluhmki, T., Traub, S., Müller, A.-K., Bitzer, S., Schruf, E., Bammert, M.-T., Leist, M., Gantner, F., Garnett, J.P., Heilker, R., 2021. Functional human iPSC-derived alveolar-like cells cultured in a miniaturized 96-Transwell air–liquid interface model. Sci. Rep. 11, 17028. https://doi.org/10.1038/s41598-021-96565-4.

Boyd, N.L., Park, H., Yi, H., Boo, Y.C., Sorescu, G.P., Sykes, M., Jo, H., 2003. Chronic shear induces caveolae formation and alters ERK and Akt responses in endothelial cells. Am. J. Phys. Heart Circ. Phys. 285, H1113–H1122. https://doi.org/10.1152/ajpheart.00302.2003.

Brandt, R., Timm, S., López, J.L.G., Abledu, J.K., Kuebler, W.M., Hackenberger, C.P.R., Ochs, M., Lopez-Rodriguez, E., 2020. Metabolic glycoengineering enables the ultrastructural visualization of sialic acids in the glycocalyx of the alveolar epithelial cell line hAELVi. Front. Bioeng. Biotechnol. 8. https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.614357.

Bredeck, G., Wahle, T., Kämpfer, A.A.M., Dobner, J., Boere, A.J.F., Fokkens, P., Duistermaat, E., Spannbrucker, T., Rossi, A., Cassee, F.R., Schins, R.P.F., 2025. Assessing the toxicity of traffic-derived air pollution using a primary human air-liquid interface airway *in vitro* model. Environ. Res. 285, 122399. https://doi.org/10.1016/j.envres.2025.122399.

Bridges, J.P., Davis, H.W., Damodarasamy, M., Kuroki, Y., Howles, G., Hui, D.Y., McCormack, F.X., 2000. Pulmonary surfactant proteins A and D are potent endogenous inhibitors of lipid peroxidation and oxidative cellular injury. J. Biol. Chem. 275, 38848–38855. https://doi.org/10.1074/jbc.M005322200.

Brookes, O., Boland, S., Kuen, R.L., Miremont, D., Movassat, J., Baeza-Squiban, A., 2021. Co-culture of type I and type II pneumocytes as a model of alveolar epithelium. PloS One 16, e0248798. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0248798.

Cao, X., Coyle, J.P., Xiong, R., Wang, Y., Heflich, R.H., Ren, B., Gwinn, W.M., Hayden, P., Rojanasakul, L., 2021. Invited review: human air-liquid-interface organotypic airway tissue models derived from primary tracheobronchial epithelial cells—overview and perspectives. In Vitro Cell Dev. Biol. Anim. 57, 104–132. https://doi.org/10.1007/s11626-020-00517-7.

Carius, P., Jungmann, A., Bechtel, M., Grißmer, A., Boese, A., Gasparoni, G., Salhab, A., Seipelt, R., Urbschat, K., Richter, C., Meier, C., Bojkova, D., Cinatl, J., Walter, J., Schneider-Daum, N., Lehr, C., 2023. A monoclonal human alveolar epithelial cell line ("Arlo") with pronounced barrier function for studying drug permeability and viral infections. Adv. Sci. (Weinh.) 10, 2207301. https://doi.org/10.1002/advs.202207301.

Castillo-Sánchez, J.C., Roldán, N., García-Álvarez, B., Batllori, E., Galindo, A., Cruz, A., Pérez-Gil, J., 2022. The highly packed and dehydrated structure of preformed unexposed human pulmonary surfactant isolated from amniotic fluid. Am. J. Phys. Lung Cell. Mol. Phys. 322, L191–L203. https://doi.org/10.1152/ajplung.00230.2021.

Conway, D.E., Sakurai, Y., Weiss, D., Vega, J.D., Taylor, W.R., Jo, H., Eskin, S.G., Marcus, C.B., McIntire, L.V., 2009. Expression of CYP1A1 and CYP1B1 in human endothelial cells: regulation by fluid shear stress. Cardiovasc. Res. 81, 669–677. https://doi.org/10.1093/cvr/cvn360.

Cooper, J.R., Abdullatif, M.B., Burnett, E.C., Kempsell, K.E., Conforti, F., Tolley, H., Collins, J.E., Davies, D.E., 2016. Long term culture of the A549 cancer cell line promotes multilamellar body formation and differentiation towards an alveolar type II pneumocyte phenotype. PloS One 11, e0164438. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164438.

Das, S.K., Ali, M., Shetake, N.G., Pandey, B.N., Kumar, A., 2024. Thorium alters lung surfactant protein expression in alveolar epithelial cells: in vitro and in vivo investigation. Environ. Sci. Technol. 58, 12330–12342. https://doi.org/10.1021/acs.est.4c00254.

de Bont, J., Jaganathan, S., Dahlquist, M., Persson, Å., Stafoggia, M., Ljungman, P., 2022. Ambient air pollution and cardiovascular diseases: an umbrella review of systematic reviews and meta-analyses. J. Intern. Med. 291, 779–800. https://doi.org/10.1111/joim.13467.

Diem, K., Fauler, M., Fois, G., Hellmann, A., Winokurow, N., Schumacher, S., Kranz, C., Frick, M., 2020. Mechanical stretch activates piezo1 in caveolae of alveolar type I cells to trigger ATP release and paracrine stimulation of surfactant secretion from alveolar type II cells. FASEB J. 34, 12785–12804. https://doi.org/10.1096/fj.202000613RRR.

Directive - EU - 2024/2881 - EN - EUR-Lex, 2025. https://eur-lex.europa.eu/eli/dir/2024/2881/oj/eng last access: 21 May 2025.

Dobbs, L.G., Gonzalez, R.F., Allen, L., Froh, D.K., 1999. HTI56, an integral membrane protein specific to human alveolar type I cells. J. Histochem. Cytochem. 47, 129–137. https://doi.org/10.1177/002215549904700202.

Dushianthan, A., Cusack, R., Goss, V., Postle, A.D., Grocott, M.P.W., 2012. Clinical review: exogenous surfactant therapy for acute lung injury/acute respiratory distress syndrome—where do we go from here? Crit. Care 16, 238. https://doi.org/10.1186/cc11512.

Fehrenbach, H., 2001. Alveolar epithelial type II cell: defender of the alveolus revisited. Respir. Res. 2, 33–46. https://doi.org/10.1186/rr36.

Fehrholz, M., Seidenspinner, S., Kunzmann, S., 2017. Expression of surfactant protein B is dependent on cell density in H441 lung epithelial cells. PloS One 12, e0184556. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184556.

Fernández-Bertólez, N., Alba-González, A., Touzani, A., Ramos-Pan, L., Méndez, J., Reis, A.T., Quelle-Regaldie, A., Sánchez, L., Folgueira, M., Laffon, B., Valdiglesias, V., 2024. Toxicity of zinc oxide nanoparticles: cellular and behavioural effects. Chemosphere 363, 142993. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2024.142993.

Foster, K.A., Oster, C.G., Mayer, M.M., Avery, M.L., Audus, K.L., 1998. Characterization of the A549 cell line as a type II pulmonary epithelial cell model for drug metabolism. Exp. Cell Res. 243, 359–366. https://doi.org/10.1006/excr.1998.4172.

Fu, P., Guo, X., Cheung, F.M.H., Yung, K.K., 2019. The association between PM2.5 exposure and neurological disorders: a systematic review and meta-analysis. Sci. Total Environ. 655, 1240–1248. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.11.218.

Fuller, R., Landrigan, P.J., Balakrishnan, K., Bathan, G., Bose-O'Reilly, S., Brauer, M., Caravanos, J., Chiles, T., Cohen, A., Corra, L., Cropper, M., Ferraro, G., Hanna, J., Hanrahan, D., Hu, H., Hunter, D., Janata, G., Kupka, R., Lanphear, B., Lichtveld, M., Martin, K., Mustapha, A., Sanchez-Triana, E., Sandilya, K., Schaefli, L., Shaw, J., Seddon, J., Suk, W., Téllez-Rojo, M.M., Yan, C., 2022. Pollution and health: a progress update. Lancet Planet Health 6, e535–e547. https://doi.org/10.1016/S2542-5196(22)00090-0.

Gazdar, A.F., Linnoila, R.I., Kurita, Y., Oie, H.K., Mulshine, J.L., Clark, J.C., Whitsett, J. A., 1990. Peripheral airway cell differentiation in human lung cancer cell lines. Cancer Res. 50, 5481–5487.

Gicquel, T., Le Daré, B., Boichot, E., Lagente, V., 2017. Purinergic receptors: new targets for the treatment of gout and fibrosis. Fundam. Clin. Pharmacol. 31, 136–146. https://doi.org/10.1111/fcp.12256.

Gonzalez, R.F., Allen, L., Gonzales, L., Ballard, P.L., Dobbs, L.G., 2010. HTII-280, a biomarker specific to the apical plasma membrane of human lung alveolar type II cells. J. Histochem. Cytochem. 58, 891–901. https://doi.org/10.1369/jhc.2010.956433.

Gregory, T.J., Longmore, W.J., Moxley, M.A., Whitsett, J.A., Reed, C.R., Fowler, A.A., Hudson, L.D., Maunder, R.J., Crim, C., Hyers, T.M., 1991. Surfactant chemical composition and biophysical activity in acute respiratory distress syndrome. J. Clin. Invest. 88, 1976–1981. https://doi.org/10.1172/JCI115523.

Guillot, L., Nathan, N., Tabary, O., Thouvenin, G., Le Rouzic, P., Corvol, H., Amselem, S., Clement, A., 2013. Alveolar epithelial cells: master regulators of lung homeostasis. Int. J. Biochem. Cell Biol. 45, 2568–2573. https://doi.org/10.1016/j.biocel.2013.08.009.

Hackenberg, S., Scherzed, A., Technau, A., Kessler, M., Froelich, K., Ginzkey, C., Koehler, C., Burghartz, M., Hagen, R., Kleinsasser, N., 2011. Cytotoxic, genotoxic and pro-inflammatory effects of zinc oxide nanoparticles in human nasal mucosa cells in vitro. Toxicol. In Vitro 25, 657–663. https://doi.org/10.1016/j.tiv.2011.01.003.

Han, Z., Miwa, Y., Obikane, H., Mitsumata, M., Takahashi-Yanaga, F., Morimoto, S., Sasaguri, T., 2008. Aryl hydrocarbon receptor mediates laminar fluid shear stress-induced CYP1A1 activation and cell cycle arrest in vascular endothelial cells. Cardiovasc. Res. 77, 809–818. https://doi.org/10.1093/cvr/cvm095.

Heal, M.R., Kumar, P., Harrison, R.M., 2012. Particles, air quality, policy and health. Chem. Soc. Rev. 41, 6606–6630. https://doi.org/10.1039/C2CS35076A.

Hiemstra, P.S., Tetley, T.D., Janes, S.M., 2019. Airway and alveolar epithelial cells in culture. Eur. Respir. J. 54. https://doi.org/10.1183/13993003.00742-2019.

Hubrecht, R.C., Carter, E., 2019. The 3Rs and humane experimental technique: implementing change. Animals (Basel) 9, 754. https://doi.org/10.3390/ani9100754.

Hurley, K., Ding, J., Villacorta-Martin, C., Herriges, M.J., Jacob, A., Vedaie, M., Alysandratos, K.D., Sun, Y.L., Lin, C., Werder, R.B., Huang, J., Wilson, A.A., Mithal, A., Mostoslavsky, G., Oglesby, I., Caballero, I.S., Guttentag, S.H., Ahangari, F., Kaminski, N., Rodriguez-Fraticelli, A., Camargo, F., Bar-Joseph, Z., Kotton, D.N., 2020. Reconstructed single-cell fate trajectories define lineage plasticity windows during differentiation of human PSC-derived distal lung progenitors. Cell Stem Cell 26, 593–608.e8. https://doi.org/10.1016/j.stem.2019.12.009.

Jaber, N., Billet, S., 2024. How to use an in vitro approach to characterize the toxicity of airborne compounds. Toxicol. In Vitro 94, 105718. https://doi.org/10.1016/j.tiv.2023.105718.

Jacob, A., Morley, M., Hawkins, F., McCauley, K.B., Jean, J.C., Heins, H., Na, C.-L., Weaver, T.E., Vedaie, M., Hurley, K., Hinds, A., Russo, S.J., Kook, S., Zacharias, W., Ochs, M., Traber, K., Quinton, L.J., Crane, A., Davis, B.R., White, F.V., Wambach, J., Whitsett, J.A., Cole, F.S., Morrisey, E.E., Guttentag, S.H., Beers, M.F., Kotton, D.N., 2017. Differentiation of human pluripotent stem cells into functional lung alveolar epithelial cells. Cell Stem Cell 21, 472–488.e10. https://doi.org/10.1016/j.stem.2017.08.014.

Kamio, K., Usuki, J., Azuma, A., Matsuda, K., Ishii, T., Inomata, M., Hayashi, H., Kokuho, N., Fujita, K., Saito, Y., Miya, T., Gemma, A., 2015. Nintedanib modulates surfactant protein-D expression in A549 human lung epithelial cells via the c-Jun N-terminal kinase-activator protein-1 pathway. Pulm. Pharmacol. Ther. 32, 29–36. https://doi.org/10.1016/j.pupt.2015.03.001.

Kathiriya, J.J., Wang, C., Zhou, M., Brumwell, A., Cassandras, M., Le Saux, C.J., Cohen, M., Alysandratos, K.-D., Wang, B., Wolters, P., Matthay, M., Kotton, D.N., Chapman, H.A., Peng, T., 2022. Human alveolar type 2 epithelium transdifferentiates into metaplastic KRT5+ basal cells. Nat. Cell Biol. 24, 10–23. https://doi.org/10.1038/s41556-021-00809-4.

Kim, K.-H., Kabir, E., Kabir, S., 2015. A review on the human health impact of airborne particulate matter. Environ. Int. 74, 136–143. https://doi.org/10.1016/j.envint.2014.10.005.

Kim, D., Chen, Z., Zhou, L.-F., Huang, S.-X., 2018. Air pollutants and early origins of respiratory diseases. Chronic Dis. Transl. Med. 4, 75–94. https://doi.org/10.1016/j.cdtm.2018.03.003.

Kishimoto, H., Ridley, C., Inoue, K., Thornton, D.J., 2024. Assessment of polymeric mucin–drug interactions. PloS One 19, e0306058. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0306058.

Kletting, S., Barthold, S., Repnik, U., Griffiths, G., Loretz, B., Schneider-Daum, N., de Souza Carvalho-Wodarz, C., Lehr, C.-M., 2018. Co-culture of human alveolar epithelial (hAELVi) and macrophage (THP-1) cell lines. ALTEX 35, 211–222. https://doi.org/10.14573/altex.1607191.

Krogh, A., Lindhard, J., 1914. On the average composition of the alveolar air and its variations during the respiratory cycle. J. Physiol. 47, 431–445. https://doi.org/10.1113/jphysiol.1914.sp001635.

Kuehn, A., Kletting, S., de Carvalho-Wodarz, C.S., Repnik, U., Griffiths, G., Fischer, U., Meese, E., Huwer, H., Wirth, D., May, T., Schneider-Daum, N., Lehr, C.-M., 2016. Human alveolar epithelial cells expressing tight junctions to model the air-blood barrier. In: ALTEX - Alternatives to animal experimentation, 33, pp. 251–260. https://doi.org/10.14573/altex.1511131.

Kuroki, Y., Takahashi, H., Chiba, H., Akino, T., 1998. Surfactant proteins A and D: disease markers. Biochim. Biophys. Acta 1408, 334–345. https://doi.org/10.1016/S0925-4439(98)00079-9.

Lacroix, G., Koch, W., Ritter, D., Gutleb, A.C., Larsen, S.T., Loret, T., Zanetti, F., Constant, S., Chortarea, S., Rothen-Rutishauser, B., Hiemstra, P.S., Frejafon, E., Hubert, P., Gribaldo, L., Kearns, P., Aublant, J.-M., Diabaté, S., Weiss, C., de Groot, A., Kooter, I., 2018. Air–liquid interface in vitro models for respiratory toxicology research: consensus workshop and recommendations. Appl. In Vitro Toxicol. 4, 91–106. https://doi.org/10.1089/aivt.2017.0034.

Landrigan, P.J., 2017. Air pollution and health. Lancet Public Health 2, e4–e5. https://doi.org/10.1016/S2468-2667(16)30023-8.

Lano, G., Laforêt, M., Von Kotze, C., Perrin, J., Addi, T., Brunet, P., Poitevin, S., Burtey, S., Dou, L., 2020. Aryl hydrocarbon receptor activation and tissue factor induction by fluid shear stress and indoxyl sulfate in endothelial cells. Int. J. Mol. Sci. 21, 2392. https://doi.org/10.3390/ijms21072392.

Lehmann, A.D., Daum, N., Bur, M., Lehr, C.-M., Gehr, P., Rothen-Rutishauser, B.M., 2011. An in vitro triple cell co-culture model with primary cells mimicking the human alveolar epithelial barrier. Eur. J. Pharm. Biopharm. 77, 398–406. https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2010.10.014.

Lelieveld, J., Evans, J.S., Fnais, M., Giannadaki, D., Pozzer, A., 2015. The contribution of outdoor air pollution sources to premature mortality on a global scale. Nature 525, 367–371. https://doi.org/10.1038/nature15371.

Lenz, A.G., Karg, E., Lentner, B., Dittrich, V., Brandenberger, C., Rothen-Rutishauser, B., Schulz, H., Ferron, G.A., Schmid, O., 2009. A dose-controlled system for air-liquid interface cell exposure and application to zinc oxide nanoparticles. Part. Fibre Toxicol. 6, 32. https://doi.org/10.1186/1743-8977-6-32.

Lenz, A.-G., Karg, E., Brendel, E., Hinze-Heyn, H., Maier, K.L., Eickelberg, O., Stoeger, T., Schmid, O., 2013. Inflammatory and oxidative stress responses of an alveolar epithelial cell line to airborne zinc oxide nanoparticles at the air-liquid interface: a comparison with conventional, submerged cell-culture conditions. Biomed. Res. Int. 2013, 652632. https://doi.org/10.1155/2013/652632.

Liang, G.-P., Xu, J., Cao, L.-L., Zeng, Y.-H., Chen, B.-X., Yang, J., Zhang, Z.-W., Kang, Y., 2019. Piezo1 induced apoptosis of type II pneumocytes during ARDS. Respir. Res. 20, 118. https://doi.org/10.1186/s12931-019-1083-1.

Liao, C., Jin, Y., Li, Y., Tjong, S.C., 2020. Interactions of zinc oxide nanostructures with mammalian cells: cytotoxicity and photocatalytic toxicity. Int. J. Mol. Sci. 21, 6305. https://doi.org/10.3390/ijms21176305.

Liu, Z., Lv, X., Xu, L., Liu, X., Zhu, X., Song, E., Song, Y., 2020. Zinc oxide nanoparticles effectively regulate autophagic cell death by activating autophagosome formation and interfering with their maturation. Part. Fibre Toxicol. 17, 46. https://doi.org/10.1186/s12989-020-00379-7.

Lopez-Rodriguez, E., Pérez-Gil, J., 2014. Structure-function relationships in pulmonary surfactant membranes: from biophysics to therapy. Biochim. Biophys. Acta 1838, 1568–1585. https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.01.028.

Loret, T., Peyret, E., Dubreuil, M., Aguerre-Chariol, O., Bressot, C., le Bihan, O., Amodeo, T., Trouiller, B., Braun, A., Egles, C., Lacroix, G., 2016. Air-liquid interface exposure to aerosols of poorly soluble nanomaterials induces different biological activation levels compared to exposure to suspensions. Part. Fibre Toxicol. 13, 58. https://doi.org/10.1186/s12989-016-0171-3.

Lovén, K., Dobric, J., Bölükbas, D.A., Kåredal, M., Tas, S., Rissler, J., Wagner, D.E., Isaxon, C., 2021. Toxicological effects of zinc oxide nanoparticle exposure: an in vitro comparison between dry aerosol air-liquid interface and submerged exposure systems. Nanotoxicology 15, 494–510. https://doi.org/10.1080/17435390.2021.1884301.

Mackay, I.F.S., 1940. The composition of alveolar air. J. Physiol. 98, 73–78. https://doi.org/10.1113/jphysiol.1940.sp003834.

Mao, P., Wu, S., Li, J., Fu, W., He, W., Liu, X., Slutsky, A.S., Zhang, H., Li, Y., 2015. Human alveolar epithelial type II cells in primary culture. Physiol. Rep. 3, e12288. https://doi.org/10.14814/phy2.12288.

Mason, R.J., 2006. Biology of alveolar type II cells. Respirology 11 (Suppl), S12–S15. https://doi.org/10.1111/j.1440-1843.2006.00800.x.

Mason, R.J., Crystal, R.G., 1998. Pulmonary cell biology. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 157, S72–S81. https://doi.org/10.1164/ajrccm.157.4.nhlbi-3.

Metz, J.K., Wiegand, B., Schnur, S., Knoth, K., Schneider-Daum, N., Groß, H., Croston, G., Reinheimer, T.M., Lehr, C.-M., Hittinger, M., 2020. Modulating the barrier function of human alveolar epithelial (hAELVi) cell monolayers as a model of inflammation. Altern. Lab. Anim. 48, 252–267. https://doi.org/10.1177/0261192920983015.

Milovanova, T., Chatterjee, S., Hawkins, B.J., Hong, N., Sorokina, E.M., Debolt, K., Moore, J.S., Madesh, M., Fisher, A.B., 2008. Caveolae are an essential component of the pathway for endothelial cell signaling associated with abrupt reduction of shear stress. Biochim. Biophys. Acta 1783, 1866–1875. https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2008.05.010.

Mitchell, S.M., Meldrum, K., Bateman, J.W.P., Tetley, T.D., Doak, S.H., Clift, 2024. Development and characterisation of a novel complex triple cell culture model of the human alveolar epithelial barrier. Vitro Model 3, 125–137. doi.org/10.1007/s44164-024-00075-2.

Moratin, H., Thöle, A., Lang, J., Ehret Kasemo, T., Stöth, M., Hagen, R., Scherzad, A., Hackenberg, S., 2023. Ag- but not ZnO-nanoparticles disturb the airway epithelial barrier at subtoxic concentrations. Pharmaceutics 15, 2506. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15102506.

Navarrete-Aliaga, Ó., Muriach, M., Delgado-Saborit, J.M., 2025. Toxicological effects of air pollutants on human airway cell models using air–liquid interface systems: a systematic review. Curr. Environ. Health Rep. 12, 26. https://doi.org/10.1007/s40572-025-00491-w.

Neuhaus, W., Samwer, F., Kunzmann, S., Muellenbach, R.M., Wirth, M., Speer, C.P., Roewer, N., Förster, C.Y., 2012. Lung endothelial cells strengthen, but brain endothelial cells weaken barrier properties of a human alveolar epithelium cell culture model. Differentiation 84, 294–304. https://doi.org/10.1016/j.diff.2012.08.006.

Nova, Z., Skovierova, H., Strnadel, J., Halasova, E., Calkovska, A., 2020. Short-term versus long-term culture of A549 cells for evaluating the effects of lipopolysaccharide on oxidative stress, surfactant proteins and cathelicidin LL-37. Int. J. Mol. Sci. 21, 1148. https://doi.org/10.3390/ijms21031148.

Olmeda, B., Martínez-Calle, M., Pérez-Gil, J., 2017. Pulmonary surfactant metabolism in the alveolar airspace: biogenesis, extracellular conversions, recycling. Ann. Anat. 209, 78–92. https://doi.org/10.1016/j.aanat.2016.09.008.

Paur, H.-R., Cassee, F.R., Teeguarden, J., Fissan, H., Diabate, S., Aufderheide, M., Kreyling, W.G., Hänninen, O., Kasper, G., Riediker, M., Rothen-Rutishauser, B., Schmid, O., 2011. In-vitro cell exposure studies for the assessment of nanoparticle toxicity in the lung—a dialog between aerosol science and biology. J. Aerosol Sci. 42, 668–692. https://doi.org/10.1016/j.jaerosci.2011.06.005.

Petersen, E.J., Sharma, M., Clippinger, A.J., Gordon, J., Katz, A., Laux, P., Leibrock, L.B., Luch, A., Matheson, J., Stucki, A.O., Tentschert, J., Bierkandt, F.S., 2021. Use of cause-and-effect analysis to optimize the reliability of in vitro inhalation toxicity measurements using an air–liquid interface. Chem. Res. Toxicol. 34, 1370–1385. https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.1c00080.

Raghavendran, K., Willson, D., Notter, R.H., 2011. Surfactant therapy for acute lung injury and acute respiratory distress syndrome. Crit. Care Clin. 27, 525–559. https://doi.org/10.1016/j.ccc.2011.04.005.

Rajagopalan, S., Al-Kindi, S.G., Brook, R.D., 2018. Air pollution and cardiovascular disease: JACC state-of-the-art review. J. Am. Coll. Cardiol. 72, 2054–2070. https://doi.org/10.1016/j.jacc.2018.07.099.

Ren, H., Birch, N.P., Suresh, V., 2016. An optimised human cell culture model for alveolar epithelial transport. PloS One 11, e0165225. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165225.

Russell, W.M.S., Burch, R.L., 1960. The Principles of Humane Experimental Technique.

Sahu, D., Kannan, G.M., Vijayaraghavan, R., Anand, T., Khanum, F., 2013. Nanosized zinc oxide induces toxicity in human lung cells. ISRN Toxicol. 2013, 316075. https://doi.org/10.1155/2013/316075.

Salana, S., Verma, V., 2024. Review of in vitro studies evaluating respiratory toxicity of aerosols: impact of cell types, chemical composition, and atmospheric processing. Environ. Sci. 26, 1922–1954. https://doi.org/10.1039/D4EM00475B.

Sánchez-Gasca, J.E., Debray-García, Y., Corona-Galvan I, A., Uribe-Ramirez, T.M., Sierra-Vargas, M.P., Aztatzi-Aguilar, O.G., 2025. Fluoride induces toxic effects on the A549 pulmonary cell line at non-cytotoxic concentrations. Biol. Trace Elem. Res. https://doi.org/10.1007/s12011-024-04499-5.

Schmittgen, T.D., Livak, K.J., 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative C (T) method. Nat. Protoc. 3, 1101–1108. https://doi.org/10.1038/nprot.2008.73.

Selo, M.A., Sake, J.A., Kim, K.-J., Ehrhardt, C., 2021. In vitro and ex vivo models in inhalation biopharmaceutical research - advances, challenges and future perspectives. Adv. Drug Deliv. Rev. 177, 113862. https://doi.org/10.1016/j.addr.2021.113862.

Siebert, T.A., Rugonyi, S., 2008. Influence of liquid-layer thickness on pulmonary surfactant spreading and collapse. Biophys. J. 95, 4549–4559. https://doi.org/10.1529/biophysj.107.127654.

Simon, S., Shanmugalingam, T., Neu, T., Schneider-Daum, N., Cantrill, C., Lehr, C.-M., 2025. Mapping the ABC transporter landscape in the human lung: a comprehensive characterisation of P-gp, MRP1 and BCRP expression and functional activity in human lung epithelial cells. Eur. J. Pharm. Sci. 215, 107333. https://doi.org/10.1016/j.ejps.2025.107333.

Srinivasan, B., Kolli, A.R., Esch, M.B., Abaci, H.E., Shuler, M.L., Hickman, 2015. TEER measurement techniques for in vitro barrier model systems. J Lab Autom 20, 107–126. https://doi.org/10.1177/2211068214561025.

Stoehr, L.C., Endes, C., Radauer-Preiml, I., Boyles, M.S.P., Casals, E., Balog, S., Pesch, M., Petri-Fink, A., Rothen-Rutishauser, B., Himly, M., Clift, M.J.D., Duschl, A., 2015. Assessment of a panel of interleukin-8 reporter lung epithelial cell lines to monitor the pro-inflammatory response following zinc oxide nanoparticle exposure under different cell culture conditions. Part. Fibre Toxicol. 12, 29. https://doi.org/10.1186/s12989-015-0104-6.

Stone, K.C., Mercer, R.R., Gehr, P., Stockstill, B., Crapo, J.D., 1992. Allometric relationships of cell numbers and size in the mammalian lung. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 6, 235–243. https://doi.org/10.1165/ajrcmb/6.2.235.

Stuetz, H., Reihs, E.I., Neuhaus, W., Pflüger, M., Hundsberger, H., Ertl, P., Resch, C., Bauer, G., Povoden, G., Rothbauer, M., 2023. The cultivation modality and barrier maturity modulate the toxicity of industrial zinc oxide and titanium dioxide nanoparticles on nasal, buccal, bronchial, and alveolar mucosa cell-derived barrier models. Int. J. Mol. Sci. 24, 5634. https://doi.org/10.3390/ijms24065634.

Tanabe, I., Ishimori, K., Ishikawa, S., 2024. Development of an in vitro human alveolar epithelial air-liquid interface model using a small molecule inhibitor cocktail. BMC Mol Cell Biol 25, 9. https://doi.org/10.1186/s12860-024-00507-7.

Tannenbaum, J., Bennett, B.T., 2015. Russell and Burch's 3Rs then and now: the need for clarity in definition and purpose. J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci. 54, 120–132.

Thornton, D.J., Rousseau, K., McGuckin, M.A., 2008. Structure and function of the polymeric mucins in airways mucus. Annu. Rev. Physiol. 70, 459–486. https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.70.113006.100702.

Tilly, T.B., Nelson, M.T., Chakravarthy, K.B., Shira, E.A., Debrose, M.C., Grabinski, C.M., Salisbury, R.L., Mattie, D.R., Hussain, S.M., 2020. In vitro aerosol exposure to nanomaterials: from laboratory to environmental field toxicity testing. Chem. Res. Toxicol. 33, 1179–1194. https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.9b00237.

Tsoutsoulopoulos, A., Möhle, N., Aufderheide, M., Schmidt, A., Thiermann, H., Steinritz, D., 2016. Optimization of the CULTEX® radial flow system for *in vitro* investigation of lung damaging agents. Toxicol. Lett. 244, 28–34. https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2015.09.003.

Tsoutsoulopoulos, A., Gohlsch, K., Möhle, N., Breit, A., Hoffmann, S., Krischenowski, O., Mückter, H., Gudermann, T., Thiermann, H., Aufderheide, M., Steinritz, D., 2019. Validation of the CULTEX® Radial Flow System for the assessment of the acute inhalation toxicity of airborne particles. Toxicol. In Vitro 58, 245–255. https://doi.org/10.1016/j.tiv.2019.03.020.

Turner, M.C., Andersen, Z.J., Baccarelli, A., Diver, W.R., Gapstur, S.M., Pope, C.A., Prada, D., Samet, J., Thurston, G., Cohen, A., 2020. Outdoor air pollution and cancer: an overview of the current evidence and public health recommendations. CA Cancer J. Clin. https://doi.org/10.3322/caac.21632.

Upadhyay, S., Palmberg, L., 2018. Air-liquid interface: relevant in vitro models for investigating air pollutant-induced pulmonary toxicity. Toxicol. Sci. 164, 21–30. https://doi.org/10.1093/toxsci/kfy053.

van den Velde, S., Quirynen, M., van Hee, P., van Steenberghe, D., 2007. Differences between alveolar air and mouth air. Anal. Chem. 79, 3425–3429. https://doi.org/10.1021/ac062009a.

Veldhuizen, R.A., McCaig, L.A., Akino, T., Lewis, J.F., 1995. Pulmonary surfactant subfractions in patients with the acute respiratory distress syndrome. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 152, 1867–1871. https://doi.org/10.1164/ajrccm.152.6.8520748.

Vogel, C.F.A., Van Winkle, L.S., Esser, C., Haarmann-Stemmann, T., 2020. The aryl hydrocarbon receptor as a target of environmental stressors – implications for pollution mediated stress and inflammatory responses. Redox Biol. 34, 101530. https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101530.

WHO Global Air Quality Guidelines: Particulate Matter (PM2.5 and PM10), Ozone, Nitrogen Dioxide, Sulfur Dioxide and Carbon Monoxide. https://www.who.int/publications/i/item/9789240034228, 2025 (last access: 8 August 2025).

Williams, M.C., 2003. Alveolar type I cells: molecular phenotype and development. Annu. Rev. Physiol. 65, 669–695. https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.65.092101.142446.

World Health Organization, 2024. Ambient (Outdoor) Air Pollution.

Wu, J., Wang, Y., Liu, G., Jia, Y., Yang, J., Shi, J., Dong, J., Wei, J., Liu, X., 2018. Characterization of air-liquid interface culture of A549 alveolar epithelial cells. Braz. J. Med. Biol. Res. 51, e6950. https://doi.org/10.1590/1414-431x20176950.

Xie, Y., Williams, N.G., Tolic, A., Chrisler, W.B., Teeguarden, J.G., Maddux, B.L.S., Pounds, J.G., Laskin, A., Orr, G., 2012. Aerosolized ZnO nanoparticles induce toxicity in alveolar type II epithelial cells at the air-liquid interface. Toxicol. Sci. 125, 450–461. https://doi.org/10.1093/toxsci/kfr251.
Yang, X., Yang, P., Zhang, J., Yang, Y., Xiong, M., Shi, F., Li, N., Jin, Y., 2022. Silica nanoparticle exposure inhibits surfactant protein A and B in A549 cells through ROS-mediated JNK/c-Jun signaling pathway. Environ. Toxicol. 37, 2291–2301. https://doi.org/10.1002/tox.23596.
Zavala, J., Greenan, R., Krantz, Q.T., DeMarini, D.M., Higuchi, M., Gilmour, M.I., White, P.A., 2017. Regulating temperature and relative humidity in air–liquid interface in vitro systems eliminates cytotoxicity resulting from control air exposures. Toxicol. Res. 6, 448–459. https://doi.org/10.1039/c7tx00109f.
Zigler, J.S., Lepe-Zuniga, J.L., Vistica, B., Gery, I., 1985. Analysis of the cytotoxic effects of light-exposed hepes-containing culture medium. In Vitro Cell. Dev. Biol. 21, 282–287. https://doi.org/10.1007/BF02620943.
Zimmermann, E.J., Das, A., Huber, A., Gawlitta, N., Kuhn, E., Schlager, C., Gutmann, B., Krebs, T., Schnelle-Kreis, J., Delaval, M.N., Zimmermann, R., 2025. Toxicological effects of long-term continuous exposure to ambient air on human bronchial epithelial Calu-3 cells exposed at the air-liquid interface. Environ. Res. 269, 120759. https://doi.org/10.1016/j.envres.2025.120759.

Cette première étude a démontré que le modèle de coculture A549/Ci-hAELVi développé est physiologiquement pertinent et robuste pour les expositions prolongées en ALI, offrant un excellent compromis entre pertinence biologique et accessibilité expérimentale. Cependant, au-delà de la validation de la stabilité structurelle et fonctionnelle du modèle, les différences transcriptionnelles observées entre les cellules maintenues à l'incubateur et celles exposées au flux d'air propre ont mis en évidence une limitation sous-jacente importante, commune à la plupart des systèmes en ALI dynamiques. Même en l'absence d'exposition à tout toxique, le flux d'air, par lui-même, a semblé induire des réponses biologiques subtiles mais détectables, compatibles avec un stress mécanique. Ces observations ont soulevé une question cruciale qui dépasse le cadre des performances du modèle de coculture lui-même : dans quelle mesure le flux d'air pouvait-il être considéré comme une condition biologiquement neutre dans les études basées sur des expositions en ALI ? Bien que le flux d'air soit absolument nécessaire pour reproduire des conditions d'inhalation réalistes, son impact biologique intrinsèque reste encore mal caractérisé. Il est très rarement étudié comme facteur expérimental indépendant. Par conséquent, distinguer les réponses induites par les composés exposés de l'activation basale induite par le flux d'air représentait un défi majeur pour l'interprétation précise des données de toxicologie de l'ALI.

Cette considération a naturellement conduit à la seconde partie de ce travail, qui visait spécifiquement à caractériser l'impact biologique du flux d'air seul et à évaluer sa contribution aux réponses des cellules épithéliales basales dans les systèmes d'exposition en ALI dynamiques.

4.2. Impact du flux d'air seul sur les réponses biologiques des cellules

Avant d'évaluer les effets toxicologiques des AOS, l'impact du flux d'air seul a été étudié afin d'améliorer l'interprétation des réponses cellulaires observées lors des expositions en ALI. Dans ce contexte, cette section s'appuie d'abord sur une synthèse non exhaustive des études d'exposition continue en ALI, visant à identifier les paramètres expérimentaux critiques susceptibles d'influencer les réponses cellulaires, puis elle présente ensuite une analyse transcriptomique destinée à caractériser les voies de signalisation dérégulées en réponse à une exposition en ALI à un flux d'air propre.

4.2.1. Flux d'air dynamique en ALI : une variable expérimentale encore sous-estimée

Les modèles cellulaires d'épithélium pulmonaire, maintenus et exposés en ALI, sont devenus très importants en toxicologie *in vitro.* Ils offrent en effet une représentation plus physiologiquement pertinente de l'épithélium respiratoire humain comparativement aux systèmes cellulaires conventionnels, cultivés et exposés en phase immergée (Lacroix et al., 2018). En ALI, les modèles cellulaires présentent une adaptation plus spécifique, caractérisée par une polarisation épithéliale et la formation d'une barrière fonctionnelle, et développent des réponses biologiques spécifiques aux contaminants aéroportés en présence d'un flux d'air contrôlé (Cooper et al., 2016; Lacroix et al., 2018; Abo et al., 2022; Gutleb et al., 2026). Les systèmes d'exposition en ALI permettent ainsi d'exposer les cellules à des mélanges atmosphériques complexes, dans des conditions statiques ou dynamiques. Les systèmes dynamiques d'exposition ALI (flux continu) sont aujourd'hui largement utilisés pour les études mécanistiques et la toxicologie respiratoire à visée réglementaire (Lacroix et al., 2018; Navarrete-Aliaga et al., 2025; Gutleb et al., 2026).

Malgré ces avancées, la majorité des études *in vitro* utilisant des systèmes dynamiques d'exposition ALI reposent implicitement sur l'hypothèse selon laquelle le flux d'air lui-même serait biologiquement inerte en l'absence de tout polluant. La validation des systèmes s'appuie généralement sur le maintien de la viabilité cellulaire et l'absence de cytotoxicité manifeste lors d'expositions contrôlées à de l'air propre (ci-après désigné T_AIR pour

témoin air). Toutefois, lorsque les conséquences de l'exposition à l'air propre est évaluée au-delà de ces seuls critères de viabilité, une surexpression reproductible de gènes associés au stress oxydant, notamment l'*hème oxygénase-1* (*HMOX1*), ainsi qu'une augmentation significative de cytokines (pro)-inflammatoires ont été rapportées avec différents systèmes dynamiques en ALI comprenant des paramètres d'exposition distincts, suggérant que le flux d'air propre seul pourrait induire un état basal d'activation mesurable .

Une hétérogénéité méthodologique importante persiste néanmoins entre les protocoles d'exposition en ALI actuellement disponibles dans la littérature, notamment en ce qui concerne le débit d'air et son conditionnement (température, humidité, supplémentation en CO_2), les conditions de culture des modèles cellulaires (habituation en ALI, confluence), ainsi que les technologies favorisant le dépôt des particules (Lacroix et al., 2018; Gutleb et al., 2026). La description des paramètres expérimentaux critiques incluant la configuration des systèmes, les caractéristiques du flux d'air, ainsi que les conditions contrôlées à la fois dans l'incubateur et dans la génération du flux d'air, demeure inégal, limitant ainsi la fiabilité des comparaisons inter-études. Par conséquent, l'identification de la contribution biologique spécifique du flux d'air propre reste difficile. Bien que des travaux récents aient commencé à documenter les effets basaux associés au flux d'air, l'intégration systématique de ces réponses dans la conception des protocoles d'exposition et l'interprétation des données expérimentales demeurent insuffisantes (Buckley et al., 2024; Bredeck et al., 2025; Alunni et al., 2026). Une évaluation structurée des pratiques de contrôle du flux d'air est donc nécessaire pour favoriser l'harmonisation et la comparaison robuste des résultats entre études.

Il est donc apparu nécessaire de réévaluer de manière critique l'hypothèse dominante selon laquelle un flux d'air propre constituerait une condition biologiquement inerte dans les systèmes dynamiques d'exposition en ALI. Une telle réévaluation devait s'appuyer à la fois sur une analyse structurée des pratiques de contrôle du flux d'air rapportées dans les études utilisant des systèmes d'exposition en ALI en flux continu, ainsi que sur des approches expérimentales permettant de caractériser de manière plus sensible les réponses biologiques induites par l'exposition à l'air propre. En particulier, l'intégration d'analyses transcriptomiques comparatives appliquées à des modèles de coculture apparaît comme une approche pertinente pour identifier des réponses biologiques spécifiquement

induites par le flux d'air et pour caractériser sa contribution à l'activation basale de l'épithélium alvéolaire en amont de l'analyse des possibles effets délétères des AOS.

Dans cette perspective, l'évaluation de la reproductibilité des réponses biologiques à travers plusieurs systèmes d'exposition dynamiques en ALI, indépendants, a constitué une étape essentielle pour identifier des signatures biologiques robustes associées à l'exposition à l'air propre. L'intégration systématique de contrôles air appropriés, associée à l'identification de marqueurs précoces de réponse, pourrait ainsi renforcer la robustesse des stratégies expérimentales d'exposition en ALI et améliorer l'interprétation des résultats ainsi obtenus.

4.2.2. Manque d'harmonisation et rôle crucial des paramètres d'exposition dans les études en ALI

Les contraintes techniques inhérentes aux systèmes d'exposition peuvent influencer significativement les réponses biologiques des modèles cellulaires. Ainsi, la mise en œuvre et l'exploitation des systèmes dynamiques d'exposition en ALI nécessitent une optimisation rigoureuse (Buckley et al., 2024; Bredeck et al., 2025; Alunni et al., 2026). Toutefois, un cadre harmonisé permettant de définir et de surveiller les paramètres expérimentaux critiques reste difficile à établir, et aucun consensus réel n'existe actuellement quant à leur définition et à leur contrôle.

Dans ce contexte, une revue systématique non exhaustive des études d'exposition ALI en flux continu, publiées entre 2019 et 2026, a été réalisée afin d'étendre le cadre précédemment établi par Lacroix et al. (2018). Cet article a été retenu comme point de départ de la recherche bibliographique, car il proposait des recommandations techniques clés pour la mise en œuvre et la validation des méthodologies d'exposition ALI. Les travaux publiés postérieurement à cette publication clé étaient ainsi supposés refléter un niveau accru d'harmonisation des protocoles d'exposition en ALI. Les études éligibles correspondaient à des articles évalués par des pairs, publiés en langue anglaise, décrivant l'utilisation de systèmes dynamiques d'exposition en ALI appliqués à des modèles pulmonaires humains *in vitro* pour l'évaluation de divers polluants atmosphériques gazeux ou particulaires, bioaérosols, air ambiant et/ou air propre. Pour chaque étude, les

paramètres expérimentaux pertinents ont été extraits, incluant le type de système d'exposition en ALI, la durée d'exposition, le débit et le conditionnement du flux d'air, le modèle *in vitro* utilisé, le niveau de confluence cellulaire et l'habituation à l'ALI, les paramètres biologiques mesurés ainsi que les types d'essais réalisés et la mise en place des contrôles négatifs, à savoir les contrôles air et/ou les contrôles incubateur. Afin de permettre une analyse comparative, une classification, adossée à un code par couleur a été appliquée afin de refléter la sensibilité relative et le niveau de profondeur des paramètres biologiques étudiés, allant des essais de viabilité, très classiques, aux approches omiques à haute résolution (Annexe 2).

Cette analyse bibliographique a mis en évidence une hétérogénéité importante des pratiques expérimentales. En pratique, les conditions d'exposition demeuraient largement spécifiques à chaque étude, déterminées par les expériences et les pratiques spécifiquement acquises et développées par les chercheurs, les données issues de la littérature ou les recommandations des fabricants, ce qui s'est traduit par une variabilité significative inter-études. Les paramètres critiques, notamment le débit d'air, la durée d'exposition, la température, l'humidité relative et les niveaux de CO_2, ont été rapportés de manière inégale, malgré leur rôle déterminant dans le maintien de l'homéostasie des cellules épithéliales et la prévention de phénomènes tels que la dessiccation cellulaire, les déséquilibres osmotiques et/ou des réponses biologiques non spécifiques (Tsoutsoulopoulos et al., 2016; Zavala et al., 2017; Buckley et al., 2024; Bredeck et al., 2025; Zimmermann et al., 2025).

Par ailleurs, certaines technologies favorisant le dépôt des particules sur les tapis cellulaires peuvent introduire une variabilité expérimentale supplémentaire en modifiant les propriétés physico-chimiques des aérosols et en favorisant des interactions non physiologiques. Ces effets incluaient notamment une augmentation de la température des aérosols au-delà de 37 °C à l'interface cellulaire pour les systèmes de thermophorèse, des phénomènes d'électrolyse pour les précipitateurs électrostatiques, ainsi qu'une modification des rapports de dépôt des particules chargées, autant de facteurs susceptibles d'influencer la toxicité observée des aérosols et contribuer à l'éloignement eu égard aux conditions physiologiques. Cette variabilité pourrait contribuer de manière significative à l'obtention de résultats incohérents, voire contradictoires entre les études d'exposition ALI,

compliquant ainsi l'interprétation des réponses biologiques spécifiques des polluants. De plus, un contrôle insuffisant des paramètres liés au flux d'air pourrait perturber les réponses cellulaires basales, conduisant à l'attribution erronée de certains effets biologiques aux polluants eux-mêmes plutôt qu'aux conditions d'exposition.

Compte tenu de la multiplicité et de l'interdépendance de ces paramètres, l'inclusion de contrôles négatifs appropriés est apparue essentielle. Parmi eux, les témoins laissés dans l'incubateur (T_INC) permettaient d'évaluer les conditions cellulaires basales, tandis que les témoins exposés en ALI à l'air propre (T_AIR) permettaient d'isoler la contribution spécifique du flux d'air et des conditions d'exposition. Cependant, ces deux types de contrôles étaient mis en œuvre de manière inégale, insuffisamment décrits ou parfois mal définis, et étaient même très fréquemment absents des résultats rapportés (Annexe 2), limitant ainsi l'attribution fiable des effets biologiques observés.

4.2.3. Le flux d'air induit une réponse biologique cachée au-delà des paramètres classiques de viabilité

De récentes études ont montré que l'exposition à de l'air seul pouvait induire des effets biologiques significatifs, y compris à des débits modérés, pour des durées d'exposition courtes, et en utilisant des lignées cellulaires relativement résistantes, telles que les cellules A549 (Foster et al., 1998; Cooper et al., 2016; Wu et al., 2018 p. 218; Selo et al., 2021; Buckley et al., 2024; Bredeck et al., 2025). Malgré les effets remarquables, observés dans la majorité des études intégrant à la fois des T_INC et des T_AIR, ces réponses cellulaires sont largement restées sous-estimées et insuffisamment discutées.

À travers différents systèmes dynamiques d'exposition ALI et modèles *in vitro*, l'exposition au flux d'air a récemment été décrite comme induisant de manière reproductible une signature biologique conservée caractérisée par un stress oxydant, une réponse inflammatoire et, plus récemment, l'activation de la voie de signalisation AhR (Buckley et al., 2024; Bredeck et al., 2025; Alunni et al., 2026). Ensemble, ces observations ont suggéré que le flux d'air établi un état basal d'activation cellulaire qui n'était pas systématiquement pris en compte.

4.2.3.1. Paramètres conventionnels de toxicité : morphologie cellulaire, cytotoxicité, activité métabolique et inflammation

En accord avec ces données, les résultats expérimentaux qui ont été obtenus dans le cadre de ce travail de thèse ont montré que les paramètres toxicologiques conventionnels, classiquement évalués dans le cadre des expositions ALI, ne permettaient pas d'évaluer avec une sensibilité suffisante l'impact réel du flux d'air sur les modèles cellulaires (Figure 4. 9.).

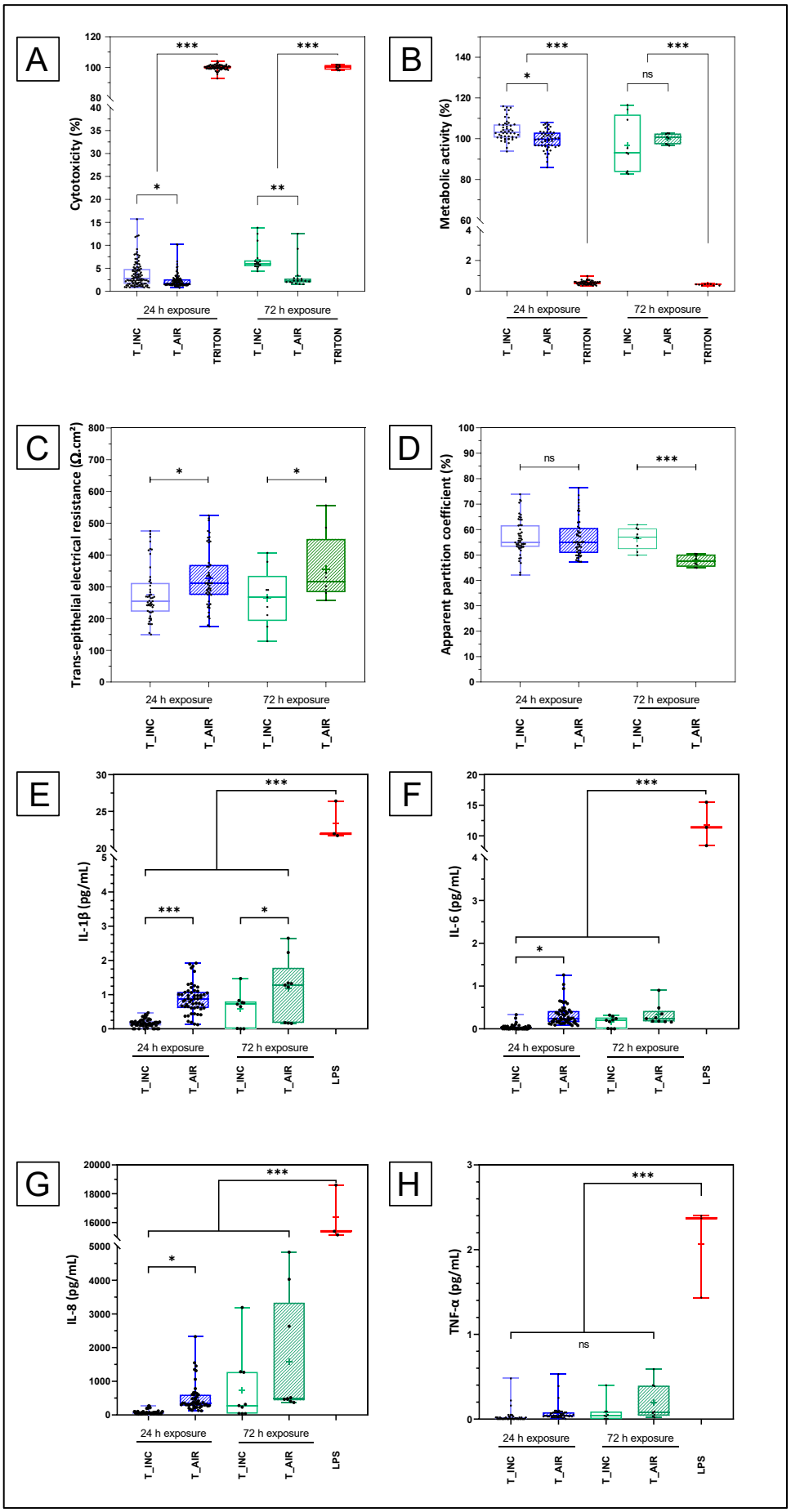

A
Cytotoxicity (%)
24 h exposure
72 h exposure
T_INC
T_AIR
TRITON
B
Metabolic activity (%)
ns
C
Trans-epithelial electrical resistance (Ω.cm²)
D
Apparent partition coefficient (%)
E
IL-1β (pg/mL)
LPS
F
IL-6 (pg/mL)
G
IL-8 (pg/mL)
H
TNF-α (pg/mL)

Figure 4. 9. : Cytotoxicité, activité métabolique, intégrité de la barrière épithéliale et réponse inflammatoire de la coculture après 24 ou 72 h d'exposition à de l'air propre avec le système Cultex®. (A) Évaluation des altérations de la membrane cellulaire par dosage de la lactate déshydrogénase (LDH). Les données sont exprimées en pourcentage du contrôle positif TRITON). (B) Évaluation de l'activité métabolique cellulaire par le test PrestoBlue™. Les données sont exprimées en pourcentage du contrôle négatif INCUB de chaque condition. (C) Évaluation de l'intégrité de la barrière épithéliale par mesure de la TEER. (D) Évaluation de la perméabilité de la barrière épithéliale. Dosage des niveaux de sécrétion des cytokines (pro)-inflammatoires (E) interleukine 1β (IL-1β), (F) interleukine 6 (IL-6), (G) interleukine 8 (IL-8), (H) tumor necrosis factor α (TNF-α). Les données pour les expositions de 24 h sont issues de dix-neuf expériences indépendantes (n = 57), tandis que celles pour les expositions de 72 h sont issues de trois expériences indépendantes (n = 9) (*$p < 0,01$; **$p < 0,001$; ***$p < 0,0001$).

Après 24 et 72 h d'exposition à l'air seul (air propre), des niveaux de LDH significativement plus élevés étaient observés pour les conditions T_INC. Cette observation a suggéré un niveau basal de stress cellulaire plus important en condition statique, possiblement lié à une accumulation locale de métabolites dans un environnement fortement confluent. À l'inverse, l'exposition au flux d'air semblait favoriser une maturation fonctionnelle du tapis cellulaire, contribuant à une meilleure stabilité membranaire. Ces résultats pourraient être associés à un effet de rinçage du tapis cellulaire au cours de l'habitation en ALI. En effet, le dernier rinçage du tapis cellulaire est réalisé trois jours avant le début de l'exposition en ALI, impliquant que les métabolites accumulés par les cellules n'étaient pas éliminés pendant quatre ou sept jours selon la durée d'exposition. Des expériences complémentaires sont toutefois nécessaires pour corroborer cette hypothèse. Néanmoins, ces résultats suggèrent l'importance potentielle du rinçage du tapis cellulaire en amont de l'exposition.

L'activité métabolique était légèrement plus faible pour la condition T_AIR que pour la condition T_INC lors des expositions de 24 h, suggérant un impact du flux d'air seul sur le métabolisme cellulaire. Ce signal pourrait être interprété soit comme un effet délétère modéré, soit comme une réponse d'adaptation au flux d'air lui-même. En règle générale, aucun impact du flux d'air n'a été clairement observé lors de l'évaluation de la viabilité cellulaire. Toutefois, la présente étude repose sur un nombre élevé d'échantillons, conférant une meilleure puissance statistique et facilitant la détection de différences subtiles entre les conditions expérimentales.

Une augmentation significative des valeurs de TEER a été observée pour les conditions T_AIR par rapport aux cellules T_INC. Cette dernière a confirmé l'adaptation de la coculture aux conditions d'exposition en ALI et a suggéré un renforcement de l'organisation des jonctions intercellulaires sous l'effet d'une stimulation mécanique modérée. L'absence de variation concomitante de la perméabilité après 24 h d'exposition a indiqué que cette adaptation demeurait principalement structurale, sans modification majeure de la fonction barrière globale. En revanche, après 72 h d'exposition, les résultats ont mis en évidence un renforcement structural plus marqué de la fonction barrière, associé à une diminution de la perméabilité, indiquant une adaptation progressive des cellules au flux d'air en fonction de la durée d'exposition.

Comme observé dans les études précédentes, l'exposition au flux d'air seul a induit une augmentation significative (Buckley et al., 2024; Bredeck et al., 2025; Campbell et al., 2025; Zimmermann et al., 2025) et répétable (Alunni et al., 2026) des niveaux basaux d'IL-1β, IL-6 et IL-8 lors des expositions de 24 h, confirmant que la stimulation mécanique induite par le flux d'air seul constituait un signal inflammatoire modéré mais constant dans les systèmes d'exposition ALI. Les différences observées entre les conditions T_INC et T_AIR pour les expositions de 72 h n'apparaissaient pas statistiquement significatives. Toutefois, macroscopiquement, les altérations plus marquées des cellules exposées en ALI au flux d'air pendant 72 h (T_AIR à 72 h) vs. 24 h (T_AIR à 24 h) pourraient suggérer l'existence d'effets plus marqués, non observés en raison de la faible puissance statistique lié au plus faible nombre de répliquats considérés pour le temps d'exposition le plus long.

4.2.3.2. Expression différentielle des gènes (3'RNAseq) après 24 h d'exposition à l'air

L'analyse transcriptomique, par sa très grande sensibilité et son caractère pangénomique, a permis de révéler l'ampleur de cette réponse jusque-là relativement peu visible. Au total, 379 gènes différentiellement exprimés ont été identifiés (197 surexprimés, 182 sous-exprimés) entre les conditions T_AIR et T_INC (Figure 4. 10. A), mettant en évidence une signature transcriptionnelle spécifiquement induite par le flux d'air (Figure4. 10. C).

Parmi les gènes les plus différentiellement exprimés (Tableaux 4. 1. et 4. 2.), *CYP1A1* (*Cytochrome P450 family 1 subfamily A member 1*) présentait une surexpression marquée. Associées à une induction plus modérée mais significative de *CYP1B1* (*Cytochrome P450 family 1 subfamily B member 1*) et *TDO2* (*Tryptophan 2,3-dioxygenase*), ces variations étaient compatibles avec une activation des éléments de réponse aux xénobiotiques (XRE), indiquant l'activation de la voie de signalisation AhR, en accord avec les observations précédentes (Cervena et al., 2020; Alunni et al., 2026). Bien que classiquement activée par des ligands tels que les dioxines ou les HAP, la signalisation AhR peut également répondre à des stimuli mécaniques, incluant des contraintes de cisaillement (Han et al., 2008; Conway et al., 2009; Lano et al., 2020).

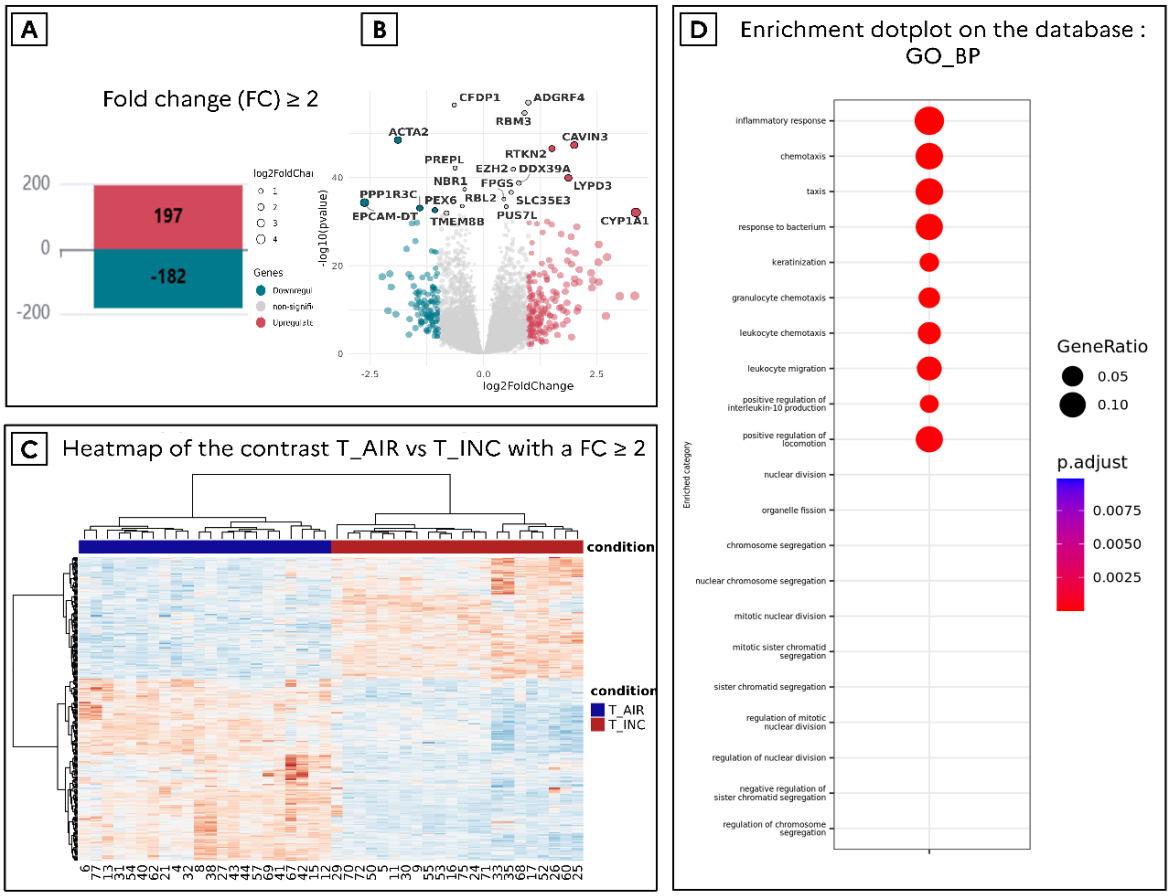


Figure 4. 10. : Analyse transcriptomique différentielle entre les cellules exposées à l'air propre (T_AIR) durant 24 h avec le système Cultex®, et les cellules maintenues à l'incubateur (T_INC). Toutes les analyses ont été réalisées en considérant un fold change (FC) ≥ 2. (A) Nombre de gènes sur- et sous-exprimés entre les conditions T_AIR et T_INC. (B) Diagramme de volcan (volcano plot) représentant les gènes différentiellement exprimés entre les deux conditions. (C) Carte de chaleur (heatmap) illustrant les profils d'expression des gènes différentiellement exprimés. (D) Analyse d'enrichissement fonctionnel des gènes différentiellement exprimés basée sur la base de données GO_BP.

Tableau 4. 1. : Listes des gènes 20 gènes les plus sur-exprimés après une exposition ALI de 24 h.

Genes ID	Log2(fold change)	*p*-adjusted	Genes	Symbol	Description	Refseq
9707	3,870	3,874E-14	ENSG00000232110	**LOC124902477**	uncharacterized LOC124902477	XR_007062230
4074	3,597	1,758E-11	ENSG00000163736	**PPBP**	pro-platelet basic protein	NM_002704
12166	3,528	1,334E-36	ENSG00000140465	**CYP1A1**	cytochrome P450 family 1 subfamily A member 1	NM_000499
14705	3,383	7,285E-11	ENSG00000124253	**PCK1**	phosphoenolpyruvate carboxykinase 1	NM_002591
869	3,357	4,783E-11	ENSG00000241794	**SPRR2A**	small proline rich protein 2A	NM_005988
7382	2,963	9,917E-09	ENSG00000147614	**ATP6V0D2**	ATPase H+ transporting V0 subunit d2	NM_152565
3668	2,819	1,263E-11	ENSG00000177494	**ZBED2**	zinc finger BED-type containing 2	NM_024508
14121	2,695	3,914E-08	ENSG00000271503	**CCL5**	C-C motif chemokine ligand 5	NM_001278736
13647	2,683	1,710E-09	ENSG00000131737	**KRT34**	keratin 34	NM_001386014
13678	2,664	3,845E-21	ENSG00000171401	**KRT13**	keratin 13	NM_002274
2430	2,564	1,415E-15	ENSG00000143882	**ATP6V1C2**	ATPase H+ transporting V1 subunit C2	NM_001039362
1481	2,545	9,073E-06	ENSG00000117152	**RGS4**	regulator of G protein signaling 4	NM_001102445
11906	2,510	2,287E-13	ENSG00000103888	**CEMIP**	cell migration inducing hyaluronidase 1	NM_001293298
14564	2,506	1,418E-19	ENSG00000100985	**MMP9**	matrix metallopeptidase 9	NM_004994
13662	2,505	2,159E-06	ENSG00000212724	**KRTAP2-3**	keratin associated protein 2-3	NM_001165252
10775	2,467	8,537E-24	ENSG00000185479	**KRT6B**	keratin 6B	NM_005555
1515	2,312	7,492E-27	ENSG00000183347	**GBP6**	guanylate binding protein family member 6	NM_001320257
2330	2,305	4,085E-08	ENSG00000144130	**NT5DC4**	5'-nucleotidase domain containing 4	NM_001350494
6279	2,271	4,411E-11	ENSG00000122641	**INHBA**	inhibin subunit beta A	NM_002192
13716	2,252	1,515E-13	ENSG00000128422	**KRT17**	keratin 17	NM_000422

Tableau 4. 2. : Listes des gènes 20 gènes les plus sous-exprimés après une exposition ALI de 24 h.

Genes ID	Log2(fold change)	*p*-adjusted	Genes	Symbol	Description	Refseq
2632	-1,512	2,024E-12	ENSG00000134323	MYCN	MYCN proto-oncogene, bHLH transcription factor	NM_001293228
11793	-1,525	2,002E-17	ENSG00000198732	SMOC1	SPARC related modular calcium binding 1	NM_001034852
3168	-1,550	5,701E-16	ENSG00000073282	TP63	tumor protein p63	NM_001114978
4289	-1,556	5,592E-23	ENSG00000174473	GALNTL6	polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase like 6	NM_001034845
2901	-1,567	3,467E-11	ENSG00000198829	SUCNR1	succinate receptor 1	NM_033050
4463	-1,570	7,873E-04	ENSG00000169302	STK32A	serine/threonine kinase 32A	NM_001112724
1322	-1,600	8,080E-08	ENSG00000226754	MAGOH-DT	MAGOH divergent transcript	NR_038953
9288	-1,613	5,625E-21	ENSG00000245498	MSANTD2-AS1	MSANTD2 antisense RNA 1	NR_103862
10930	-1,656	5,790E-09	ENSG00000251151	HOXC-AS3	HOXC cluster antisense RNA 3	NR_047506
908	-1,671	1,679E-06	ENSG00000142609	CFAP74	cilia and flagella associated protein 74	NM_001003808
5213	-1,778	1,730E-06	ENSG00000095970	TREM2	triggering receptor expressed on myeloid cells 2	NM_001271821
2277	-1,836	1,144E-13	ENSG00000152049	KCNE4	potassium voltage-gated channel subfamily E regulatory subunit 4	NM_080671
4333	-1,848	1,265E-09	ENSG00000184985	SORCS2	sortilin related VPS10 domain containing receptor 2	NM_020777
10028	-1,860	1,924E-44	ENSG00000107796	ACTA2	actin alpha 2, smooth muscle	NM_001141945
10596	-1,915	5,851E-11	ENSG00000180481	GLIPR1L2	GLIPR1 like 2	NM_001270396
1195	-1,937	4,317E-10	ENSG00000162490	DRAXIN	dorsal inhibitory axon guidance protein	NM_198545
2830	-2,095	3,953E-08	ENSG00000144619	CNTN4	contactin 4	NM_001206955
2702	-2,124	4,380E-14	ENSG00000115596	WNT6	Wnt family member 6	NM_006522
13959	-2,172	1,150E-14	ENSG00000161509	GRIN2C	glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2C	NM_000835
754	-2,189	4,671E-10	ENSG00000240386	LCE1F	late cornified envelope 1F	NM_178354

En parallèle, la surexpression de *CAVIN3* (*Caveolae associated protein 3*), régulateur clé de la dynamique des cavéoles, soutenait l'implication de processus de mécanotransduction membranaire, les cavéoles étant connues pour amortir et répondre aux contraintes mécaniques (Boyd et al., 2003; Mohan et al., 2015; McMahon et al., 2021). Conjointement, la sous-expression des sous-unités de canaux potassiques voltage-dépendants (*KCNE3*, *KCNE4* et *KCNE5*) pourrait refléter une altération de l'excitabilité membranaire et de l'homéostasie ionique, renforçant l'hypothèse d'un remodelage membranaire induit par des stimuli mécaniques.

Globalement, ces résultats indiquent l'activation coordonnée de voies associées à la mécanotransduction, intégrant l'organisation membranaire et cytosquelettique avec l'homéostasie cellulaire, l'adhésion et la prolifération (Figure 4. 10.). Cette signature transcriptionnelle supporte l'hypothèse selon laquelle le flux d'air agirait principalement comme un stimulus mécanique, induisant des réponses adaptatives susceptibles d'influencer le métabolisme et l'intégrité de la barrière épithéliale.

D'après l'analyse bibliographique (Annexe 2), l'exposition au flux d'air a été associée à une augmentation de l'expression de plusieurs médiateurs (pro)-inflammatoires, notamment *IL-8*, *IL-6*, *IL-13*, *CCL2* (*C-C motif chemokine ligand 2*), *CXCL1* (*C-X-C motif chemokine ligand 1*) et *SPP1* (*Secreted phosphoprotein 1*), ainsi qu'à l'activation de voies de défense antioxydante impliquant *PRDX2* (*Peroxiredoxin 2*), *LCN2* (*Lipocalin 2*), *CAT* (*Catalase*) et *HMOX1* (Alunni et al., 2026; Augustin et al., 2020; Bessa et al., 2021; Bredeck et al., 2025; Buckley et al., 2024; Campbell et al., 2025; Guo et al., 2026; Hufnagel et al., 2021; Verstraelen et al., 2021; Zimmermann et al., 2025; Zimmermann-Klemd et al., 2025). Les résultats de l'analyse transcriptomique obtenue ici n'ont révélé aucune induction significative des enzymes antioxydantes. En revanche, plusieurs marqueurs inflammatoires, dont *CCL2*, *IL-13* et *IL-6*, étaient significativement surexprimés. En particulier, la signalisation associée à *IL-6* apparaissait fortement dérégulée, avec une augmentation de l'expression de gènes impliqués dans cette voie, incluant son récepteur.

L'analyse d'enrichissement des voies biologiquement dérégulées a confirmé l'activation significative de voies de signalisation spécifiquement associées à la signalisation

inflammatoire, à la régulation des cytokines, à la chimiotaxie leucocytaire et à la migration cellulaire, en accord avec les données de sécrétion des cytokines préalablement observées. Parallèlement, l'identification de signatures transcriptomiques associées au remodelage et à la différenciation épithéliale ont suggéré l'initiation de processus liés à la réparation tissulaire (Figure 4. 10. D), soutenant l'hypothèse d'une adaptation coordonnée de l'épithélium au flux d'air.

4.2.3.3. Expression différentielle des gènes (3'RNAseq) après 72 h d'exposition à l'air

En comparaison avec les expositions ALI pendant 24 h, un nombre plus élevé de gènes différentiellement exprimés a été observé après 72 h d'exposition en ALI, avec un total de 1227 gènes (vs 379 gènes après 24 h) différentiellement exprimés, dont 818 surexprimés (vs. 197 gènes après 24 h) et 409 sous-exprimés (vs. 182 gènes après 24 h) entre les conditions T_AIR et T_INC (Figure 4. 11. A). Au total, 410 gènes différentiellement exprimés étaient communs aux deux temps d'exposition en ALI, indiquant l'existence de réponses conservées mais également l'apparition de modifications supplémentaires ou de mécanismes adaptatifs lors d'expositions prolongées. Les différences entre les profils d'expression génique des conditions T_AIR et T_INC après 72 h d'exposition ALI restaient aussi marquées que celles préalablement observées après 24 h d'exposition ALI, mettant en évidence une signature transcriptionnelle robuste, toujours spécifiquement induite par le flux d'air (Figure 4. 11. C).

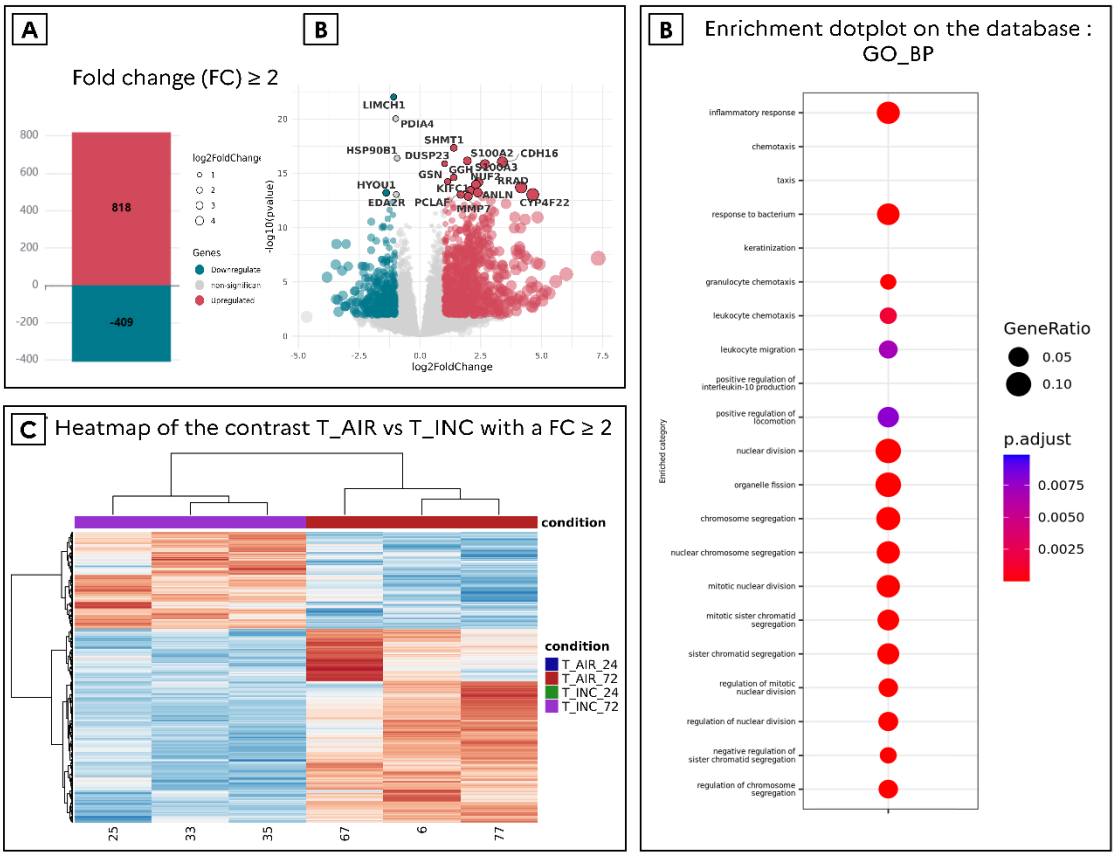


Figure 4. 11. : Analyse transcriptomique différentielle entre les cellules exposées à l'air propre (T_AIR) durant 72 h avec le système Cultex®, et les cellules maintenues à l'incubateur (T_INC). Toutes les analyses ont été réalisées en considérant un fold change (FC) ≥ 2. (A) Nombre de gènes sur- et sous-exprimés entre les conditions T_AIR et T_INC. (B) Volcano plot représentant les gènes différentiellement exprimés entre les deux conditions. (C) Heatmap illustrant les profils d'expression des gènes différentiellement exprimés. (D) Analyse d'enrichissement fonctionnel des gènes différentiellement exprimés basée sur la base de données GO_BP.

L'analyse comparative des profils transcriptomiques obtenus après 72 h d'exposition ALI au flux d'air a permis de mettre en évidence une modulation temporelle marquée des réponses cellulaires, suggérant une transition progressive entre une phase initiale d'activation puis une phase d'adaptation. Comme observé après 24 h d'exposition, les gènes *CYP1A1*, *CYP1B1* et *TDO2* demeuraient fortement surexprimés, avec des niveaux d'expression encore plus élevés après 72 h d'exposition au flux d'air. Parallèlement, la sous-

expression de *HSP90*, gène codant pour des protéines impliquées dans la régulation de la voie de signalisation de l'AhR, suggérait un renforcement et une persistance de son activation au cours du temps.

Une dérégulation plus marquée des mécanismes d'excitabilité membranaire, caractérisée par une sous-expression accentuée des gènes codant pour des sous-unités des canaux potassiques voltage-dépendants (*KCNE3*, *KCNE4* et *KCNE5*) a également été observée après 72 h d'exposition. Cette réponse était accompagnée d'une altération de l'expression de gènes impliqués dans la signalisation dépendante du calcium (Ca^{2+}), probablement associée à la forte surexpression de *BEST2* (canaux ioniques Ca^{2+} dépendant), suggérant une perturbation coordonnée de l'homéostasie ionique et des mécanismes de mécanotransduction membranaire.

En parallèle, plusieurs gènes associés au remodelage cellulaire et tissulaire sont apparus significativement modulés après 72 h d'exposition. Une surexpression marquée de *MMP7* (*Matrix metallopeptidase*), enzyme clé impliquée dans le remodelage matriciel, a été observée, conjointement à la surexpression de gènes associés à l'organisation du cytosquelette d'actine, notamment *KIFC1* (*Kinesin family member C1*), *ANLN (Anillin, actin binding protein)* et *GSN* (*Gelsolin*), ainsi qu'à l'adhésion cellulaire. Illustrée par la surexpression de plusieurs cadhérines (*CDH7, CDH13, CDH16* et *CDH19*), l'augmentation de la signalétique liée aux jonctions cellules-cellules est en accord avec le renforcement de la barrière épithéliale précédemment évoqué (Figure 4. 11. C et D). Ces modifications suggèrent une réorganisation progressive de l'architecture cellulaire en réponse à une stimulation mécanique prolongée.

Contrairement aux observations réalisées après 24 h d'exposition, les médiateurs (pro)-inflammatoires n'étaient plus significativement surexprimés après 72 h, et aucune activation des voies de signalisation antioxydantes n'était détectée. De plus, la dérégulation marquée de la signalisation associée à l'IL-6, observée à 24 h, n'était plus retrouvée à 72 h, suggérant l'établissement d'un état d'adaptation cellulaire face au stress mécanique induit par le flux d'air.

Cette adaptation semblait également soutenue par la surexpression de protéines du surfactant, notamment SP-B et SP-D, en cohérence avec nos résultats précédents (section

4.1.3.). Ces protéines, connues pour leur rôle dans les mécanismes de défense épithéliale, pourraient contribuer à atténuer les réponses inflammatoires et les effets liés au stress oxydant au cours d'une exposition prolongée.

Enfin, le nombre élevé de gènes différentiellement exprimés observé à 72 h pourrait refléter une phase initiale d'impact cellulaire marquée durant les premières 24 h, suivie de l'activation progressive de mécanismes de défense et de réparation, incluant notamment des voies associées à la réparation de l'ADN, telles que celles impliquant *PCLAF*. Les analyses d'enrichissement de voies biologiques confirment cette dynamique temporelle : alors que les signatures transcriptomiques associées à l'exposition de 24 h en ALI au flux d'air étaient majoritairement liées à des processus inflammatoires, celles observées après 72 h d'exposition en ALI au flux d'air mettaient davantage en évidence l'activation de voies associées au remodelage cellulaire et à la division cellulaire, suggérant l'engagement de mécanismes adaptatifs et réparateurs en réponse à la stimulation mécanique prolongée.

Dans l'ensemble, ces résultats ont démontré que le flux d'air ne constituait pas une condition neutre, mais un stimulus mécanique actif modulant les réponses cellulaires à plusieurs niveaux. Les analyses transcriptomiques ont non seulement révélé l'existence d'un état basal d'activation précoce associé au stress de cisaillement (shear stress), mais également l'installation progressive d'une reprogrammation transcriptionnelle adaptative lors d'expositions prolongées.

4.2.3.4. L'impact du flux d'air en fonction du temps d'exposition

Alors que les premières 24 h d'exposition en ALI au flux d'air ont été caractérisées par l'activation de voies inflammatoires et de signalisation associées au stress mécanique, à 72 h d'exposition en ALI au flux d'air, une induction de gènes en relation avec des mécanismes d'adaptation impliquant le remodelage cytosquelettique et membranaire, la régulation de l'homéostasie ionique, ainsi que l'activation de voies associées à la réparation cellulaire et à la division, sont observées.

En révélant cette dynamique temporelle associée au flux d'air, ces résultats ont mis en évidence un facteur de confusion critique mais largement sous-estimé en toxicologie basée sur des expositions à l'aide de systèmes ALI. L'évolution des réponses cellulaires entre

activation précoce et adaptation progressive a montré que les effets induits par le flux d'air peuvent varier en fonction de la durée d'exposition et ainsi influencer l'interprétation des réponses biologiques attribuées aux polluants.

Ainsi, l'inclusion systématique de contrôles incubateur(T_INC) et air propre (T_AIR) est apparue indispensable pour dissocier les effets liés au flux d'air de ceux induits par les polluants testés au travers d'expositions ALI, et garantir une interprétation fiable des données. Plus largement, ces résultats ont souligné la nécessité d'intégrer la dimension temporelle des réponses mécano-induites dans la conception expérimentale des études d'exposition ALI, afin d'améliorer la robustesse et la comparabilité des résultats ainsi obtenus.

4.2.4. Le stress mécanique dû au flux d'air est-il inévitable ?

En identifiant les voies de signalisation associées aux contraintes de cisaillement comme une composante centrale des réponses induites par le flux d'air, ce travail a démontré que ce dernier n'est pas une condition biologiquement inerte, mais une variable expérimentale active devant absolument être prise en compte. Cet état basal induit mécaniquement, s'il n'est pas correctement intégré dans l'analyse expérimentale, pourrait aboutir à une interprétation erronée des effets biologiques spécifiquement attribués aux polluants. De manière importante, des réponses similaires induites par le flux d'air, notamment en termes de stress oxydant et d'inflammation, ont été rapportées dans différents systèmes dynamiques d'exposition ALI et modèles cellulaires pulmonaires, indiquant que l'ensemble des systèmes d'exposition ALI utilisés dans la littérature reste intrinsèquement susceptible à des biais liés au flux d'air.

4.2.4.1. Harmonisation des pratiques pour la présentation et l'analyse des résultats toxicologiques d'exposition en ALI

Dans ce contexte, l'inclusion systématique et l'interprétation rigoureuse de contrôles incubateur (T_INC) et air propre (T_AIR) doivent être considérées comme une exigence minimale pour toute étude utilisant des systèmes dynamiques d'exposition ALI. Ces deux types de contrôles sont indispensables pour dissocier les effets induits par le flux d'air de ceux spécifiquement liés aux polluants. Toutefois, l'étude des publications récentes utilisant

des systèmes d'exposition ALI ont mis en évidence non seulement une intégration non systématique de ces contrôles, mais également un manque de clarté dans leur définition. Des termes tels que « contrôle négatif », « contrôle air propre », « sham » ou « cellules non traitées » ont fréquemment été utilisés de manière interchangeable, bien qu'ils ne correspondaient pas à des conditions expérimentales fondamentalement différentes. L'harmonisation de la nomenclature des contrôles et la définition explicite des conditions expérimentales associées constituent ainsi des étapes critiques pour améliorer l'interprétation des données et la comparabilité inter-études.

Au-delà de ces considérations, et malgré les efforts antérieurs visant à établir de bonnes pratiques expérimentales, des lacunes majeures persistent dans l'harmonisation des expositions dynamiques ALI (Lacroix et al., 2018; Braakhuis et al., 2023). Des limitations similaires ont aussi été observées dans d'autres approches d'exposition aux aérosols, telles que les systèmes ALI statiques (dépôt par sédimentation en nuage, CLOUD®), pour lesquels les contrôles ne sont pas non plus systématiquement mis en place et où des effets liés au véhicule (solide ou liquide) pourraient aussi introduire des biais supplémentaires (Camassa et al., 2022; Braakhuis et al., 2023; Elje et al., 2024; Mitchell et al., 2024; Stoleriu et al., 2024). Ces limitations ont souligné la nécessité d'harmoniser rapidement les pratiques de description expérimentale et de structurer des cadres méthodologiques communs entre les systèmes d'exposition en ALI.

Compte tenu de la dynamique temporelle mise en évidence dans les analyses transcriptomiques, montrant une transition entre une activation précoce et une phase d'adaptation cellulaire lors d'expositions prolongées, l'impact du flux d'air est apparu comme un phénomène transitoire, qui pourrait être mieux évalué et contrôlé dans les futures expérimentations. Mais alors, peut-on réellement harmoniser les pratiques d'exposition ALI dynamique en conseillant un seuil de débit d'air, une température ou une humidité optimale ou encore une durée d'exposition ? Cela paraît relativement compliqué car ces paramètres expérimentaux ne peuvent être strictement harmonisés de manière universelle, car ils dépendent intrinsèquement de la question scientifique posée, du modèle biologique utilisé, ainsi que de l'objectif expérimental visé. Par exemple, la simulation d'une exposition environnementale réaliste repose généralement sur de faibles concentrations administrées sur des durées d'exposition relativement longues, tandis que les approches

visant à évaluer des réponses aiguës ou des relations dose-réponse privilégient des concentrations plus fortes sur des durées d'exposition plus courtes.

Une harmonisation stricte des conditions expérimentales d'exposition ALI dynamique apparaît difficile à atteindre et potentiellement inadaptée à la diversité des objectifs scientifiques poursuivis. En revanche, l'harmonisation des pratiques peut être efficacement abordée par la normalisation des stratégies de contrôle et par la description explicite des conditions expérimentales associées. L'inclusion systématique de contrôles appropriés, combinée à une définition claire et non ambiguë de leur rôle expérimental, constituerait ainsi une approche pragmatique et robuste pour limiter les biais liés au flux d'air et améliorer la reproductibilité ainsi que la comparabilité des études en toxicologie d'inhalation.

4.2.4.2. *Recommandations pour limiter l'impact du flux d'air lors des expositions ALI*

Au-delà de la mise en œuvre de contrôles appropriés, les résultats ont souligné que les paramètres d'exposition ALI constituent des déterminants critiques des réponses cellulaires plutôt que de simples variables secondaires. Des facteurs clés tels que le temps d'acclimatation en ALI, le niveau de confluence cellulaire, le débit du flux d'air, la durée d'exposition, le modèle cellulaire utilisé, ainsi que les conditions de conditionnement de l'air (température, humidité, supplémentation en CO_2) pourraient influencer de manière significative la viabilité cellulaire, les réponses au stress et la pertinence physiologique du modèle. Une acclimatation insuffisante pourrait exacerber les réponses au stress, tandis qu'un contrôle inadéquat du flux d'air ou des conditions environnementales pourrait induire des effets biologiques non spécifiques, indépendants des composés testés.

Afin d'améliorer la cohérence et la reproductibilité entre études, la description harmonisée des principaux paramètres d'exposition en ALI, telle que résumée dans les tableaux de l'Annexe 2 devrait être préconisée. Sur la base du travail bibliographique réalisé ici, plusieurs variables critiques devraient être explicitement documentées, notamment le modèle cellulaire utilisé, le temps d'acclimatation en ALI, le niveau de confluence au moment de l'exposition, le débit du flux d'air, la durée d'exposition et le temps de récupération post-exposition, les conditions de conditionnement de l'air testé, ainsi que l'utilisation éventuelle de techniques d'optimisation du dépôt particulaire. La description

systématique de ces paramètres sous forme de tableau, par exemple, faciliterait la comparaison entre les études, améliorerait la transparence méthodologique et renforcerait l'interprétation des données. Plus largement, une telle harmonisation contribuerait à renforcer la robustesse des modèles pulmonaires *in vitro*, et surtout les résultats issus de leur exposition en ALI, supportant ainsi leur rôle dans la réduction du recours à l'expérimentation animale, en accord avec la règle des 3R, et constituant une étape nécessaire vers leur reconnaissance dans des cadres réglementaires.

Des recommandations pratiques devraient également être mises en œuvre afin de limiter les artéfacts induits par le flux d'air, notamment la stabilisation des systèmes avant exposition, une habituation suffisante en ALI, un rinçage du tapis cellulaire quelques heures avant l'exposition, ainsi qu'une habituation progressive au flux d'air avec un ajustement graduel du débit. Parallèlement, l'intégration de marqueurs biologiques précoces des mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans les effets non spécifiques du flux d'air propre (T_AIR) devrait être encouragée, là où les tests classiques de viabilité cellulaire ne reflètent principalement que des stades tardifs des altérations cellulaires, négligeant les réponses précoces biologiquement pertinentes.

En accord avec la littérature, parmi ces réponses, l'activation de gènes antioxydants et la sécrétion de cytokines apparaissent de manière récurrente comme des marqueurs précoces et persistants, détectables de quelques minutes jusqu'à 72 h après exposition ALI. L'expression de *HMOX1* , ainsi que l'expression et la sécrétion d'IL-6 et d'IL-8, figurent parmi les marqueurs précoces les plus fréquemment rapportés en réponse au stress induit par le flux d'air, tandis que l'induction de l'expression de *CYP1A1* a été encore peu décrite (Cervena et al., 2020; Alunni et al., 2026). En cohérence avec ces observations, dans ce travail, les données transcriptomiques ont montré une activation marquée de la voie AhR, accompagnée d'une surexpression robuste de *CYP1A1* après 24 h et 72 h d'exposition. De plus, les dosages de cytokines ont confirmé la sécrétion d'IL-8 et IL-6 après 24 et 72 h d'exposition ALI. En intégrant ces résultats aux données disponibles dans la littérature, ces observations ont indiqué que les voies inflammatoires, antioxydantes et associées au récepteur AhR constitueraient des signatures biologiques conservées de l'impact du flux d'air dans les systèmes dynamiques ALI.

Sur la base des observations issues du travail bibliographique réalisé ici, il est possible de proposer un cadre hiérarchisé de biomarqueurs biologiques permettant d'évaluer le stress induit par le flux d'air tout en permettant une évaluation toxicologique pertinente de la substance testée. Les marqueurs mécanistiques précoces, tels que la sécrétion d'IL-6 et d'IL-8 ainsi que l'activation transcriptionnelle de *HMOX1* et *CYP1A1*, constituent des indicateurs sensibles de l'impact du flux d'air avant l'apparition de dommages cellulaires manifestes durant une longue période d'exposition. Les marqueurs adaptatifs intermédiaires, incluant des panels élargis de cytokines ou l'expression de plusieurs gènes antioxydants, pourraient refléter une activation cellulaire prolongée et des processus d'adaptation au stress. À l'inverse, les marqueurs tardifs de dommage, tels que la peroxydation lipidique, la libération de LDH ou l'altération de l'activité métabolique, reflètent probablement des stades avancés de l'altération cellulaire et constituent donc des indicateurs moins sensibles des effets précoces du flux d'air.

Ainsi, l'évaluation combinée de la sécrétion d'IL-6 et d'IL-8, associée à l'expression de *HMOX1* et *CYP1A1*, déjà fréquemment utilisée pour l'évaluation de la toxicité de composés, constitue un panel minimal pratique et mécanistiquement informatif pour l'évaluation précoce de l'impact du flux d'air et des performances du système d'exposition utilisé. L'intégration de tels marqueurs précoces dans les procédures de contrôle qualité de routine permettrait une détection plus sensible des activations basales induites mécaniquement, améliorant ainsi la fiabilité et l'interprétabilité des études tout en permettant le suivi d'une amélioration continue des expositions dynamiques en ALI.

Dans leur ensemble, ces résultats appellent à une évolution dans la manière dont les expositions dynamiques en ALI sont conçues et interprétées. Comprendre et caractériser le stress induit par le flux d'air constitue un préalable essentiel pour en maîtriser l'impact expérimental. Reconnaître le flux d'air comme un déterminant actif des réponses cellulaires, et en contrôler systématiquement les effets, est indispensable pour garantir la robustesse, la reproductibilité et la pertinence toxicologique des études reposant sur des systèmes d'exposition ALI dynamiques.

4.3. Effets toxicologiques des AOS de HAP et phénol sur des cellules alvéolaires exposées en ALI

Après avoir établi un modèle alvéolaire robuste et caractérisé les réponses biologiques induites par le flux d'air seul, l'évaluation des effets toxicologiques des AOS a pu être abordée dans des conditions expérimentales maîtrisées. Une telle approche devait permettre d'isoler les effets spécifiques des particules testées tout en tenant compte des mécanismes d'activation basale liés à l'exposition en ALI. Cette section présente la caractérisation physico-chimique et l'évaluation des effets toxicologiques d'AOS générés en laboratoire en conditions diurne (oxydant OH) et nocturne (oxydant NO3) à partir de l'oxydation de précurseurs aromatiques d'AOS sélectionnés et typiquement émis par la combustion de biomasse, incluant des HAP, le phénol, seuls ou en mélange, sur le modèle alvéolaire de coculture développé précédemment.

4.3.1. Compréhension de la compétition des oxydants, de la photolyse et des différents précurseurs d'AOS dans le réacteur d'oxydation à écoulement PAM-OFR

Lors de la génération des AOS dans le réacteur PAM-OFR, différents mécanismes réactionnels sont en compétition incluant les réactions des précurseurs avec les différents oxydants majeurs en présence (OH, O_3, NO_3) mais aussi avec la lumière induite par l'irradiation UV dans le cas des essais simulant la chimie diurne. Dans le cas de la présence de NO_x (NAPH + NO_x +OH) dans le système la réactivité directe du NAPH avec ceux-ci (NO ou NO_2) est négligeable en comparaison des autres mécanismes réactionnels et donc elle n'est pas prise en compte dans la simulation. La nature des mécanismes réactionnels conditionne directement la composition chimique des AOS formés et, par conséquent, leur réactivité potentielle vis-à-vis des systèmes biologiques. Leur connaissance et compréhension constitue un préalable indispensable à l'interprétation des effets toxicologiques observés (Figure 4. 12.) et Tableau 4. 3.

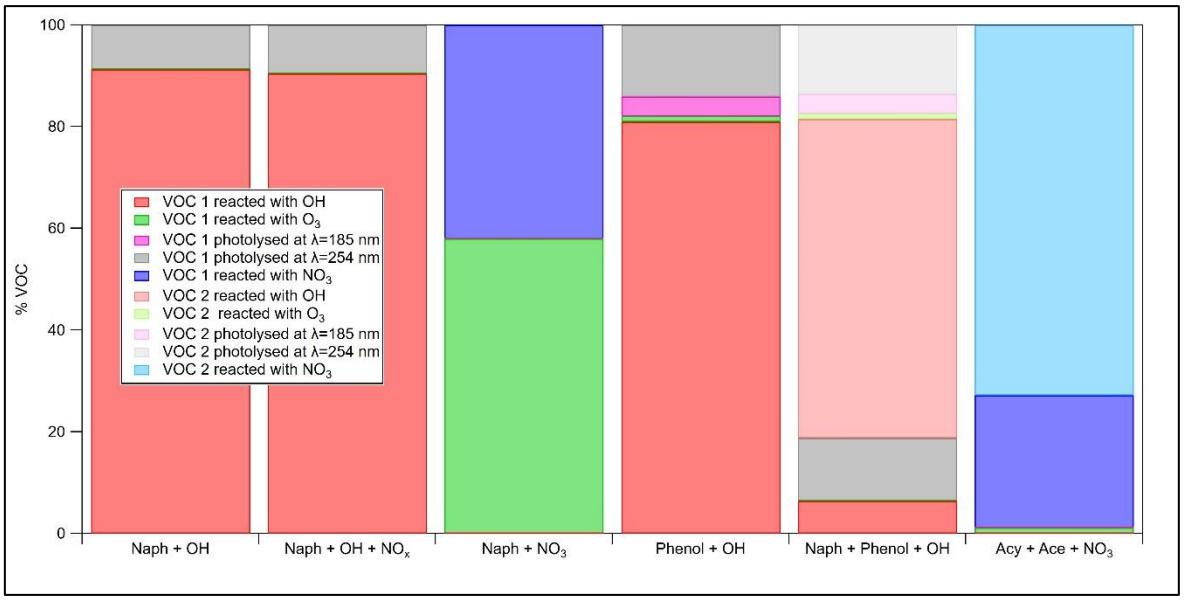


Figure 4.12. : Importance relative des voies de dégradation des HAP et du phénol au sein du réacteur PAM-OFR en mode OFR185 (jour) et OFR-iN_2O_5 (nuit). VOC_1 est relatif soit à un précurseur seul (Naph, Phénol) ou au premier listé dans le cas d'un mélange (Naph, Acy). VOC_2 désigne le deuxième précurseur listé dans le cas d'un mélange (Phénol, Ace).

En condition diurne (mode OFR185), la dégradation des précurseurs d'AOS (HAP ou phénol) est dominée par la réactivité avec les radicaux OH (70-91 %). Le reste est essentiellement due à la photolyse à 254 nm tandis que l'ozonolyse et la photolyse à 185 nm sont négligeables mis à part pour le phénol cette dernière représente environ 4 %. Dans ces cas, presque la totalité du NAPH initial a réagi dans le système (99.79-99.98 %) tandis que seuls 23,09 % du phénol initialement injecté a réagi. Cela induit qu'à il restait une concentration importante de phénol dans le flux d'air en sortie du PAM-OFR à laquelle qui les cellules ont été exposées. De manière remarquable, l'introduction d'un mélange contenant 85 % de phénol et 15 % de NAPH a profondément modifié les voies réactionnelles du NAPH, dont la dégradation est devenue majoritairement liée à la photolyse à 254 nm au détriment de réactivité avec OH. Ces résultats soulignent la forte dépendance des mécanismes réactionnels à la composition initiale du mélange. Dans ce cas, la grande majorité du NAPH initial a réagi (89,25 %) tandis que seul 9,49 % du phénol initial a été consommé. Les cellules ont donc été exposées à des concentrations non négligeables de ces deux composés chimiques lors de ces expérimentations.

En condition nocturne (mode OFR-iN_2O_5) seuls O_3 et NO_3 sont en compétition. Pour le mélange ACY + ACE la réactivité est largement dominée par NO_3 et l'ozonolyse était négligeable (1 %). Les deux précurseurs ont entièrement réagi et la consommation de NO_3 en présence était surtout due à ACE (73 %). Pour le NAPH, seul 1 % de la concentration initiale injectée dans le PAM-OFR a réagi et l'ozonolyse était majoritaire (58 %) tandis qu'environ 42 % a réagi avec NO_3. Le flux d'air en sortie du PAM-OFR auquel les cellules ont été exposées contenait donc une concentration importante de NAPH résiduel qu'il convient de considérer dans l'interprétation finale des résultats toxicologiques.

Enfin, la présence de NO_x dans le système que cela soit pour les expérimentations avec NO_3 ou pour les essais NAPH + NO_x + OH a induit formation significative d'acide nitrique (HNO_3) qui peut aussi impacter les résultats toxicologiques et qu'il convient donc de garder à l'esprit. Etant donné les concentrations en NO_x initiales plus importantes dans le cas des essais de réactivité avec NO_3, les concentrations résultantes en HNO_3 étaient sept fois plus importantes que celles obtenues lors des essais NAPH + NO_x + OH (Tableau 4. 3.). Enfin, notons que les rapports initiaux NO_x/COV lors de ces trois expérimentations étaient résolument différents avec un ratio de l'ordre de 97 pour ACY + ACE + NO_3, de 3 pour NAPH + NO_x + OH et de 1 pour NAPH + NO_3. Ces différentes conditions ont eu un impact sur la proportion de composés nitro-organiques formés (voir section 4.3.3).

Pour finir, les compétitions entre les précurseurs et les mécanismes réactionnels mis en jeu ont eu un impact sur la composition chimique des AOS formés (phases gazeuse et particulaire) et donc sur les effets biologiques observés.

Tableau 4. 3. : Conditions expérimentales utilisées pour étudier la formation d'AOS à partir de HAP et phénol, seuls ou en mélange, en conditions de réactivité diurne (radical OH) et nocturne (radical NO_3).

COVs	Oxydant	Ajout de NO_x	$[COV]_0$ ($mg.m^{-3}$)	[AOS] ($mg.m^{-3}$)	Fraction des COVs ayant réagi (%)	HR (%)	T (°C)	$[O_3]_{PAM}$ (ppmv)	NO_x/COV	$[NO_x]$ (ppbv)	$[HNO_3]$ (ppbv)	OH_{exp} ou NO_{3exp}	Vieillissement équivalent (jours ou nuits)*
ACE + ACY	NO_3		0,03 + 0,08	412	100,00 + 100,00	75	25	14,60	97	1605	14,7	$8,6\times10^{13}$	2,32
NAPH	NO_3		3,24	328	1,00	66	26	14,10	1	616	13,7	$1,1\times10^{14}$	3,02
NAPH	OH		0,24	289	99,98	66	30	0,27	-	-	-	$4,5\times10^{11}$	3,43
NAPH	OH	X	0,29	225	99,79	66	30	0,22	3	184	2,3	$3,1\times10^{11}$	2,41
Phénol	OH		1,86	206	23,09	60	30	0,21	-	-	-	$9,2\times10^{9}$	0,07
NAPH + Phénol	OH		0,33 + 1,86	190	89,25 + 9,49	62	29	0.09	-	-	-	$3,3\times10^{9}$	0,03

*Une journée est considérée sur une base de 24 h tandis qu'une nuit est considérée sur une base de 14 h.

4.3.2. Concentrations, morphologie et granulométrie des AOS générés

Les concentrations d'AOS générées ont été ajustées dans le but de refléter les conditions environnementales. Les concentrations atmosphériques d'AOS obtenues étaient comprises entre 200 et 400 µg.m^{-3} selon le précurseur et les conditions d'oxydation (Tableau 4.3.), et étaient compatibles avec des niveaux de concentrations en air ambiant fortement pollués et notamment impactés par des émissions de combustion de biomasse (Bruns et al., 2016; Ahern et al., 2019; Schueneman et al., 2024, 2025). Etant donné que la déposition effective des particules à la surface cellulaire en ALI est très partielle et difficilement prédictible, ces conditions expérimentales ont permis d'assurer la déposition suffisante en terme de quantité de particules déposées à la surface des cellules afin d'obtenir des réponses biologiques quantifiables (voir section 4.3.4.). Enfin, ces concentrations ont été générées de façon stable et en continu sur de très longues périodes compatibles avec les expositions ALI de 24 et 72 h (Figure 4.3). Cette stabilité a confirmé la robustesse des conditions de génération des AOS et a garanti la reproductibilité des expositions cellulaires réalisées.

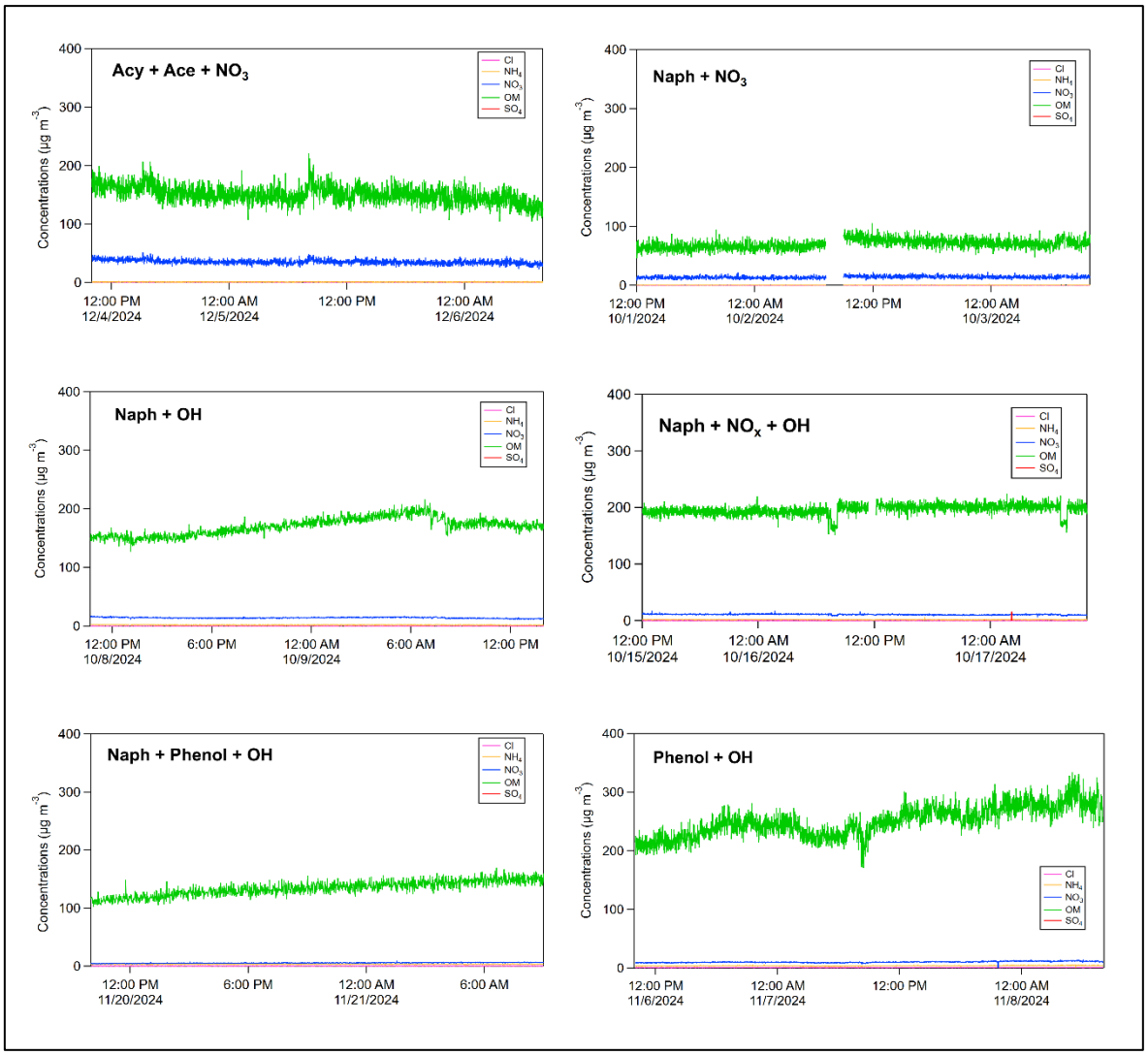


Figure 4. 13. : Exemples de mesures réalisées par Q-ACSM montrant la génération stable des AOS issus des HAP et phénol, seuls ou en mélange, en conditions de réactivité diurne (radical OH) et nocturne (radical NO_3) sur des durées jusqu'à 48 h. La concentration en AOS est équivalent à OM (organic matter) pour les expériences avec les radicaux OH, et égale à à OM + NO_3 pour les expériences avec les radicaux NO_3. Le NO_3 détecté par le Q-ACSM comme du nitrate particulaire est en fait constitué d'espèces nitro-organiques.

La Figure 4.14 présente les distributions granulométriques moyennes en nombre de particules obtenues pour les différents AOS générés. Globalement, toutes les distributions granulométriques observées étaient monomodales à l'exception de NAPH + NO_3 qui semble présenter un deuxième petit mode vers 50 nm. Un décalage vers des plus grosses particules, avec un mode principal vers 280 nm, a été observé pour les AOS NAPH dans les conditions de réactivité avec NO_3 en lien avec les concentrations initiales en précurseur (NAPH) dix fois

plus importantes que pour les essais avec OH. Ces observations sont en accord avec les précédents résultats rapportés dans la littérature (El Mais et al., 2023). L'ajout de NO_x dans le système avec NAPH + OH n'a eu aucun impact sur les granulométries des AOS obtenues qui sont totalement superposées et centrées vers 58 nm. Le mode pour phénol + OH était de 70 nm et celui de mélange NAPH + phénol + OH entre les deux AOS formés à partir des précurseurs seuls vers 65 nm. La distribution granulométrique des AOS ACY + ACE + NO_3 était centrée vers 150 nm.

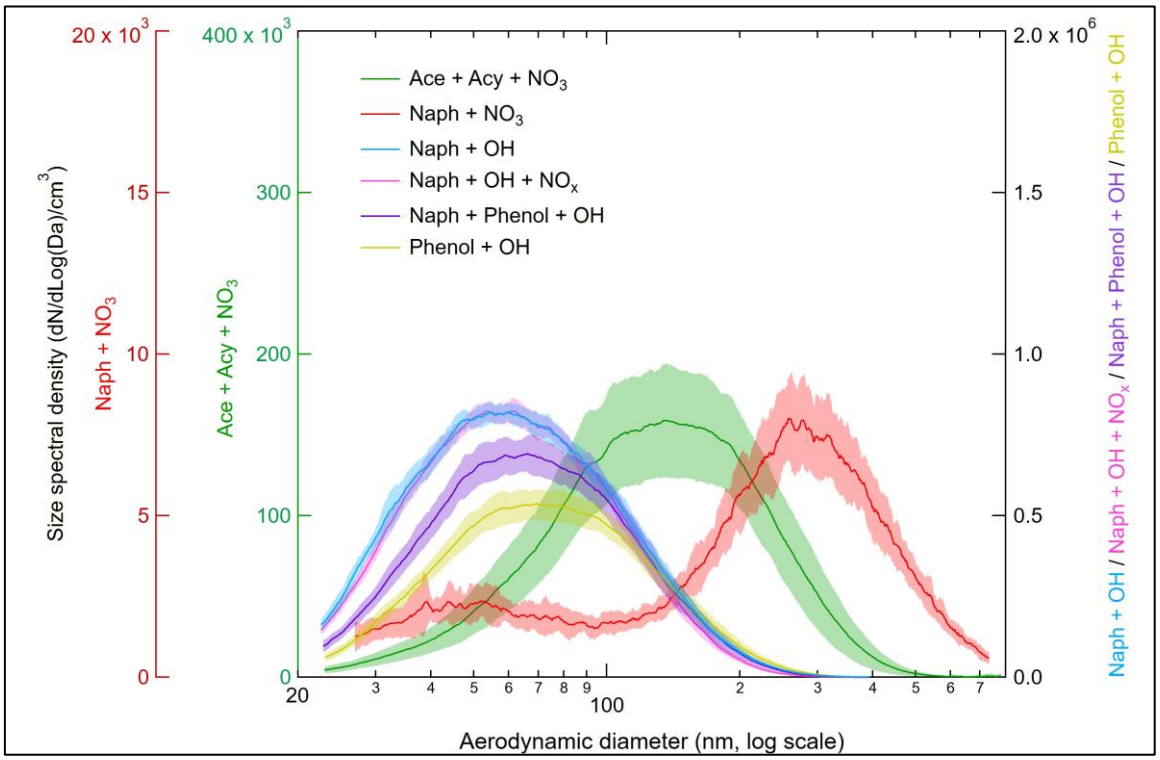


Figure 4. 14 : Comparaison des distributions granulométriques en nombre de particules selon leur diamètre aérodynamique pour les AOS issus de l'oxydation des HAP et du phénol, seuls ou en mélange, en conditions de réactivité diurne (radical OH) et nocturne (radical NO_3). Résultats obtenus à partir des mesures AAC + CPC. Les courbes centrales représentent les distributions moyennes et les parties colorées autour de celles-ci les écart-types sur le nombre de réplicas réalisés (n = 10 à 20).

Dans l'ensemble, les distributions granulométriques observées des AOS formés par nucléation homogène (sans particules support) se situaient dans la gamme $PM_{0.1}$ et PM_1. Ces résultats confirment que les AOS générés relevaient de fractions particulaires

particulièrement pertinentes pour l'étude des interactions avec l'épithélium alvéolaire humain (Oberdörster, 2001; Kreyling et al., 2013).

Au-delà de leur taille et de leur concentration, l'organisation structurale des particules d'AOS constituait un paramètre déterminant pour comprendre leurs interactions avec les cellules alvéolaires. Dans cette perspective, une analyse morphologique des AOS a été réalisée par MET Celle-ci est toutefois limitée compte tenu des phénomènes de volatilisation qui peuvent survenir lors de leur analyse. Cependant, les images obtenues permettent de révéler des signatures structurales distinctes selon les précurseurs et les conditions d'oxydation (Figure 4. 15).

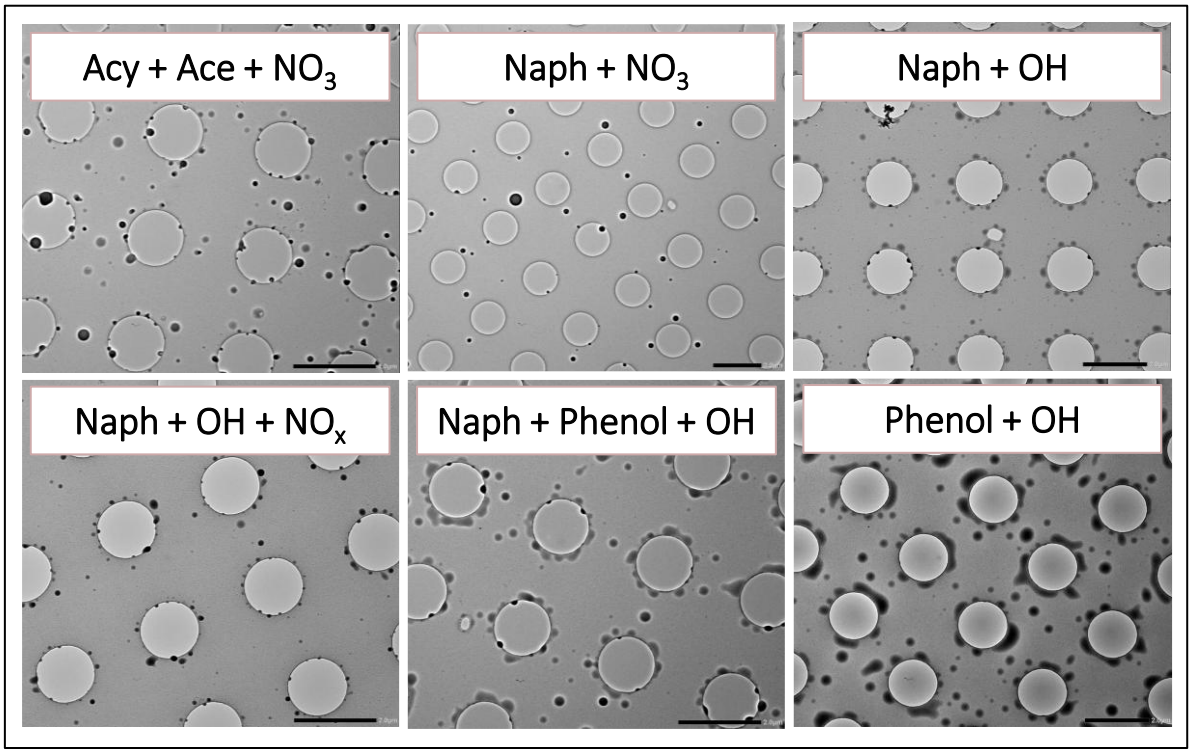


Figure 4. 15. : Images MET (microscopie électronique à transmission) illustrant la morphologie des particules d'AOS générées à partir de l'oxydation des HAP et du phénol, seuls ou en mélange, en conditions de réactivité diurne (radical OH) et nocturne (radical NO_3). Barre d'échelle : 2 µm.

De façon générale, pour les AOS issus de l'oxydation des HAP, les particules impactées sur les grilles MET étaient relativement sphériques tandis que celles issues de l'oxydation du phénol étaient plus difformes et plus étalées. En mélange, NAPH + phénol +

OH, il est aisé de distinguer les deux types de particules. Ces différences étaient probablement en lien avec l'état de la matière. Les AOS formés par nucléation sont reconnus pour être essentiellement liquides (Koop et al., 2011; Reid et al., 2018) ce qui était aussi visible sur les images TEM obtenues ici avec les particules au niveau des trous de la grille qui ressemblent à des gouttes. Les différences observées entre les AOS HAP et AOS phénol étaient probablement en lien avec leur viscosité. En accord avec la littérature, les particules d'AOS HAP étaient certainement plus visqueuses, proches d'un état semi-solide, que celles des AOS issus du phénol. Ces dernières, qui une fois impactées sur la grille TEM, étant liquides, ont eu tendance à s'étaler. Il a par ailleurs récemment été montré que les AO de combustion de biomasse sont dans un état solide vitreux après un vieillissement prolongé sous irradiation UV (Golay et al., 2026). L'humidité relative lors de leur formation, et donc le contenu en eau, et la masse moléculaire des composés composant les particules AO sont des paramètres prépondérant jouant sur leur état liquide, semi-solide ou vitreux (Virtanen et al., 2010; Koop et al., 2011; Saukko et al., 2012; Reid et al., 2018). Etant donné que les AOS ont été générés dans des conditions d'humidité relative comparables (Tableau 4. 3.), leur composition chimique et notamment les composés de poids moléculaires plus importants associés aux AOS HAP qu'aux AOS phénol expliquaient donc probablement les différences d'états observées ici (Figure 4. 16., section 4.3.3.) (Koop et al., 2011; Reid et al., 2018).

Dans l'ensemble, ces observations ont mis en évidence une forte dépendance de l'état physique des AOS aux précurseurs dont ils sont issus et à leur composition chimique, allant de structures sphériques visqueuses à des particules liquides. Ces propriétés morphologiques sont susceptibles d'influencer directement le comportement des particules dans l'environnement biologique, notamment leur capacité de diffusion, de dissolution ou d'interaction avec les membranes cellulaires (Champion and Mitragotri, 2009; Albanese et al., 2012; Niikura et al., 2013; Baranov et al., 2020).

4.3.3. Composition chimique des particules d'AOS générés

Les compositions chimiques des fractions particulaires des différents AOS générés déterminées à partir des mesures EESI-TOF-MS sont présentées sur les Figures 4. 16. et 4. 17. Le travail d'analyse des données de mesures a été réalisé par l'Université d'Aahrus (Danemark) et par l'Université Américaine du Liban (Liban). Il est important de noter que faute de mesures directes valides disponibles, la composition pour AOS phénol + OH a été déduite de façon indirecte par différence entre NAPH + Phénol + OH et NAPH + OH.

Les résultats obtenus mettent en avant la diversité des composés constitutifs des AOS étudiés en lien avec la nature des précurseurs et les conditions de réactivité. La composition moléculaire dans le cas des expérimentations avec uniquement OH était dominée par des molécules de type $C_xH_yO_z$ (CHO) (82,9 à 94,2%). Comme prévu, les espèces contenant de l'azote (nitro-organiques) sont presque totalement absentes dans ces expériences sans NO_x, avec seulement des pics mineurs détectés, très probablement en raison du niveau élevé de fond de ces ions provenant d'expériences précédentes. Les composés obtenus ont généralement le même nombre de carbones que leurs composés aromatiques parents (C_6H_6O, phénol ou $C_{10}H_8$, NAPH) ce qui suggèrerait l'importance de la conservation des cycles aromatiques. Ces résultats étaient cohérents avec les observations précédentes rapportées dans la littérature où à faible teneur en NO_x la voie réactionnelle RO_2 + HO_2 domine (Chan et al., 2009; Kautzman et al., 2010; Nakao et al., 2011; Yee et al., 2013; Surdu et al., 2021; Offer, Hartner, Di, et al., 2022; Srivastava et al., 2022; Offer et al., 2024; Schueneman et al., 2024). La formation d'oligomères (> C10 pour NAPH, > C6 pour phénol) et même de dimères en C20 dans le cas des AOS NAPH +OH a été observée. Elle traduit l'ajout de groupes fonctionnels sur les précurseurs et des processus réactionnels RO_2 + RO_2. Les composés formés avaient donc des masses moléculaires plus importantes que les précurseurs injectés initialement et potentiellement une aromaticité plus importante dans le cas des AOS NAPH. L'ajout de NO_x dans le système, dans le cas des essais avec NAPH + NO_x + OH, a conduit indubitablement à une formation accrue de composés nitro-organiques $C_xH_yO_zN$ (CHON) représentant 23,0 % du signal total. Contrairement aux résultats rapportés dans la littérature l'ajout de NO_x dans le système n'a pas inhibé la formation de dimères (Yan et al., 2020). En effet, non seulement les dimères CHO en C20

ont été observés avec la même intensité que dans le cas de NAPH + OH, mais également les composés nitrés contenaient un nombre de carbones plus important que le précurseur initial (NAPH, $C_{10}H_8$) notamment en C12, C13 et C19 (oligomères). Le faible ratio NO_x/COV (ratio égal à 3, Tableau 4. 3.) lors de ces expérimentations, correspondant à un régime atmosphérique « low-NO_x », explique certainement ces résultats. En mélange NAPH + phénol + OH, la proportion l'oligomères et de dimères, était plus fiable (10,1 % du signal total) en lien avec la réactivité préférentielle de OH avec le phénol plutôt qu'avec NAPH (voir section 4.3.1.). Ces résultats sont en accords avec la littérature rapportant que l'oxydation du phénol produit principalement des monomères oxygénés de faible poids moléculaire comme observé pour l'AOS phénol + OH même si la formation de dimères est possible notamment lors de processus en phase aqueuse (Sun et al., 2010; Yu et al., 2014). Une meilleure fonctionnalisation et oligomérisation pour les réactions en phase aqueuse et à une plus grande fragmentation pour les réactions en phase gazeuse expliquent ces différences qui induisent que les taux de formation d'AOS sont plus importants en phase aqueuse qu'en phase gazeuse (Li, Zhou, et al., 2023). Par soustraction entre NAPH + phénol + OH et NAPH + OH, le même constat peut être fait avec le phénol seul réagissant avec OH.

En comparaison des AOS NAPH + NO_x + OH, dans le cas de la réactivité de NAPH + NO_3, la formation de composés CHON était relativement plus faible (13,1 % du signal total). En effet, la formation d'AOS avec le radical NO_3 seul n'induit pas nécessairement une formation importante d'espèces nitro-organiques en phase particulaire. Pour les HAP, une formation significative d'espèces nitro-organiques (et chromophores) est généralement observée lors des processus d'oxydation hétérogènes avec le radical NO_3 (gaz/particule) mais pas pour les réactions de nucléation homogène en phase gazeuse (Kwamena and Abbatt, 2008; Lu et al., 2011; Keyte et al., 2013; Cheng et al., 2020). La réaction de NAPH avec le NO_3 seul induit une formation de nitronaphtalènes et de nitronaphtols qui sont principalement en phase gazeuse et ne sont pas associés aux particules d'AOS formées (Keyte et al., 2013). Dans le cas des AOS ACY + ACE + NO_3, la proportion de composés CHON était plus importante représentant environ 25,8 % du signal total. Les composés CHON détectés étaient essentiellement des oligomères (> C12, 64 % du total des CHON) ($C_{12}H_{10}$ et $C_{12}H_8$, ACY et ACE). Elle restait cependant faible compte tenu du ratio NO_x/COV très élevé lors de ces expérimentations (ratio égal à 97, régime « high-NO_x »). Dans ce cas aussi, la

formation d'espèces nitro-organiques en phase particulaires lors des processus de nucléation homogène était limitée. En effet, les réactions impliquant l'interaction de NO_3 avec des groupes substituants par abstraction d'atomes d'hydrogène, par exemple pour ACE et ACY, n'induisent pas une addition de NO_2 sur les sous-produits formés (Keyte et al., 2013; Zhou and Wenger, 2013). Ces résultats sont en accord avec des travaux précédents menés à l'INERIS où l'analyse détaillée par chromatographie liquide et gazeuse couplée à la spectrométrie de masse haute résolution (LC- et GC-HRMS) de particules d'AOS ACY +ACE + NO_3 a montré que la part de composés nitro-organiques sur la quantité totale de composés détectés ne représentait que 6 % (Albinet et al., 2019; Allouche, 2020).

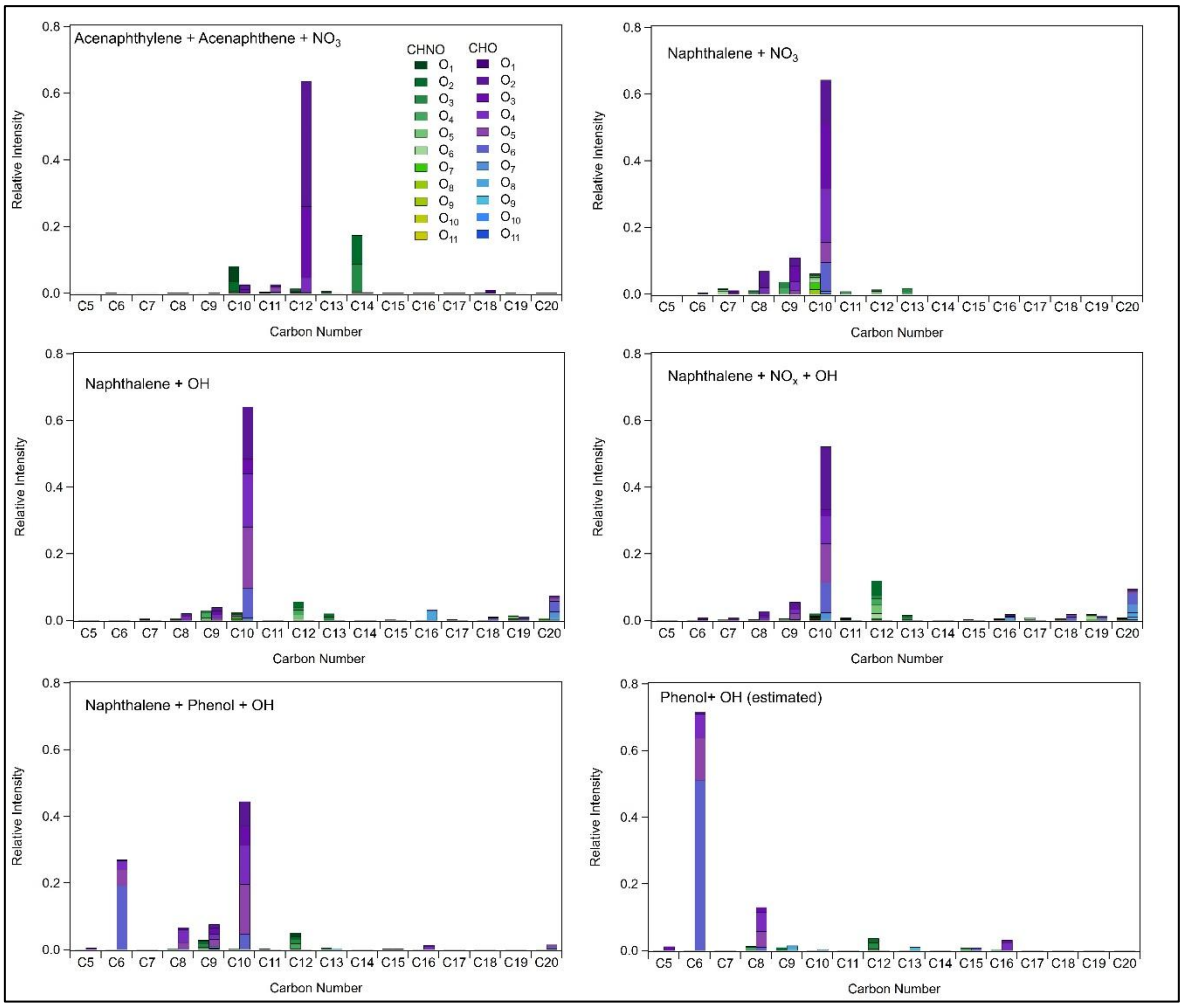


Figure 4. 16. : Comparaison des distributions moléculaires, mesurées par EESI-TOF-MS, des composés associés aux AOS (phase particulaire) générés à partir de l'oxydation des HAP et phénol, seuls ou en mélange, en conditions de réactivité diurne (radical OH) et nocturne (radical NO_3). Ces distributions sont représentées selon le nombre de carbone des composés en présence et empilés verticalement par le nombre d'atomes d'oxygène. Les composés contenant de l'azote (CHON, nitro-organiques) sont présentés distinctement des composés ne contenant pas d'azote (CHO).

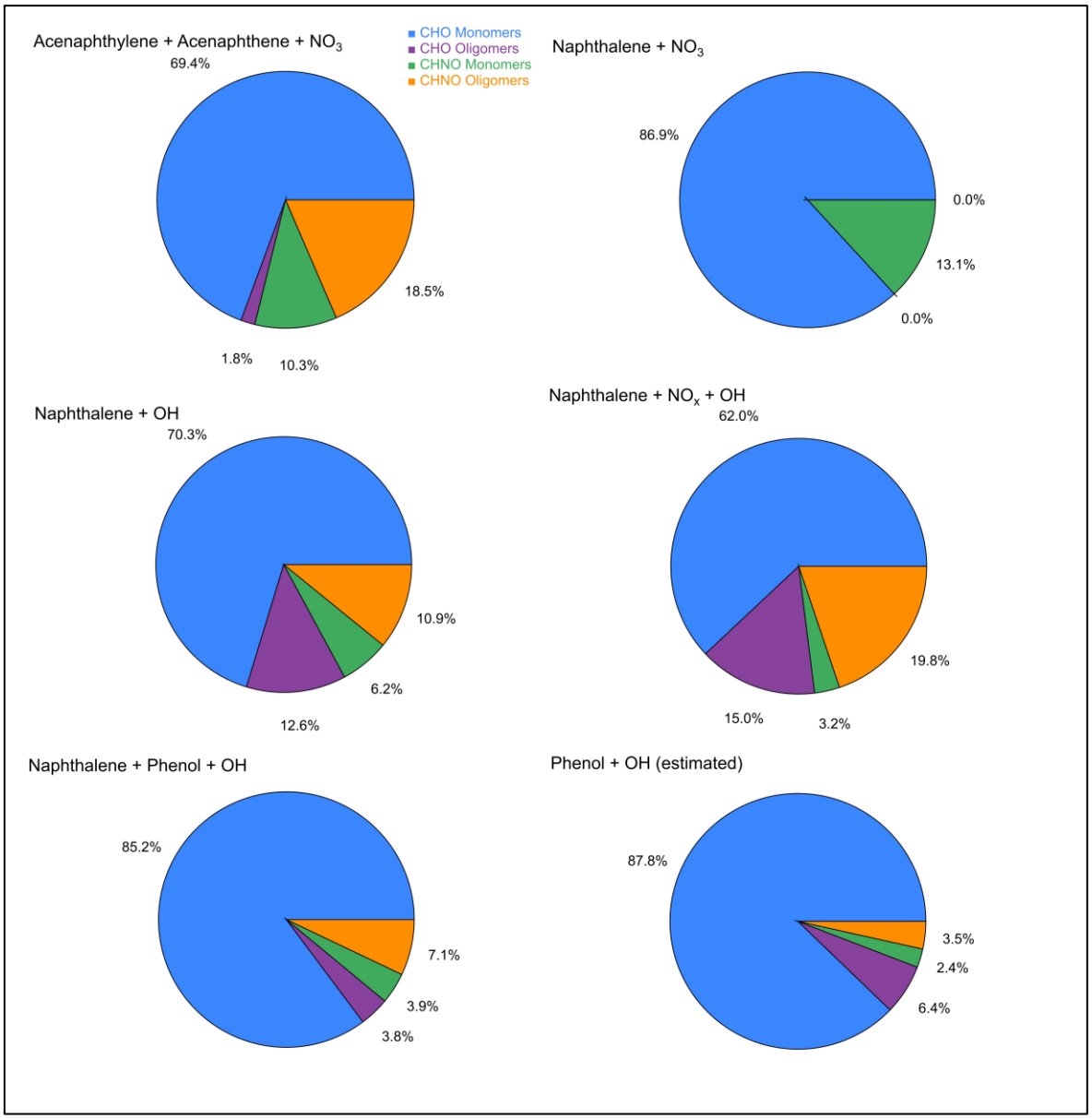


Figure 4. 17. : Contribution au signal total, mesuré par EESI-TOF-MS, des monomères (≤ C12 pour ACY + ACE, ≤ C10 pour NAPH, ≤ C6 pour phénol) et oligomères (> C12 pour ACY + ACE, > C10 pour NAPH, > C6 pour phénol) azotés (CHNO) et non azotés (CHO) associées aux AOS (phase particulaire) générés à partir de l'oxydation des HAP et phénol, seuls ou en mélange, en conditions de réactivité diurne (radical OH) et nocturne (radical NO_3).

Enfin, les composés majoritaires associés aux AOS contenaient un nombre d'atomes d'oxygène variable selon la nature des précurseurs et les conditions de réactivité en accord avec les études précédentes (Chan et al., 2009; Kautzman et al., 2010; Nakao et al., 2011; Yee et al., 2013; Allouche, 2020; Surdu et al., 2021; Srivastava et al., 2022; Lannuque and Sartelet, 2024; Offer et al., 2024; Schueneman et al., 2024). Les plus faibles nombres

d'oxygènes étaient observés pour les AOS ACY + ACE + NO_3 avec des composés essentiellement en O2 à O4 aussi bien pour les CHO que CHON. Les AOS NAPH + NO_3 étaient plus oxygénés avec des composés allant de O2 à O6 pour les CHO et jusqu'à O8 pour les composés CHONO. En condition de réactivité OH, les AOS NAPH étaient plus oxygénés qu'en réactivité avec NO_3 avec des composés CHO monomères majoritaires en O2 à O8 et des dimères CHO en O4 à O9. En présence de NO_x, le nombre d'oxygènes associés aux composés constitutifs des AOS était accru avec des monomères CHO en O2 à O8, des dimères CHNO en O4 à O10, des monomères CHON en C12 de O6 à O8 et des oligomères CHONO en O6 à O9. A partir du mélange NAPH + phénol + OH ou seul, phénol + OH, les AOS formés, aussi bien pour les monomères que pour les oligomères et les dimères, les composés CHO majoritaires étaient en O2 à O9.

Ainsi, les conditions de réactivité, les précurseurs initiaux et les mécanismes réactionnels mis en jeu ont eu un impact sur la composition chimique des AOS formés notamment en termes de degré d'oxydation, en lien avec le nombre d'atomes d'oxygène en présence, et de formation de composés nitro-organiques. Ces différences de composition chimique des AOS ont eu un impact sur les effets biologiques observés.

4.3.4. Déposition des particules d'AOS sur les cellules

Outre la composition chimique des particules d'AOS, la dose déposée à la surface cellulaire constitue un paramètre déterminant dans l'interprétation des effets biologiques observés. Compte tenu des tailles mesurées pour les particules d'AOS générées avec des modes compris entre environ 58 nm à 280 nm en diamètre aérodynamique (Figure 4. 14.), l'impaction inertielle a pu être considérée comme négligeable et la sédimentation était très limitée. Ainsi, la diffusion constitue le mécanisme dominant de déposition (Figure 4. 18.). Au global, l'efficacité de déposition moyenne sur la gamme de taille de particules d'AOS générée était de l'ordre de 5 à 10 % et était similaire quel que soit le type d'AOS considéré.

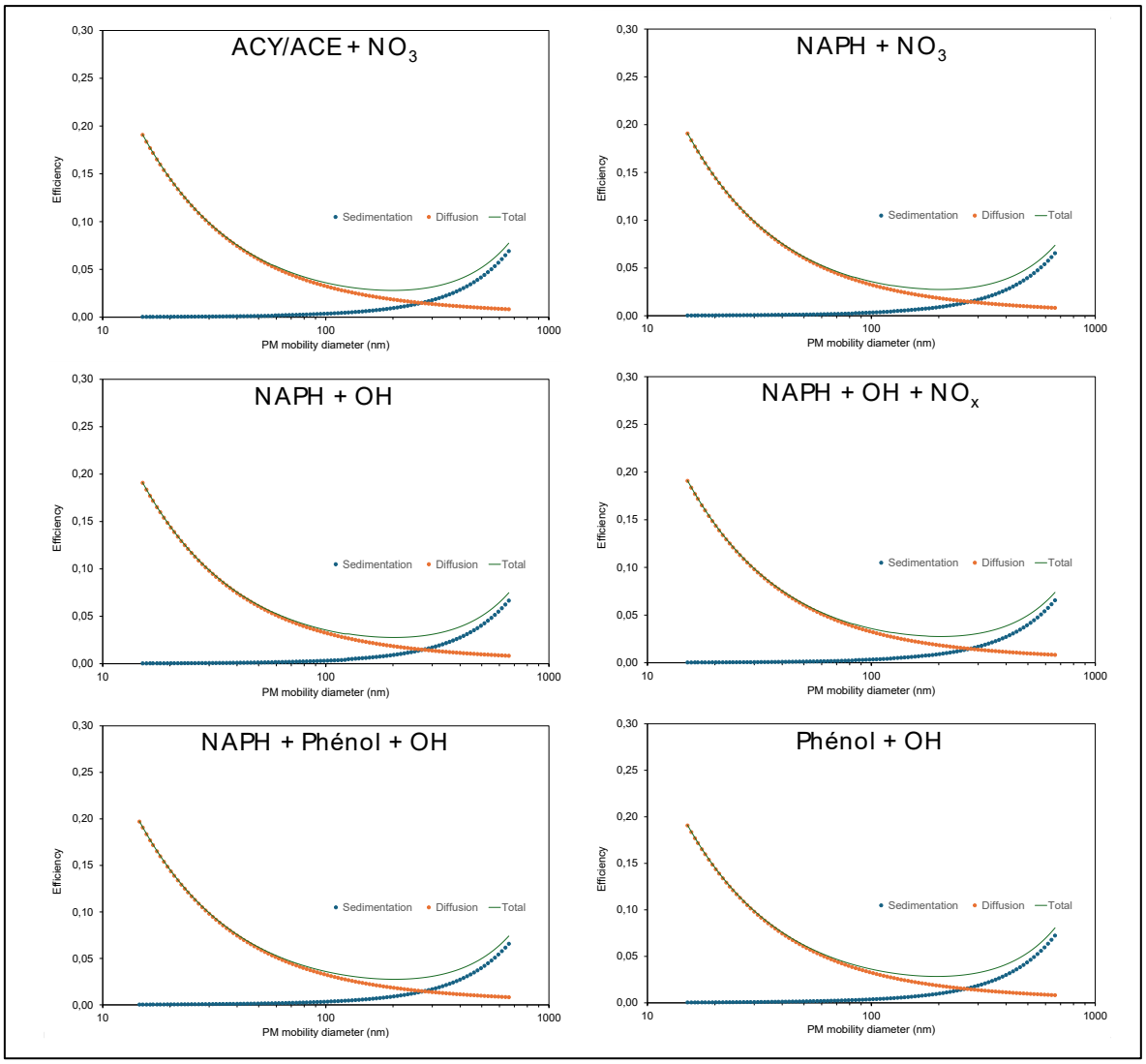


Figure 4. 18. : Courbes d'efficacité de déposition des particules d'AOS HAP et phénol, seuls ou en mélange, sur le tapis cellulaire pour les différents mécanismes physiques selon la taille des particules (diamètre de mobilité) : sédimentation en bleu, diffusion en orange et efficacité de déposition totale en vert.

A partir de ces résultats, la dose déposée a pu être déterminée (voir section 3.3.5.). Les quantités finales déposées pour chaque condition expérimentale sont présentées dans le Tableau 4. 4. Il convient toutefois de souligner que cette approche a uniquement permis d'estimer la fraction particulaire déposée à la surface cellulaire, la contribution de la fraction gazeuse n'ayant pas été prise en compte. Cette estimation ne permet pas non plus de distinguer la quantité de particules restées à la surface de celles internalisées ou ayant traversées les cellules.

Tableau 4. 4. : Masse de particules déposée sur le tapis cellulaire en µg selon les conditions de génération des AOS à partir de l'oxydation des HAP et phénol, seuls ou en mélange, en conditions diurne (radical OH) et nocturne (radical NO_3).

COVs	Oxydants	Ajout de NO_x	Exposition 24 h		Exposition 72 h	
			µg	ng/cm²	µg	ng/cm²
ACY + ACE	NO_3		0,18-0,24	39-50	0,39	84
NAPH	NO_3		0,16-0,16	33-35	-	-
NAPH	OH		0,11-0,21	24-46	0,33	70
NAPH	OH	X	0,10-0,11	21-23	-	-
NAPH + Phénol	OH		0,09-0,11	20-24	0,28	59
Phénol	OH		0,10-0,12	21-25	-	-

La quantité de particules déposées était en lien avec leur diamètre, les concentrations atmosphériques en AOS générées et la durée d'exposition des cellules en ALI. Ainsi, si les quantités de particules d'AOS déposées étaient similaires pour toutes les expérimentations avec le radical OH (sauf un essai avec NAPH + OH), elles étaient jusqu'à deux fois plus importantes lors des expérimentations avec le radical NO_3 notamment pour les essais avec ACY + ACE + NO_3. Après 72 h d'exposition, les quantités déposées étaient logiquement trois fois plus importantes qu'après 24 h d'exposition. Ces différentes conditions sont à considérer lors de l'interprétation des résultats biologiques.

Pour les expositions de 24 h, les masses totales déposées, étant de l'ordre de 20 à 50 ng/cm^2 étaient comparables avec les études toxicologiques menées en laboratoire sur les AOS (Tableau 2.3) (Offer, Hartner, Di Bucchianico, et al., 2022; Pardo et al., 2022; Offer et al., 2024). Elles restaient cependant environ trois ordres de grandeur plus importantes que les doses rapportées lors d'expositions en air ambiant (10^{-2} ng/cm^2, 24 h d'exposition en air ambiant urbain à Rome en hiver). Cependant, même avec les valeurs absolues, la distribution de la masse de particules par unité de surface (µg cm^{-2}) (Figure 4. 19.) est similaire à celle rapportée dans la littérature au niveau de la région alvéolaire. La gamme de taille des particules couverte se recouvre avec celle retrouvée à partir de simulations de la déposition dans la région alvéolaire humaine des particules d'air ambiant (Rome, hiver) en utilisant le modèle *Multiple-Path Particle Dosimetry* (MPPD) (Asgharian et al., 2001; Gualtieri et al., 2018).

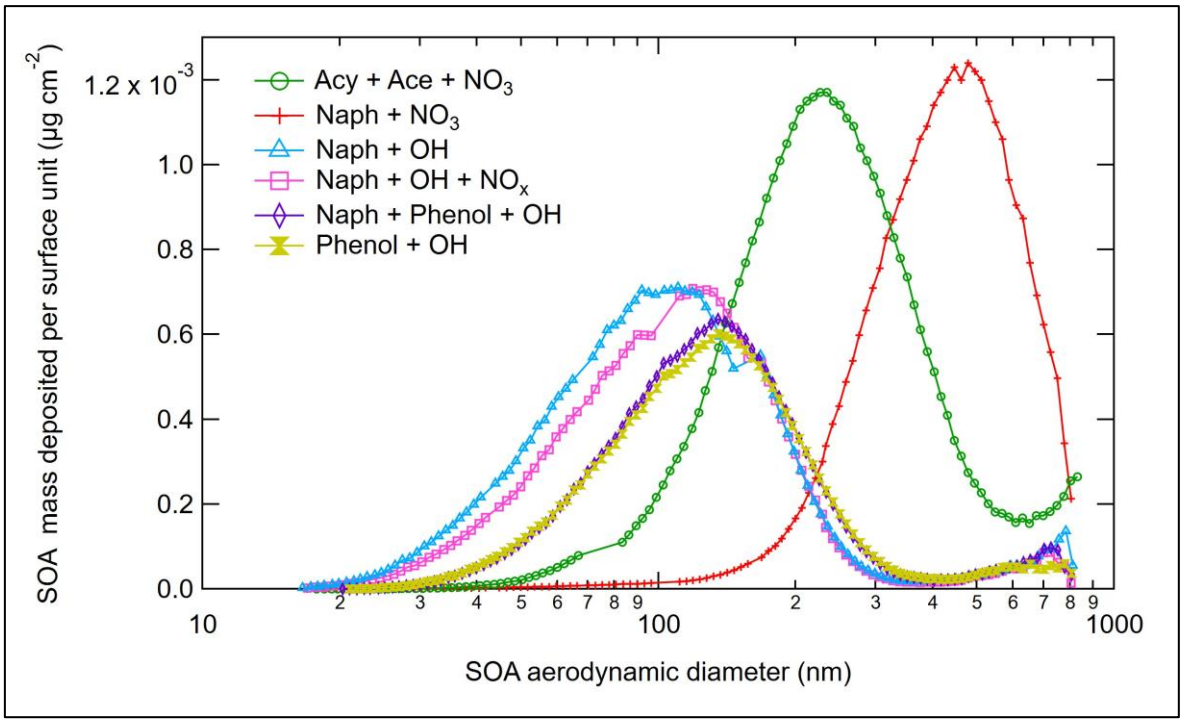


Figure 4. 19. : Distribution de la masse de particules par unité de surface (µg cm^{-2}) d'AOS HAP et phénol, seuls ou en mélange, déposée sur le tapis cellulaire selon leur diamètre aérodynamique (exposition de 24 h en ALI).

4.3.5. Evaluation des réponses toxicologiques selon le type d'AOS et les conditions expérimentales

Suite à l'exposition ALI du modèle de coculture aux AOS générés, l'intégrité du tapis cellulaire, la viabilité, les réponses (pro)-inflammatoires et les altérations lysosomales ont été étudiées. Cette approche intégrée a permis d'évaluer de manière cohérente les effets précoces induits par les particules d'AOS présentant des signatures physico-chimiques contrastées, notamment en termes de taille, de morphologie, d'état physique, de quantité déposée et de composition chimique.

L'observation morphologique du tapis cellulaire après 24 h d'exposition a permis d'évaluer l'intégrité structurale de la coculture dans les différentes conditions expérimentales (Figure 4. 20.).

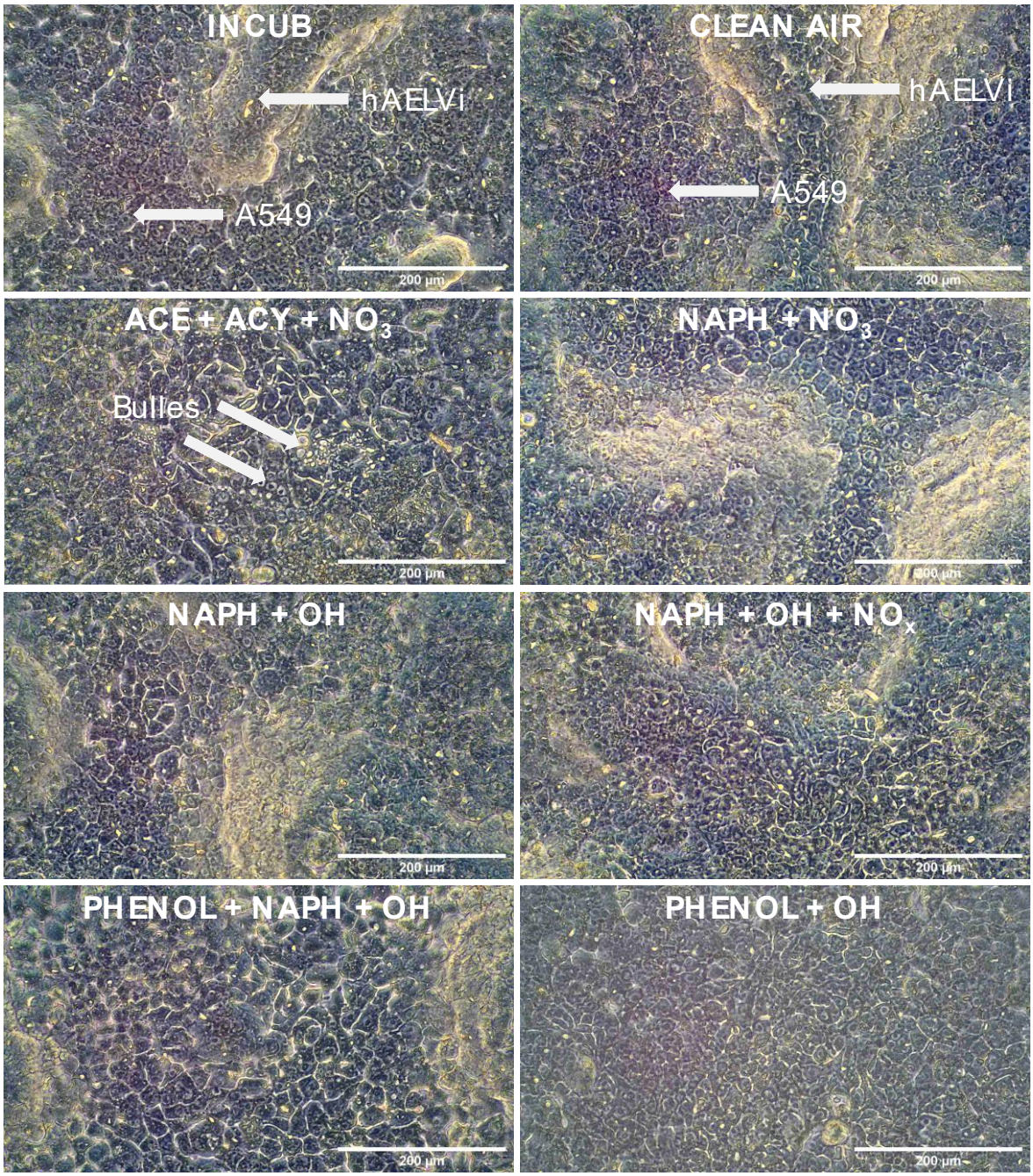


Figure 4. 20. : Morphologie de la coculture maintenue à l'incubateur (INCUB), exposée 24 h à de l'air propre (CT AIR) ou aux AOS générés à partir de l'oxydation de HAP et phénol, seuls ou en mélange, en conditions de réactivité diurne (oxydant OH) et nocturne (oxydant NO_3), ou exposée à de l'air propre (CT AIR), ou maintenue à l'incubateur (INCUB). Images représentatives acquises au grossissement ×200. Barre d'échelle : 200 µm.

Dans les conditions témoins (CT INCUB et CT AIR), le tapis cellulaire apparaissait homogène, confluent et morphologiquement stable, avec une distinction nette entre les

regroupements de cellules A549 et de cellules hAELVi. L'absence de décollement cellulaire ou de perte de confluence a indiqué que les expositions aux AOS n'avaient pas induit de cytotoxicité massive ou de dommages structuraux majeurs. Toutefois, plusieurs modifications morphologiques subtiles ont été observées selon les conditions d'expositions. La présence de structures bullaires après une exposition aux AOS ACY + ACE + NO_3 a suggéré une activité membranaire importante associée à des phénomènes d'exocytoses ou à des mécanismes de stress membranaire.

Afin de vérifier si l'intégrité fonctionnelle du tapis cellulaire n'était pas modifiée, la TEER ainsi que la perméabilité ont été mesurées (Figure 4. 21.).

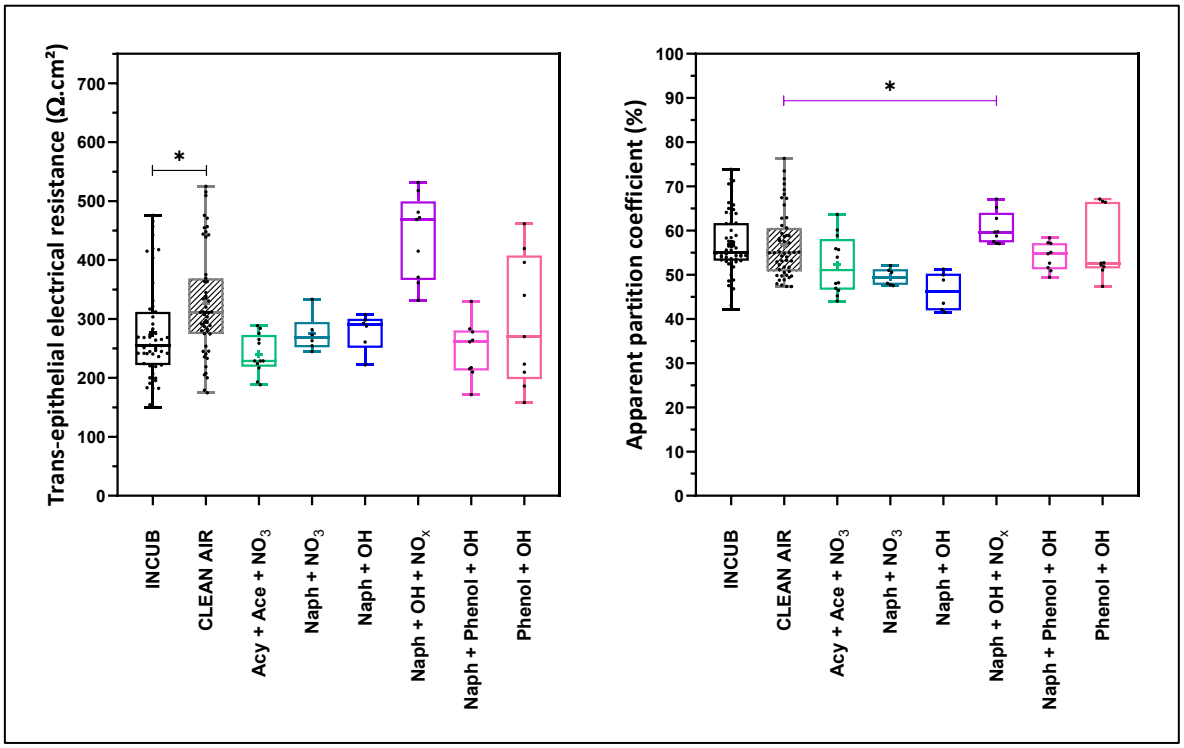


Figure 4. 21. : Evaluation de l'intégrité de la barrière épithéliale de la coculture maintenue à l'incubateur (INCUB), exposée 24 h à de l'air propre (CLEAN AIR) ou aux AOS générés à partir de l'oxydation de HAP et phénol, seuls ou en mélange, en conditions de réactivité diurne (oxydant OH) et nocturne (oxydant NO_3). A gauche, mesure de la TEER ; à droite mesure de la perméabilité. Les données pour chaque condition d'AOS sont issues de trois expériences indépendantes (n = 6) (*p < 0,01 ; **p < 0,001 ; ***p < 0,0001). Les comparaisons statistiques ont été réalisées entre chaque condition AOS et les CT AIR correspondant à la même expérience.

Vis-à-vis des CT AIR, l'exposition aux différents AOS n'a pas induit de variation significative de la TEER, suggérant une absence d'altération globale de l'intégrité épithéliale. Toutefois, l'évaluation de la perméabilité a révélé une augmentation significative spécifique à la condition NAPH + OH + NO_x, indiquant une altération fonctionnelle de l'intégrité de la barrière épithéliale. Cette observation suggérait une perturbation ciblée des jonction cellulaires, possiblement liée à la présence de NO_x et donc avec les espèces chimiques formées à partir du NAPH dans ces conditions.

Pour déterminer si ces altérations fonctionnelles s'accompagnent d'une cytotoxicité, la libération de LDH ainsi que l'activité métabolique cellulaire ont été quantifiées (Figure 4. 22).

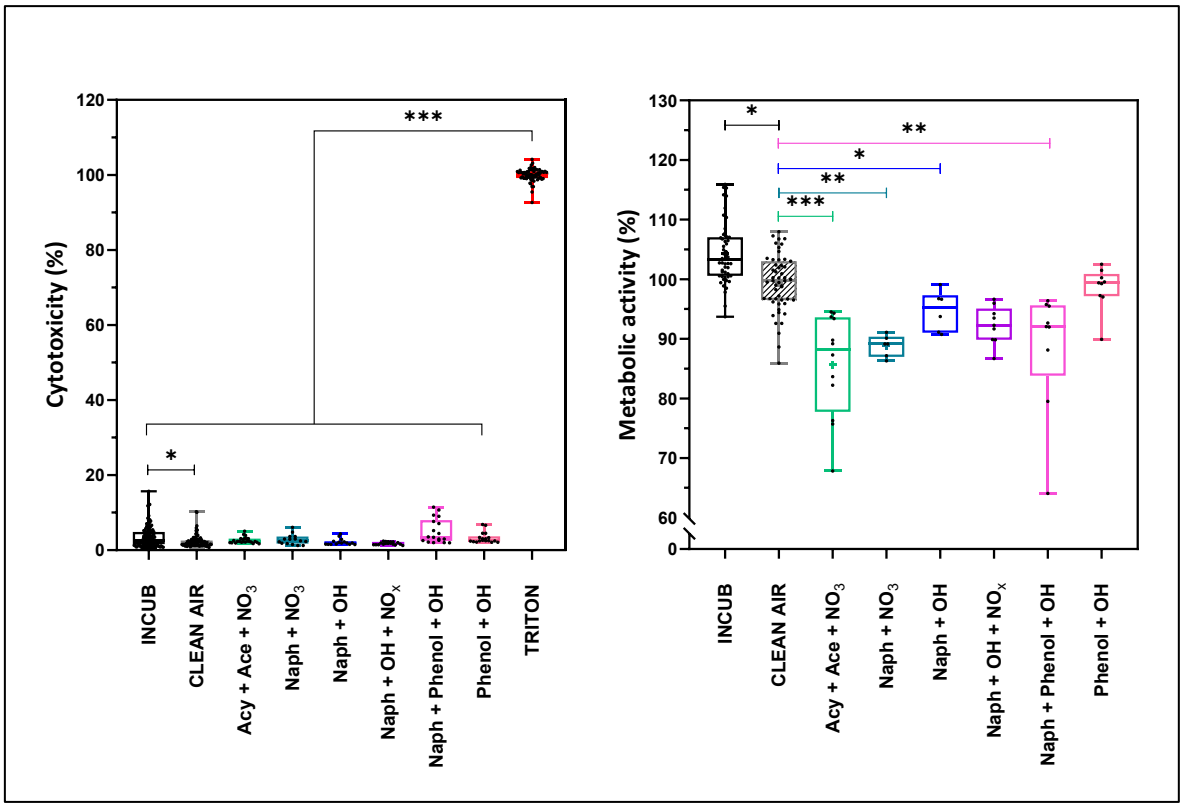


Figure 4. 22. : Cytotoxicité, Activité métabolique de la coculture maintenue à l'incubateur (INCUB), exposée 24 h à de l'air propre (CLEAN AIR) ou aux AOS générés à partir de l'oxydation de HAP et phénol, seuls ou en mélange, en conditions de réactivité diurne (oxydant OH) et nocturne (oxydant NO_3). A gauche, évaluation des altérations de la membrane cellulaire par dosage de la lactate déshydrogénase (LDH). Les données sont exprimées en pourcentage du contrôle positif. A droite, évaluation de l'activité métabolique cellulaire par le test PrestoBlue™. Les données sont exprimées en pourcentage du contrôle négatif INCUB de chaque condition. Les données pour chaque condition d'AOS sont issues de trois expériences indépendantes (n = 6) (*p < 0,01 ; **p < 0,001 ; ***p < 0,0001). Les comparaisons statistiques ont été réalisées entre chaque condition AOS et les CT AIR correspondant à la même expérience.

L'exposition aux AOS n'entraînait aucune augmentation significative des niveaux de LDH extracellulaires, confirmant l'absence de pertes majeures de la perméabilité et de l'intégrité membranaire. En revanche, l'activité métabolique révélait des effets dépendants du type d'AOS. Une diminution significative de l'activité métabolique était observée pour plusieurs conditions, notamment ACE + ACY + NO_3 (p = 0,0005), NAPH + NO_3 (p = 0,005),

NAPH + OH (p = 0,05) et NAPH + Phénol + OH (p = 000,5), suggérant une perturbation métabolique cellulaire.

Les AOS issus de processus de réactivité nocturne (radical NO_3) semblaient induire des effets plus marqués que ceux issus des processus de réactivité diurne (radical OH), suggérant une influence des conditions d'oxydation sur la toxicité biologique. Cette tendance pourrait être liée aux particules de plus grande taille formées et déposées favorisant des interactions membranaires prolongées et des réponses cellulaires soutenues. Les conditions expérimentales, avec des quantités de particules déposées plus importantes et la présence accrue d'acide nitrique (HNO_3) qu'en condition de réactivité OH (Tableaux 4. 3. et 4. 4.), pourraient aussi être à l'origine de cette toxicité. L'absence d'effet notable pour le phénol seul indiquait que la nature du précurseur initial, et donc la composition chimique des AOS résultant, jouait un rôle déterminant dans la toxicité observée. De même, malgré l'augmentation de la perméabilité précédemment mise en évidence, aucune variation de l'activité métabolique n'a été observée pour la condition NAPH + OH + NO_x. Cette dissociation entre altération de la barrière épithéliale et maintien de l'activité métabolique a suggéré que ces AOS pourraient cibler préférentiellement les mécanismes d'adhérence cellulaire ou les jonctions intercellulaires, sans induire de cytotoxicité globale.

Dans l'ensemble, bien que les effets cytotoxiques aigus apparaissent limités, les altérations métaboliques et fonctionnelles observées ont supporté l'activation de réponses cellulaires adaptatives dépendantes du type d'AOS, compatibles avec des mécanismes de toxicité sublétale plutôt que des effets cytotoxiques massifs.

L'induction d'une réponse inflammatoire a été évaluée par la quantification des cytokines pro-inflammatoires IL-1β, IL-6, IL-8 et TNF-α sécrétées au niveau apical (Figure 4. 23.).

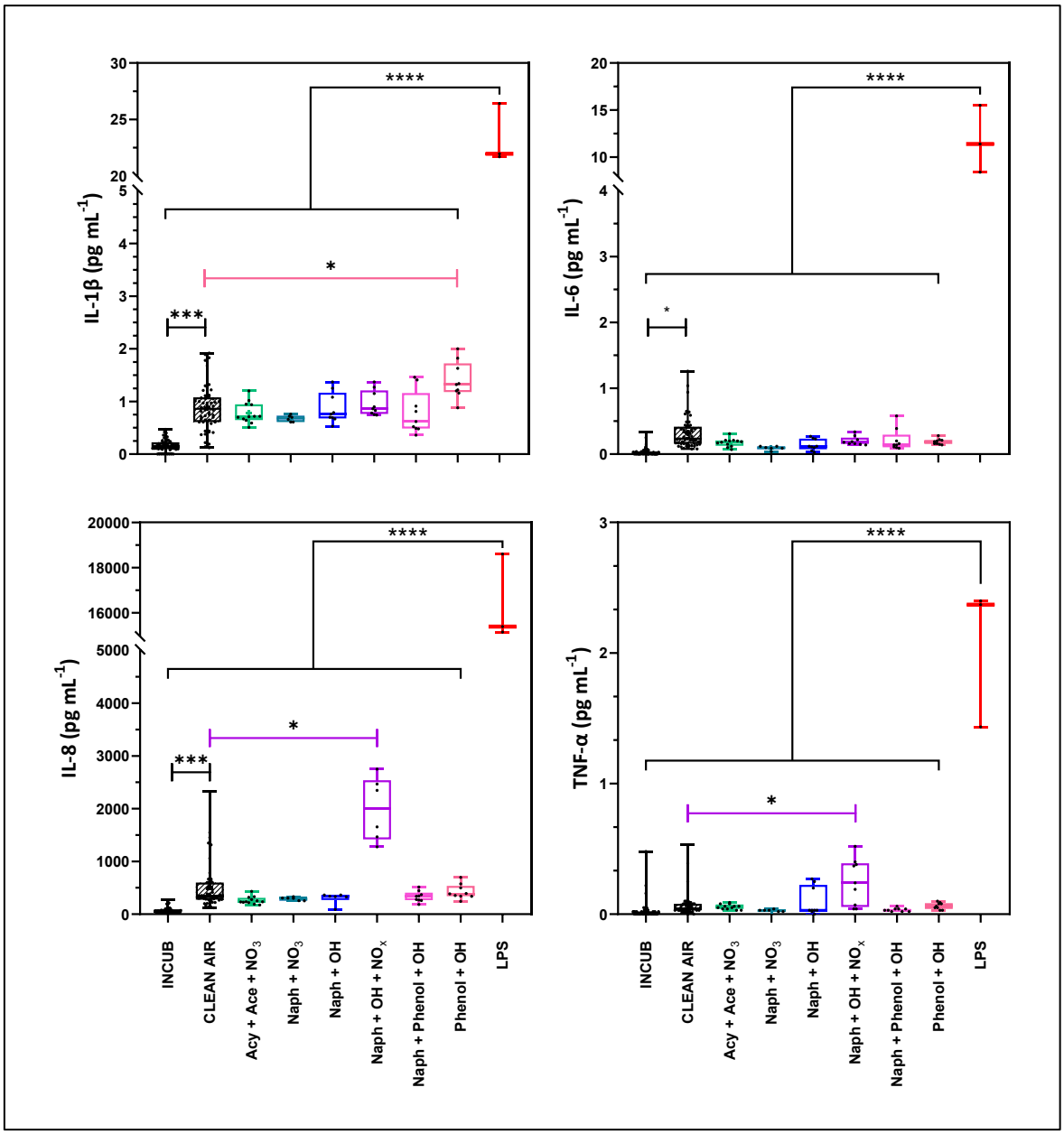


Figure 4. 23. : Dosage des niveaux de sécrétion des cytokines (pro)-inflammatoires interleukine 1β (IL-1β), interleukine 6 (IL-6), interleukine 8 (IL-8), tumor necrosis factor α (TNF-α) de la coculture maintenue à l'incubateur (INCUB), exposée 24 h à de l'air propre (CLEAN AIR) ou aux AOS générés à partir de l'oxydation de HAP et phénol, seuls ou en mélange, en conditions de réactivité diurne (oxydant OH) et nocturne (oxydant NO_3). Les données pour chaque condition d'AOS sont issues de trois expériences indépendantes (n = 6) (*p < 0,01 ; **p < 0,001 ; ***p < 0,0001). Les comparaisons statistiques ont été réalisées entre chaque condition AOS et les CT AIR correspondant à la même expérience.

Outre l'effet basal induit par le flux d'air seul comme indiqué précédemment (section 4.2), seules deux conditions d'exposition aux AOS induisaient une réponse (pro)-inflammatoire marquée. Une augmentation significative des niveaux de sécrétion d'IL-1β était observée pour la condition phénol + OH (p = 0,05), suggérant l'activation précoce de mécanismes inflammatoires intracellulaires. Ce profil est compatible avec une activation de l'inflammasome qui pourrait être favorisée par les particules de faible diamètre et non sphériques (Limbach et al., 2005; Rabolli et al., 2016; Baranov et al., 2020). Dans le cas de particules d'AOS phénol + OH, étant certainement liquides, une fois déposée à la surface des cellules, elles ne devaient pas garder leur forme initiale. Par ailleurs, la condition NAPH + OH + NO_x a induit une augmentation significative des niveaux d'IL-8 et de TNF-α, indiquant une réponse inflammatoire plus avancée. Cette observation était cohérente avec l'augmentation de la perméabilité épithéliale observée pour cette condition, suggérant une réponse inflammatoire associée à une altération des jonctions cellulaires et à une réorganisation du cytosquelette. N'étant pas observée pour les conditions NAPH + OH et NAPH + NO_3, la différence est certainement liée à la présence de composés organiques nitrés dérivés du naphtalène et notamment de dimères CHNO (voir section 4.3.3, Figures 4.16 et 4.17).

Afin d'explorer d'éventuelles modifications des compartiments intracellulaires, une coloration à la quinacrine a été réalisée pour évaluer l'intégrité et l'activité des compartiments acides intracellulaires (lysosome et vésicules) (Figure 4. 24.).

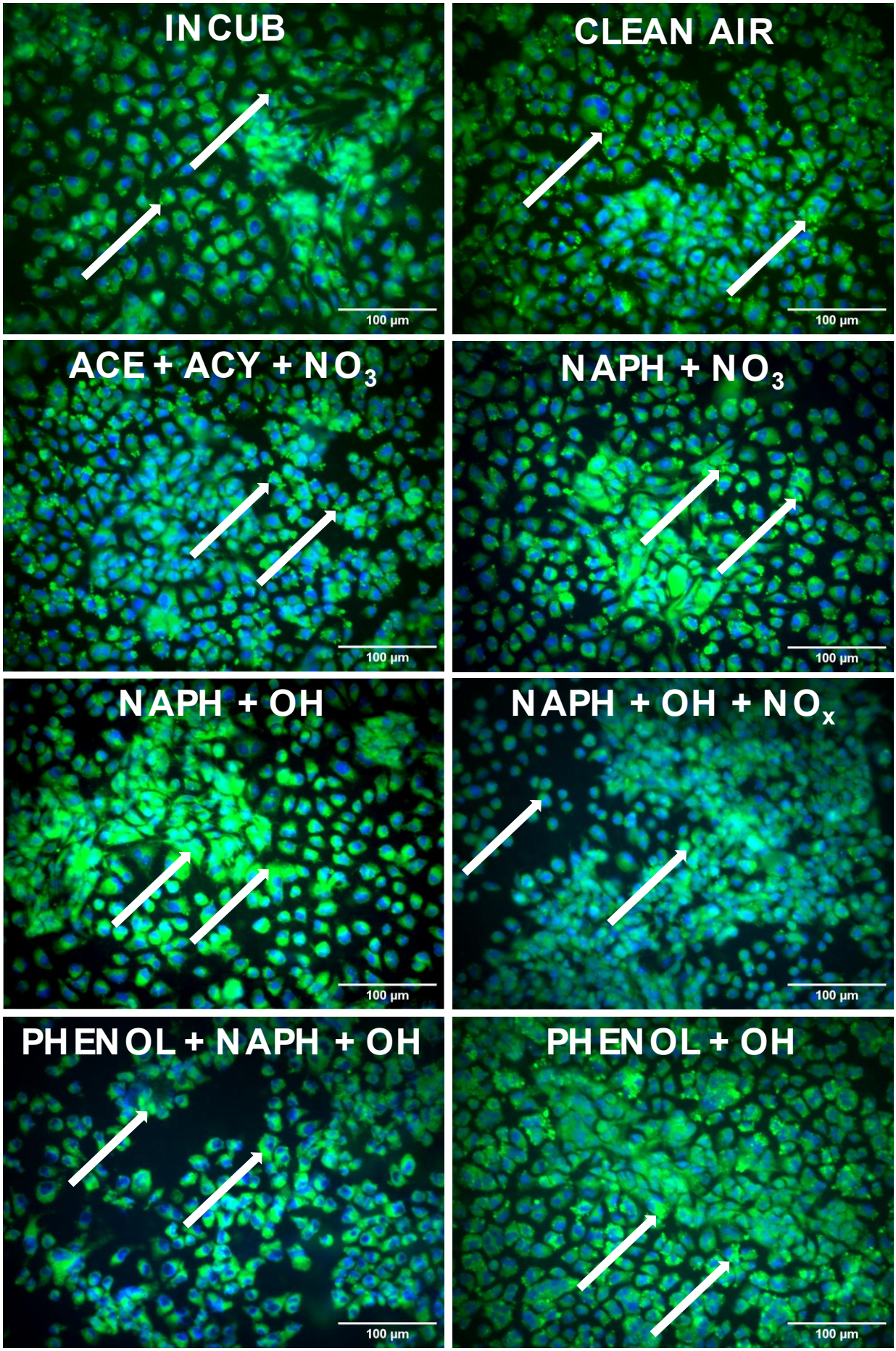

INCUB
100 µm
CLEAN AIR
100 µm
ACE + ACY + NO3
100 µm
NAPH + NO3
100 µm
NAPH + OH
100 µm
NAPH + OH + NOx
100 µm
PHENOL + NAPH + OH
100 µm
PHENOL + OH
100 µm

Figure 4. 24. : Comparaison des compartiments acides (vésicules et lysosomes) par coloration à la quinacrine de la coculture maintenue à l'incubateur (INCUB), exposée 24 h à de l'air propre (CT AIR) ou aux AOS générés à partir de l'oxydation de HAP et phénol, seuls ou en mélange, en conditions de réactivité diurne (oxydant OH) et nocturne (oxydant NO_3). Microscopie à épifluorescence avec coloration des vésicules (quinacrine, vert) et des noyaux (DAPI, bleu), grossissement ×200. Barre d'échelle : 100 µm). Les flèches blanches montrent les vésicules et les accumulations de marqueurs en accord avec l'analyse qui suit pour chaque condition.

L'exposition au flux d'air seul induisait une augmentation apparente de l'intensité et de la taille des vésicules fluorescentes, suggérant une activation modérée du trafic vésiculaire ou de l'activité lysosomale, en accord avec les adaptations structurales précédemment observées (section 4.2.).

Des modifications plus marquées étaient observées après exposition à certains AOS. Les AOS ACY + ACE + NO_3 et NAPH + NO_3 induisaient l'apparition de vésicules fortement fluorescentes en périphérie membranaire, suggérant une accumulation importante de vésicules intracellulaires. Ce profil était compatible avec des mécanismes de piégeage intracellulaire ou de surcharge lysosomale, possiblement entraînés par des particules d'AOS présentant des propriétés chimiques favorisant l'accumulation protonique ou une amino-fonctionnalisation connue pour favoriser la déstabilisation lysosomale (Lunov et al., 2011; Sandberg et al., 2012). Pour les autres conditions AOS NAPH, une fluorescence plus diffuse était observée, associée à l'absence de vésicules en périphérie de la membrane. Enfin, les AOS phénol + OH montraient une accumulation excessive de vésicules au niveau du pôle apical des cellules. La connaissance des mécanismes liés aux observations réalisées pour ces AOS a conforté l'hypothèse de l'activation de l'inflammasome souvent associée à une déstabilisation lysosomale (Lunov et al., 2011; Sandberg et al., 2012; Rabolli et al., 2016).

Compte tenu du caractère hautement oxydé des AOS et des modifications de l'activité lysosomale précédemment observées par coloration à la quinacrine, une évaluation ciblée du stress oxydant a été réalisée (Figure 4. 25.).

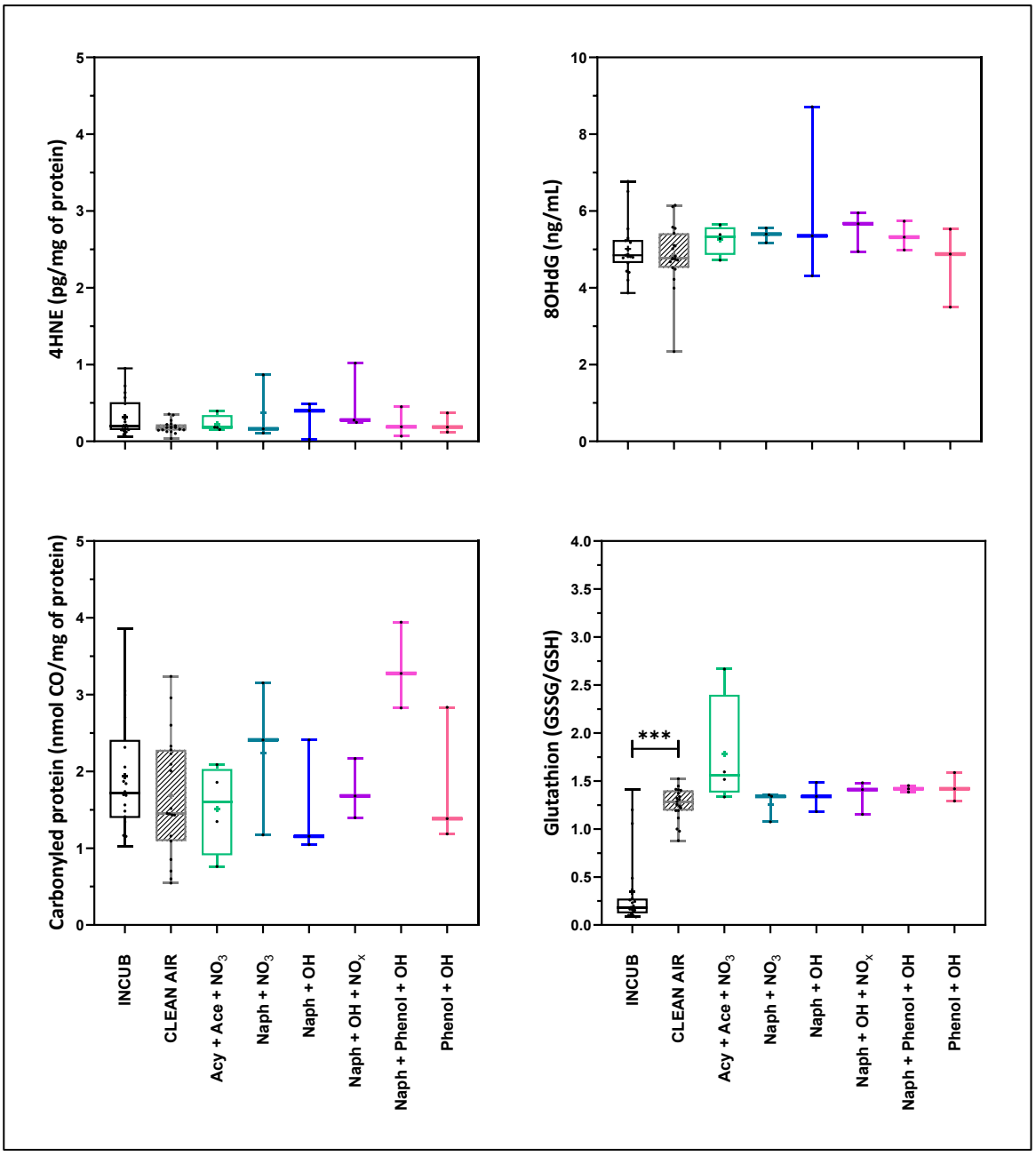


Figure 4. 25. : Evaluation du stress oxydant produit lorsque la coculture était maintenue à l'incubateur (INCUB), exposée 24 h à de l'air propre (CLEAN AIR) ou aux AOS générés à partir de l'oxydation de HAP et phénol, seuls ou en mélange, en conditions de réactivité diurne (oxydant OH) et nocturne (oxydant NO_3). Les marqueurs analysés incluent la peroxydation lipidique (4-HNE), les dommages oxydatifs à l'ADN (8-OHdG), les protéines carbonylées (carbonylated proteins) et le ratio entre le glutathion oxydé et réduit (GSSG/GSH). Les données pour chaque condition d'AOS sont issues de trois expériences indépendantes (n = 6) (*p < 0,01 ; **p < 0,001 ; ***p < 0,0001). Les comparaisons statistiques ont été réalisées entre chaque condition AOS et les CT AIR correspondant à la même expérience.

L'analyse de plusieurs biomarqueurs complémentaires, relatifs au stress oxydant, montre que les niveaux de 4-HNE et de 8-OHdG, respectivement associés aux dommages lipidiques et à l'oxydation de l'ADN, ne présentent pas d'augmentation significative après exposition. De même, les protéines carbonylées ne montrent pas de variations significatives, bien qu'une tendance à l'augmentation soit observée pour les AOS NAPH + phénol + OH. Il en va de même pour l'analyse du ratio GSSG/GSH, aucune différence significatives n'est observées entre les AOS et les CLEAN AIR, malgré une forte tendance à l'augmentation pour la condition ACY +ACE + NO_3. Cependant, une augmentation significative du ration GSSG/GSH est observable entre les conditions contrôle traduisant une mobilisation du système redox cellulaire à la suite d'une exposition ALI de 24 h. Ainsi, l'absence de dommages oxydatifs et de mécanismes de défense antioxydante détectables suggèrent que ces niveaux de concentrations d'AOS ne déclenchent pas de stress oxydant.

4.3.6. Liens entre les caractéristiques physico-chimiques des AOS générés et leurs effets toxicologiques induits

Les réponses biologiques observées ont montré également une dépendance des effets cellulaires aux caractéristiques physico-chimiques des AOS générés en lien avec la nature des précurseurs et les conditions de réactivité. Ainsi, la toxicité des AOS HAP et phénol ne repose pas uniquement sur la quantité de particules déposées, mais également sur leurs propriétés intrinsèques susceptibles de moduler leur interaction avec les cellules épithéliales alvéolaires.

Les AOS issus du NAPH et générés en présence de NO_x ont induit un profil distinct caractérisé par un maintien de l'activité métabolique conjugué à une altération ciblée de la fonction barrière épithéliale (Figure 4. 21.) associée à une réponse inflammatoire avancée (IL-8, TNF-α) (Figure 4. 23.). Ces effets sembleraient plutôt compatibles avec une toxicité ciblant préférentiellement les jonctions intercellulaires et les mécanismes d'adhérence cellulaire. Ces effets n'ont pas été observés dans le cas des AOS NAPH + OH et NAPH + NO_3 malgré les quantités déposées et taille de particules plus importantes pour ces derniers. Les trois conditions de génération du NAPH influence leur différence de composition chimique où, par exemple, dans le cas des AOS NAPH + NO_X + OH les composés associés sont fortement oxygénés (jusqu'à O9-O10) et nitrés (Figure 4. 16.). En effet, des composés aussi

oxygénés et nitrés n'ont pas été observés pour les AOS NAPH + OH et NAPH + NO_3. Plusieurs études toxicologiques ont déjà démontré le fort potentiel inflammatoire des AOS issus de l'oxydation avec OH du NAPH (doses comparables en ALI, lignées cellulaires A549, EA.hy926, BEAS-2B) notamment via une libération significative de cytokines pro-inflammatoires telles que TNF-α et IL-8 (Offer et al., 2022; Pardo et al., 2022) et d'autant plus en présence de NO_x à partir d'extraits de particules avec lignées cellulaires MH-S, ATCC®CRL-2019™ (Tuet et al., 2017). Ainsi les réponses inflammatoires et la dysfonction épithéliale observées pour NAPH + NO_x +OH sont probablement intimement liées à ces composés fortement oxygénés et notamment nitrés.

Plus généralement, les AOS NAPH + OH (avec ou sans NO_x) ont provoqué une diminution de l'activité métabolique potentiellement liée à un impact mitochondrial (Figure 4. 22.). D'autres travaux ont déjà rapporté pour des AOS NAPH + OH (à partir d'extraits de particules, lignées cellulaires BEAS-2B, MH-S, ATCC®CRL-2019™, HepG2) une cytotoxicité importante associée à l'activation de voies de signalisation redox-sensibles telles que NRF2, AhR et MAPK, ainsi qu'à des dommages mitochondriaux et des effets génotoxiques (Han et al., 2020; Liu, Xu, et al., 2023; El Mais et al., 2025).

De façon très semblable, les AOS NAPH + NO_3 et ACY + ACE + NO_3 ont induit d'importantes altérations métaboliques associées à une accumulation intracellulaire de compartiments acides (vésicules) en périphérie des membranes cellulaires suggérant des mécanismes d'adaptation ou de stress chronique (Figures 4. 22. et 4. 24.). Dans ces conditions, aucun signal inflammatoire n'a été détecté. Il est difficile de relier ces réponses spécifiques aux caractéristiques chimiques de ces AOS en comparaison des autres conditions testées. La présence de composés nitro-organiques relativement importante (Figures 4. 16. et 4. 17.), associée à un pH probablement plus acides des particules étant donné les concentrations en acide nitrique de ces conditions (Tableau 4. 4.) ont pu jouer un rôle important sur les effets observés.

De plus, pour ces conditions, AOS NAPH + NO_3 et ACY + ACE + NO_3, les quantités de particules étaient plus importantes que les pour les autres, et ces particules étaient également plus grosses avec des modes principaux vers 280 et 150 nm (Figures 4. 14. et 4. 19.). Par comparaison, une induction spécifique d'IL-1β (Figure 4. 23.), ainsi qu'une

accumulation de vésicules acides péri-membranaire suggérant une déstabilisation lysosomale qui favoriserait l'activation de l'inflammasome (Champion et al., 2008; Champion and Mitragotri, 2009; Lunov et al., 2011; Rabolli et al., 2016), ont été observées pour les AOS phénol + OH constitués de particules plus petites (mode à 70 nm), indiquant l'implication de mécanismes inflammatoires rapides et d'un stress cellulaire bien installé. Ces mécanismes sont potentiellement associés à une diffusion facilitée des particules par leur faible taille et à leur état liquide (Rabolli et al., 2016; Khetan et al., 2019; Baranov et al., 2020). Ces observations ont indiqué que les propriétés physiques des AOS ont influencé directement leur interaction avec les cellules et ont orienté la nature des réponses biologiques déclenchées. Les particules de petite taille liquides (AOS phénol + OH) sont apparues particulièrement susceptibles de diffuser dans les compartiments intracellulaires et d'activer des réponses inflammatoires précoces, tandis que les particules plus grosses et semi-solides (AOS NAPH + NO_3 et ACY + ACE + NO_3) pourraient favoriser des interactions membranaires prolongées et une accumulation intracellulaire délétère même si la composition chimique a pu aussi jouer un rôle comme indiqué auparavant.

Les observations faites pour les AOS phénol + OH étaient également en adéquation avec les résultats rapportés dans la littérature, indiquant que certains produits dérivés du phénol associés aux AOS pourraient déclencher des réponses cellulaires spécifiques indépendantes du seul stress oxydant. Les études disponibles sur la toxicité des AOS phénol + OH (avec et sans NO_x) restent limitées elles indiquent que la production de ROS et la cytotoxicité (à partir d'extraits de particules sur lignée cellulaire A549) associée dépendaient fortement du degré d'oxydation et du vieillissement de l'aérosol. La transformation chimique progressive des AOS pourrait aussi réduire leur potentiel oxydant au cours du temps, bien que des mécanismes alternatifs indépendants du stress oxydant seraient également impliqués dans la cytotoxicité observée (Fang et al., 2024).

Il enfin important de noter qu'en mélange, les AOS NAPH + phénol +OH ont engendré une altération métabolique plus importante que chacun des deux AOS issus de précurseurs seuls (NAPH + OH et phénol + OH) (Figure 4. 22.). Qu'en serait-t-il à partir du vieillissement des émissions réelles de combustion de biomasse ?

4.3.7. Une signature transcriptionnelle globale identifiable des AOS HAP et phénol typiques des AOS de combustion de biomasse ?

4.3.7.1. Stratégie d'analyse mise en œuvre

Compte tenu des effets du flux d'air seul au niveau génique (section 4.2.) combinés au faible nombre d'échantillons par condition expérimentale à la suite du regroupement des ARN (n = 3) (voir section 3.3.6.), la détection de variations transcriptionnelles spécifiques à chaque type d'AOS était inhibée. Néanmoins, les altérations fonctionnelles précédemment observées, incluant des modifications de l'activité métabolique, de l'activité lysosomale, des réponses antioxydantes et de certains médiateurs inflammatoires, suggéraient l'existence de réponses cellulaires mesurables susceptibles d'être détectées à l'échelle transcriptomique. Ainsi, afin d'augmenter la puissance statistique et identifier une signature transcriptionnelle commune relative à l'exposition aux AOS HAP et phénol, les échantillons correspondant aux différents AOS ont été regroupés en une catégorie unique. Cette approche a permis de comparer de manière robuste les conditions CT AIR et AOS dans leur globalité et révéler un ensemble cohérent de gènes différentiellement exprimés caractéristiques de la réponse transcriptionnelle globale induite par les AOS HAP et phénol et donc typique des AOS de combustion de biomasse.

4.3.7.2. Signature transcriptionnelle des AOS HAP et phénol

L'analyse différentielle réalisée entre l'ensemble des conditions CT AIR et l'ensemble de celle AOS a permis d'identifier un total de 826 gènes différentiellement exprimés (*p*-value ajustée < 0,05). Parmi ceux-ci, 92 gènes présentaient une variation d'expression plus marquée (*p*-value ajustée < 0,05 et fold change ≥ 1,5 ou ≤ 1,5), dont 75 gènes surexprimés et 17 sous-exprimés (Figure 4. 26.). Ces gènes sont listés et catégorisés par grandes voies mécanistiques dans l'Annexe 30.

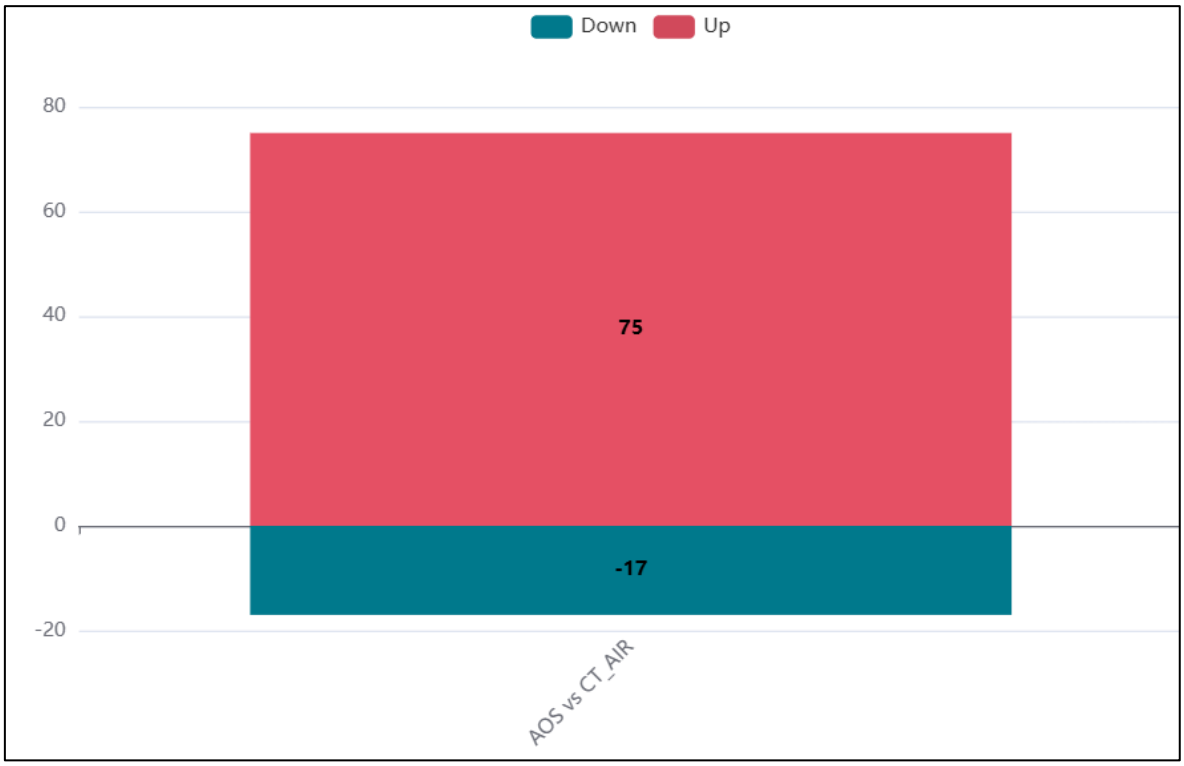


Figure 4. 26. : Nombres de gènes sur- et sous-exprimés entre l'ensemble des CT AIR et l'ensemble des AOS, regroupés en un seul groupe de comparaison. Les gènes considérés comme différentiellement exprimés présentaient une p-value ajustée ≤ 0,05 et un fold change ≥ 1,5 (sur-exprimés) ou ≤ 1,5 (sous-exprimés).

L'analyse hiérarchique des gènes différentiellement exprimés a mis en évidence une séparation nette des échantillons en deux groupes distincts, correspondant respectivement aux conditions CT AIR et AOS (Figure 4. 27.). Hormis un échantillon de chaque condition (n°51 et 41), les profils d'expression observés sont apparus homogènes au sein de chaque groupe, indiquant une réponse transcriptionnelle cohérente entre les différentes expositions aux AOS malgré leurs différentes caractéristiques physico-chimiques.

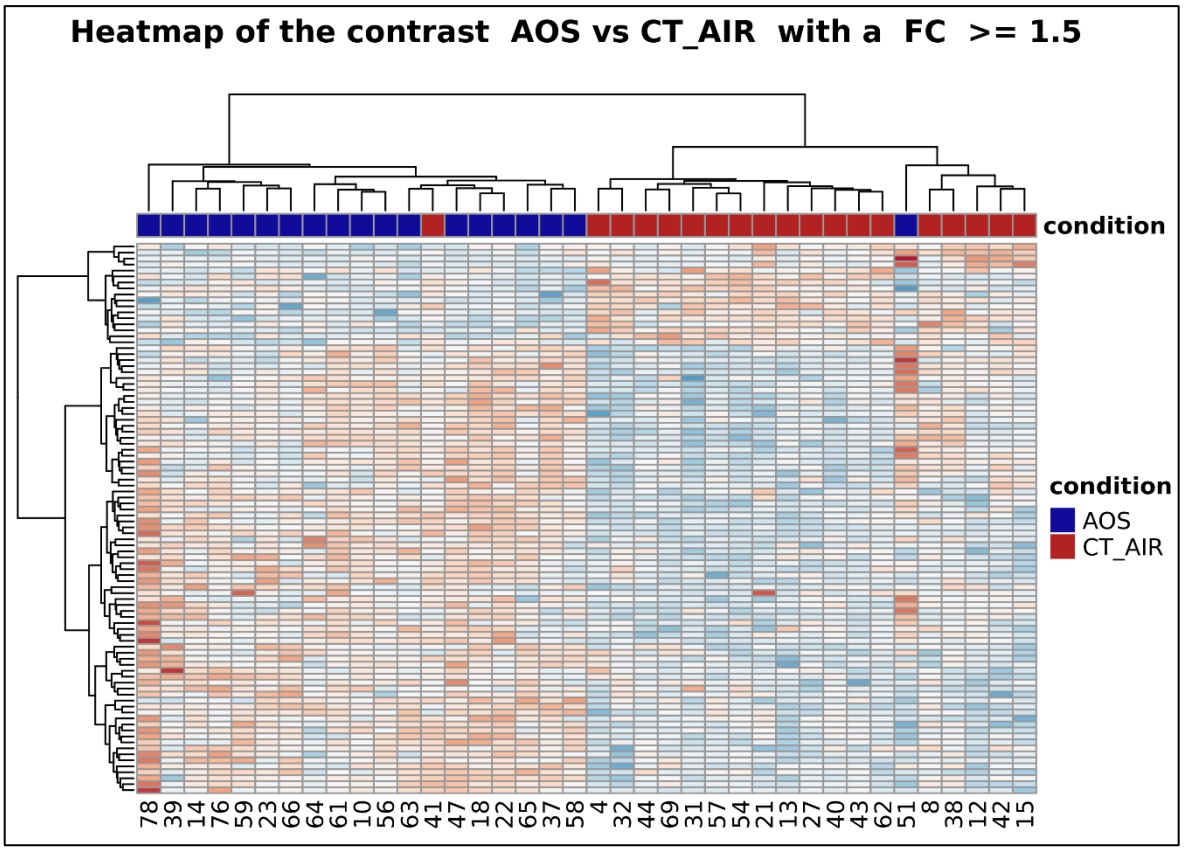


Figure 4. 27. : Représentation sous forme de carte de chaleur (heatmap) de l'ensemble des gènes différentiellement exprimés entre les CT AIR et tous les AOS regroupés en un seul groupe de comparaison. Les gènes inclus dans l'analyse présentent une p-value ajustée ≤ 0,05 et un fold change ≥ 1,5 ou ≤ 1,5. Les niveaux d'expression sont représentés en log2(fold change). Chaque colonne correspond à un échantillon biologique représentant un regroupement de trois répliquats expérimentaux, et chaque ligne correspond à un gène. Les gènes et les échantillons ont été regroupés par regroupement hiérarchique selon leurs profils d'expression. Les couleurs reflètent le niveau relatif d'expression génique, avec une surexpression, et une sous-expression, représentées respectivement par les couleurs rouge et bleu.

L'analyse en composantes principales (ACP) (Figure 4. 28.), a également révélé une séparation claire des échantillons selon les conditions d'exposition. Les échantillons exposés aux AOS étaient regroupés de manière distincte des CT AIR, traduisant une modification globale du transcriptome induite par l'exposition aux AOS HAP et phénol. Les faibles chevauchements observés entre les deux groupes ont suggéré l'existence d'une signature transcriptionnelle spécifique.

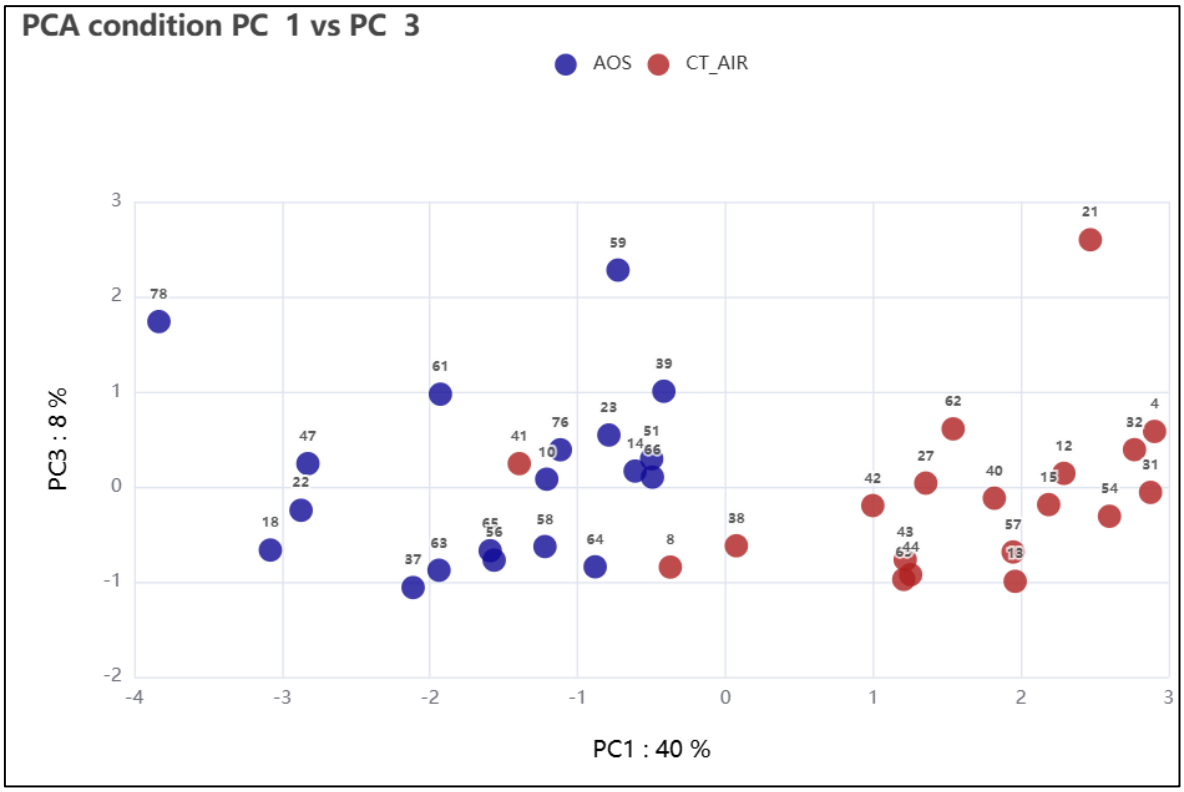


Figure 4. 28. : Analyse en composantes principales (ACP) basée sur les gènes différentiellement exprimés entre les CT AIR et tous les AOS regroupés en un seul groupe de comparaison. Projection des échantillons selon les composantes principales PC1 et PC3. Chaque point correspond à un échantillon biologique représentant un regroupement de trois répliquats expérimentaux. Les distances entre les points reflètent la similarité globale des profils d'expression génique.

4.3.7.3. Gènes majoritairement dérégulés

L'analyse des gènes les plus dérégulés (Figure 4. 29., Tableaux 4. 5. et 4. 6.) a mis en évidence une signature transcriptionnelle spécifique à l'ensemble des AOS HAP et phénol. Celle-ci était dominée par des mécanismes d'adaptation face à la surproduction de ROS, de reprogrammation métabolique et de remodelage cellulaire, généralement spécifiquement associés à une toxicité liée à des composés organiques oxydés.

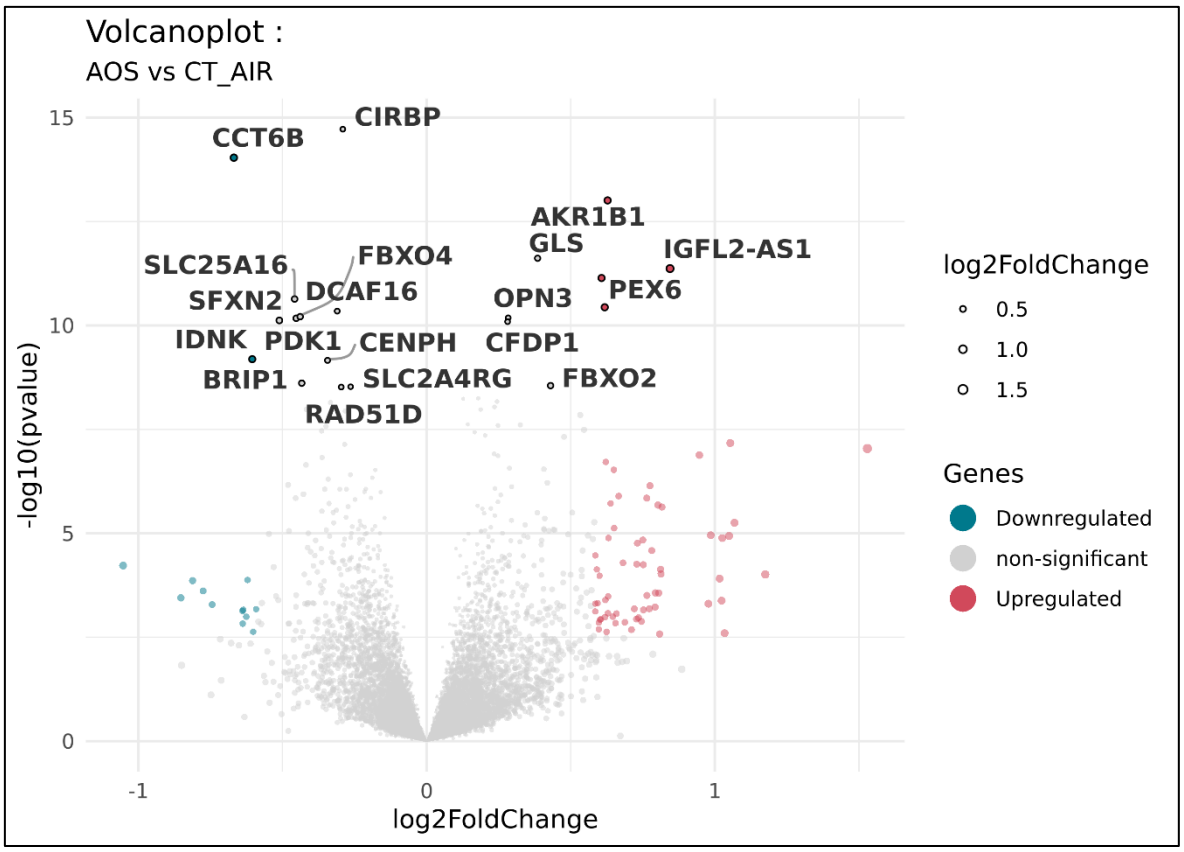


Figure 4. 29. : Représentation en diagramme de volcan (volcano plot) des gènes différentiellement exprimés entre les CT AIR et tous les AOS regroupés en un seul groupe de comparaison. Les gènes sont filtrés selon un seuil de significativité de p-value ajustée ≤ 0,05 et un fold change ≥ 1,5 ou ≤ 1,5. L'axe des abscisses représente le log2(fold change), tandis que l'axe des ordonnées représente la significativité statistique (-log10 p-value ajustée). Les gènes significativement sur- et sous-exprimés sont représentés respectivement en rouge et en bleu, tandis que les gènes non significatifs sont représentés en gris.

Tableau 4. 5. : Liste des 20 gènes les plus surexprimés entre les conditions CT AIR et AOS.

Genes ID	Log2(fold change)	*p*-adjusted	Genes	Symbol	Description	Refseq
10148	1,529	2,992E-05	ENSG00000188488	SERPINA5	serpin family A member 5	NM_000624
13076	1,175	5,411E-03	ENSG00000124253	PCK1	phosphoenolpyruvate carboxykinase 1	NM_002591
12139	1,050	1,210E-03	ENSG00000212724	KRTAP2-3	keratin associated protein 2-3	NM_001165252
14167	1,034	4,714E-02	ENSG00000125740	FOSB	FosB proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit	NM_001114171
10588	1,026	1,302E-03	ENSG00000103888	CEMIP	cell migration inducing hyaluronidase 1	NM_001293298
11794	1,017	6,452E-03	ENSG00000108551	RASD1	ras related dexamethasone induced 1	NM_001199989
14139	0,986	1,187E-03	ENSG00000275395	FCGBP	Fc gamma binding protein	NM_003890
5969	0,977	1,674E-02	ENSG00000002079	MYH16	myosin heavy chain 16 pseudogene	NR_002147
9370	0,946	4,123E-05	ENSG00000135094	SDS	serine dehydratase	NM_006843
14185	0,885	1,514E-01	ENSG00000181143	MUC16	mucin 16, cell surface associated	NM_001401501
8093	0,816	3,903E-04	ENSG00000204381	LAYN	layilin	NM_001258390
6666	0,812	4,451E-03	ENSG00000104368	PLAT	plasminogen activator, tissue type	NM_000930
4895	0,809	4,848E-02	ENSG00000146070	PLA2G7	phospholipase A2 group VII	NM_001168357
10165	0,806	1,140E-02	ENSG00000129538	RNASE1	ribonuclease A family member 1, pancreatic	NM_002933
2114	0,802	3,627E-04	ENSG00000168878	SFTPB	surfactant protein B	NM_000542
5617	0,793	1,140E-02	ENSG00000159784	FAM131B	family with sequence similarity 131 member B	NM_001031690
14122	0,793	1,874E-02	ENSG00000188039	NWD1	NACHT and WD repeat domain containing 1	NM_001007525
7401	0,785	9,350E-02	ENSG00000264379	LOC124900282	small nucleolar RNA SNORD55/SNORD39	XR_007061913
2912	0,781	2,155E-03	ENSG00000118849	RARRES1	retinoic acid receptor responder 1	NM_002888
1598	0,775	1,673E-04	ENSG00000136542	GALNT5	polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 5	NM_001329868

Tableau 4. 6. : Liste des 20 gènes les plus sous-exprimés entre les conditions CT AIR et AOS.

Genes ID	Log2(fold change)	*p*-adjusted	Genes	Symbol	Description	Refseq
170	-0,591	1,985E-02	ENSG00000135842	NIBAN1	niban apoptosis regulator 1	NM_052966
14410	-0,601	4,524E-02	ENSG00000100206	DMC1	DNA meiotic recombinase 1	NM_001278208
6996	-0,605	6,338E-07	ENSG00000148057	IDNK	IDNK gluconokinase	NM_001001551
3549	-0,621	6,842E-03	ENSG00000169248	CXCL11	C-X-C motif chemokine ligand 11	NM_001302123
6839	-0,625	2,657E-02	ENSG00000168077	SCARA3	scavenger receptor class A member 3	NM_016240
11362	-0,632	5,954E-01	ENSG00000125144	MT1G	metallothionein 1G	NM_001301267
7960	-0,636	2,043E-02	ENSG00000150773	PIH1D2	PIH1 domain containing 2	NM_001082619
2596	-0,638	3,310E-02	ENSG00000197415	VEPH1	ventricular zone expressed PH domain containing 1	NM_001167911
763	-0,639	2,120E-02	ENSG00000214193	SH3D21	SH3 domain containing 21	NM_001162530
6151	-0,651	6,943E-02	ENSG00000123576	ESX1	ESX homeobox 1	NM_153448
11673	-0,669	6,750E-11	ENSG00000132141	CCT6B	chaperonin containing TCP1 subunit 6B	NM_001193529
3548	-0,678	6,455E-02	ENSG00000169245	CXCL10	C-X-C motif chemokine ligand 10	NM_001565
5632	-0,713	2,176E-01	ENSG00000146678	IGFBP1	insulin like growth factor binding protein 1	NM_000596
436	-0,716	5,680E-02	ENSG00000082482	KCNK2	potassium two pore domain channel subfamily K member 2	NM_001017424
3295	-0,744	1,731E-02	ENSG00000109181	UGT2B10	UDP glucuronosyltransferase family 2 member B10	NM_001075
1457	-0,748	3,317E-01	ENSG00000158014	SLC30A2	solute carrier family 30 member 2	NM_001004434
5794	-0,812	7,044E-03	ENSG00000183696	UPP1	uridine phosphorylase 1	NM_001287426
10155	-0,850	1,342E-01	ENSG00000100867	DHRS2	dehydrogenase/reductase 2	NM_001318835
2094	-0,852	1,336E-02	ENSG00000183671	CMKLR2	chemerin chemokine-like receptor 2	NM_001098199
5565	-1,053	3,908E-03	ENSG00000122641	INHBA	inhibin subunit beta A	NM_002192

Une première réponse biologique majeure des cellules à la suite de leur exposition aux AOS HAP et phénol concernait la réponse au stress oxydant et les mécanismes de détoxification, suggérant une activation de voies cytoprotectrices. L'augmentation de *AKR1B1* (*Aldo-keto reductase family 1 member B*), marqueur classique de l'activation de *NRF2*, indiquait une induction des défenses antioxydantes (Jung et al., 2013; Khayami et al., 2020; Subsomwong et al., 2025). Cette réponse était soutenue par l'augmentation de *PEX6* (*Peroxisomal biogenesis factor 6*), gène impliqué dans la biogenèse des peroxysomes et la neutralisation des ROS (Judy et al., 2022; Rüttermann et al., 2023), ainsi que par l'induction de *TRIM31* (*Tripartite motif containing 31*), gène connu pour limiter l'inflammation et l'accumulation de ROS *via* l'activation de *NRF2* (Xue et al., 2024). La sous-expression de *UPP1* (*Uridine phosphorylase 1*), impliqué dans la limitation de la ferroptose et de la peroxydation lipidique, pourrait refléter une régulation fine des processus oxydatifs (Lai et al., 2023). Par ailleurs, la sous-expression de *UGT2B10* (*UDP glucuronosyltransferase family 2 member B10*), impliqué dans la glucuronisation des xénobiotiques, pourrait indiquer une boucle de rétrocontrôle indiquant qu'une détoxification optimale et un retour à la normale (Chen et al., 2008; Obeidat et al., 2018).

La deuxième réponse biologique majeure des cellules était liée au métabolisme énergétique avec une réponse métabolique adaptative induite par un stress. L'induction de certains gènes tels que *PCK1* (*Phosphoenolpyruvate carboxykinase 1*) et *PPP1R3F* (*Protein phosphatase 1 regulatory subunit 3F*) et la sous-expression de *UPP1* et *IDNK* (*IDNK gluconokinase*) suggérerait une modulation du métabolisme glucidique et de la production énergétique, mécanismes associés à la prolifération et à la survie cellulaire (Bausch et al., 1998; Yang et al., 2009; Kelsall et al., 2011; Zhu et al., 2021; Song et al., 2025).

D'autres dérégulations semblaient être en lien avec des modifications du cytosquelette et du remodelage tissulaire, compatibles avec des processus de réparation cellulaire. L'induction de *KRTAP2-3* (*Keratin associated protein 2-3*) et *CEMIP* (*Cell migration inducing hyaluronidase 1*) suggèrerait une modification de l'architecture cellulaire par modulation du cytosquelette d'actine (Li et al., 2020, 2026; Takahashi et al., 2022; Mo et al., 2023). La diminution de *CCT6B* (*Chaperonin containing TCP1 subunit 6B*), impliqué dans la stabilité du cytosquelette et l'intégrité épithéliale, renforcerait l'hypothèse d'un remodelage

structural (Yi et al., 2019; Li et al., 2025). Ces modifications pourraient également être associées à l'activation de facteurs transcriptionnels tels que *FOSB* (*FosB proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit*), impliqué dans les réponses inflammatoires et la réparation tissulaire après lésion pulmonaire (Wang et al., 2021; Lynch et al., 2025). Par ailleurs, la surexpression des gènes *MUC1* (*Mucine 1*) et *GALNT5* (*Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 5*) impliqués dans la production et la maturation des mucines, ainsi que celle de *SFTPB* (*Surfactant protein B*) indiquant une production plus importante de surfactant pulmonaire, suggèrent la modulation des mécanismes de sécrétion épithéliale. Au-delà des systèmes de défense qui pourraient être mis en place pour préserver l'intégrité de la barrière alvéolaire face à l'exposition aux AOS, l'hypersécrétion de mucus et de surfactant est classiquement associée aux pathologies pulmonaires telles que l'asthme, la BPCO ou encore la fibrose pulmonaire (Rogers, 2001; Wang et al., 2008; Vargas Becerra, 2009; Shah et al., 2023; Enomoto et al., 2024).

Enfin, plusieurs gènes ont indiqué une modulation des processus inflammatoires et des interactions tissulaires, bien que sans signature inflammatoire massive. L'induction de *PLXNC1* (*Plexin C1*) et *BDKRB2* (*Bradykinin receptor B2*) suggère une activation de voies impliquées dans le recrutement cellulaire et la signalisation inflammatoire (Granja et al., 2014; Zhao et al., 2017; Deng et al., 2020; Zhang et al., 2025; Huo et al., 2026), tandis que la sous-expression de *CXCL11* pourrait refléter une régulation négative ou adaptative de la réponse inflammatoire (Tian et al., 2008; Dabo et al., 2026). Par ailleurs, la co-régulation de *PLAT* (*Plasminogen activator*) et *SERPINA5* (*Serpin family A member 5*), impliqués dans la dynamique du plasminogène, suggèrerait l'activation de mécanismes liés au remodelage matriciel et à la réparation tissulaire (Gettins, 2002; Idell, 2003; Fan et al., 2022; Thiebaut et al., 2022).

Collectivement, ces résultats ont suggéré que l'exposition à l'ensemble des AOS HAP et phénol a induit une réponse transcriptionnelle multifactorielle dominée par des mécanismes d'adaptation au stress oxydatif et inflammatoire, de reprogrammation métabolique et de remodelage cellulaire, plutôt qu'une activation inflammatoire aiguë massive (Annexe 3). Ces résultats sont en adéquation avec les observations rapportées dans la littérature pour les AOS (Déméautis et al., 2022; Offer et al., 2024).

Outre ces mécanismes, environ 45 % des gènes majoritairement dérégulés sont décrits dans la littérature comme impliqués en amont ou en aval de l'axe *PI3K/AKT/mTOR* (*Phosphoinositide 3-kinases/Serine/threonine kinase 1/ Mechanistic target of rapamycin kinase*), voie centrale dans la régulation du cycle cellulaire et des réponses adaptatives au stress (Gao et al., 2017; Yang et al., 2018; Nozima et al., 2019; Zhu et al., 2021; Fan, Xiong, et al., 2022; Mercier et al., 2022; Thiebaut et al., 2022; Sim et al., 2023; Chen, Zhou, et al., 2024; Li, Jiang, et al., 2024; Peng et al., 2025; Tong et al., 2025; Ma et al., 2026). Cette voie est largement reconnue comme un point central intégrant les signaux liés à la prolifération cellulaire, à l'autophagie, à l'apoptose, à l'angiogenèse et au remodelage cellulaire, processus fréquemment dérégulés dans de nombreuses pathologies respiratoires et tumorales (Peng, Wang, et al., 2022). De manière cohérente, un nombre important des gènes identifiés dans cette étude ont été décrits dans des contextes pathologiques respiratoires très complexes, résultant de l'activation de différents mécanismes moléculaires et cellulaires (e.g., lésions oxydatives, réponse inflammatoire, adaptation du métabolisme énergétique, remodelage tissulaire) tels que les cancers broncho-pulmonaires (Reddy and Mossman, 2002; Chen et al., 2008; Méndez-Lucas et al., 2014; Carvalheira et al., 2015; Montal et al., 2015; Yuki et al., 2015; Guo et al., 2017; Obeidat et al., 2018; Deng et al., 2020; Khayami et al., 2020; Li et al., 2020; Wu et al., 2020; Zhu et al., 2021; Diana and Carvalheira, 2022; Fan, Xiong, et al., 2022; Takahashi et al., 2022; Cheung et al., 2023; Lai et al., 2023; Dong et al., 2025; Peng et al., 2025; Serna-García et al., 2025; Ma et al., 2026), la BPCO (Rogers, 2001; Obeidat et al., 2018; Mondejar-Parreño et al., 2020; Shah et al., 2023; Xiao et al., 2026; Yang and Tan, 2026), l'asthme (Park et al., 2009; Vargas Becerra, 2009; Kogan et al., 2018; Xue et al., 2024; Xie, Lu, et al., 2025) ou la fibrose pulmonaire (Yegen et al., 2023; Enomoto et al., 2024; Jiang et al., 2025).

Ainsi, l'ensemble des altérations transcriptionnelles identifiées apparaît cohérent avec les mécanismes décrits dans la littérature épidémiologique et toxicologique, où l'exposition aux $PM_{2.5}$ est associée à une augmentation de la morbidité respiratoire et de la mortalité prématurée notamment via des mécanismes impliquant l'inflammation chronique, la prolifération cellulaire, les altérations métaboliques et le remodelage tissulaire (Pope et al., 2002; Schraufnagel, 2020; World Health Organization, 2023). Sans permettre d'établir un lien causal direct entre les altérations transcriptionnelles observées et le développement

de pathologies spécifiques, la convergence des signatures géniques identifiées avec celles décrites dans ces maladies suggère que l'exposition aux AOS HAP et phénol, typique des AOS de combustion de biomasse, induit des réponses moléculaires compatibles avec des processus physiopathologiques reconnus dans le contexte des expositions environnementales aux $PM_{2.5}$.

Ces observations transcriptomiques constituent une première indication mécanistique des réponses cellulaires induites par les AOS HAP et phénol typiques des AOS de combustion de biomasse. La validation de ces signatures au niveau protéique sera nécessaire pour confirmer l'activation fonctionnelle des voies biologiques identifiées (Han et al., 2020).

4.3.8. Effet de la durée d'exposition

Les expositions réalisées sur 72 h à partir de certaines conditions ont permis d'évaluer de façon préliminaire l'impact d'une exposition prolongée aux AOS. Trois conditions ont été étudiées dans ces conditions : ACY + ACE + NO_3, NAPH + OH et NAPH + phénol + OH. Les expositions en ALI ayant été réalisées en utilisant des concentrations d'AOS identiques à celles utilisées pour les expositions de 24 h, les doses déposées étaient trois fois plus élevées (voir section 4.3.4).

De manière inattendue, l'altération métabolique observée après 24 h pour l'ensemble des conditions testées n'a pas persisté après 72 h d'exposition (Figure 4. 31.). Cette restauration apparente de l'activité métabolique a indiqué que l'activation progressive de mécanismes compensatoires permet le maintien de l'homéostasie cellulaire au cours du temps.

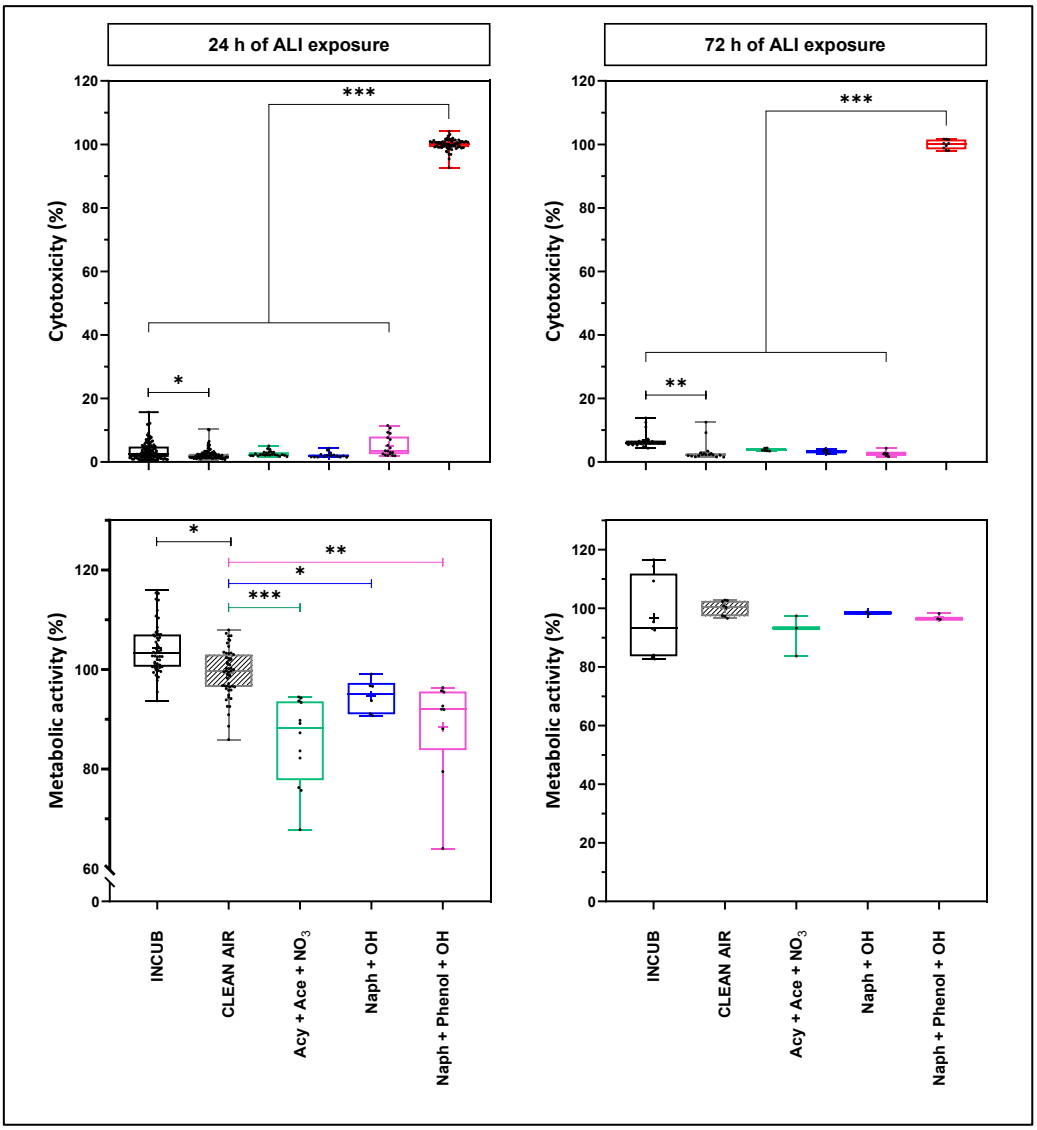


Figure 4. 31. : Comparaison de la cytotoxicité et de l'activité métabolique de la coculture maintenue à l'incubateur (INCUB), exposée 24 ou 72 h à de l'air propre (CT AIR) ou aux AOS générés à partir de l'oxydation de HAP et phénol, seuls ou en mélange, en conditions de réactivité diurne (oxydant OH) et nocturne (oxydant NO_3). A gauche, évaluation des altérations de la membrane cellulaire par dosage de la lactate déshydrogénase (LDH). Les données sont exprimées en pourcentage du contrôle positif. A droite, évaluation de l'activité métabolique cellulaire par le test PrestoBlue™. Les données sont exprimées en pourcentage du contrôle négatif INCUB de chaque condition. Les données pour chaque condition d'AOS exposées 24 h sont issues de trois expériences indépendantes (n = 6) et d'une seule expérience (n = 3) pour les expositions de 72 h (*p < 0,01 ; **p < 0,001 ; ***p < 0,0001). Les comparaisons statistiques ont été réalisées entre chaque condition AOS et les CT AIR correspondant à la même expérience.

Les expositions pendant 24 h aux AOS NAPH + OH avaient montré une tendance à la diminution de la perméabilité épithéliale (voir section 4.3.5). Après 72 h d'exposition, cette diminution s'est avérée significative et s'est accompagnée d'une augmentation de la résistance transépithéliale, confirmant l'établissement d'une réponse fonctionne associée au renforcement de la barrière épithéliale (Figure 4. 32.). Ces résultats ont suggéré une adaptation fonctionnelle de l'intégrité de la barrière, possiblement liée à une réorganisation des jonctions intercellulaires limitant les interactions directes entre les AOS et les cellules. Ainsi, les résultats obtenus ont montré la mise en place progressive d'un système adaptatif dépendant du temps d'exposition, en accord avec l'activation progressive de mécanismes compensatoires observés pour l'activité métabolique.

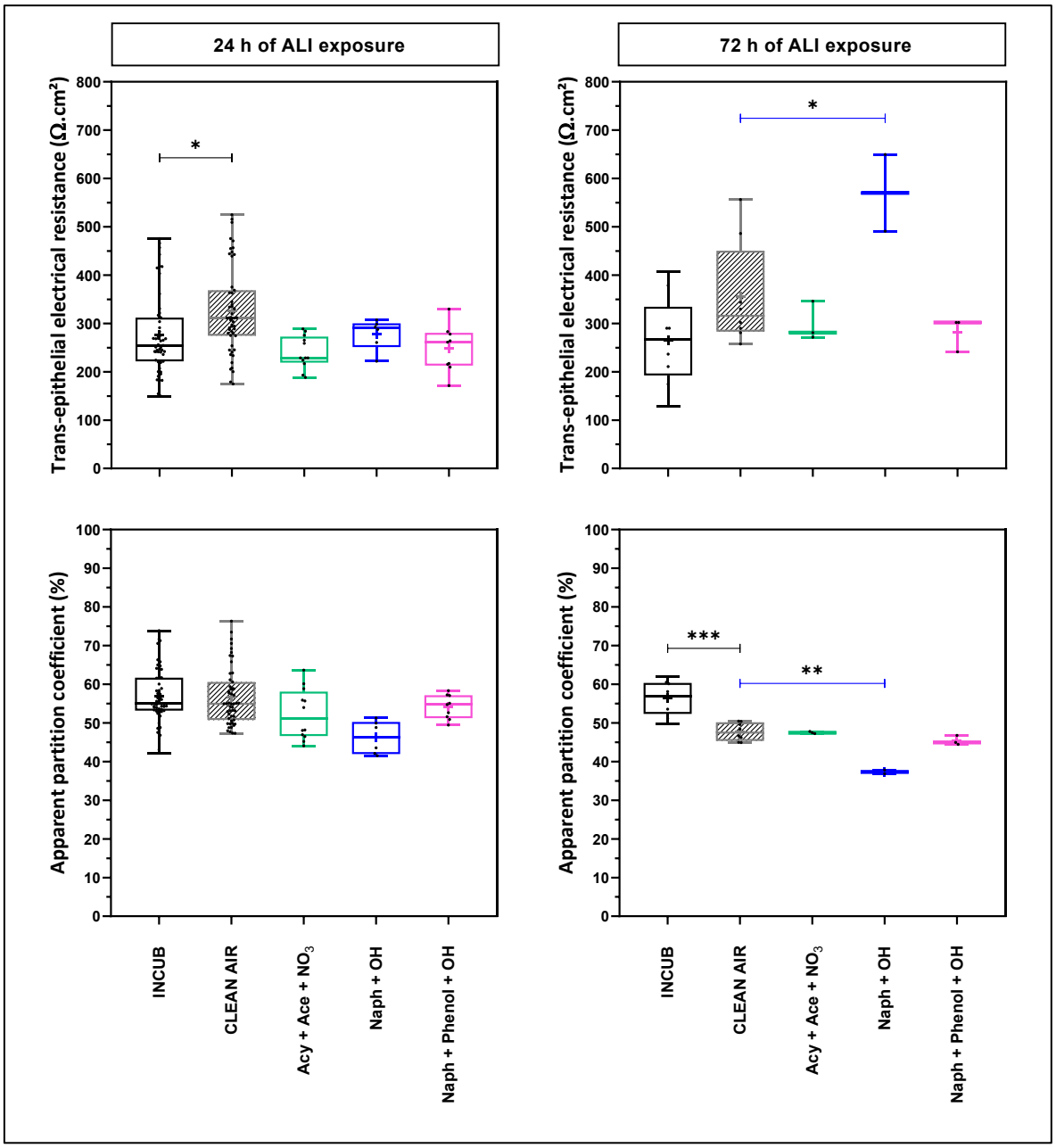


Figure 4. 32. : Comparaison de l'intégrité de la barrière épithéliale de la coculture maintenue à l'incubateur (INCUB), exposée 24 ou 72 h à de l'air propre (CT AIR) ou aux AOS générés à partir de l'oxydation de HAP et phénol, seuls ou en mélange, en conditions de réactivité diurne (oxydant OH) et nocturne (oxydant NO_3). A gauche, mesure de la perméabilité ; à droite mesure de la TEER. Les données pour chaque condition d'AOS exposées 24 h sont issues de trois expériences indépendantes (n = 6) et d'une seule expérience (n = 3) pour les expositions de 72 h (*p < 0,01 ; **p < 0,001 ; ***p < 0,0001). Les comparaisons statistiques ont été réalisées entre chaque condition AOS et les CT AIR correspondant à la même expérience.

La réponse inflammatoire pulmonaire implique classiquement une cascade cytokinique initiée par le TNF-α, suivie d'IL-1β et IL-6, cette dernière participant au rétrocontrôle négatif de l'inflammation. La chimiokine IL-8 jour ensuite un rôle central dans le recrutement des cellules immunitaires vers le site inflammatoire. Dans le cadre des expositions de 24 et 72 h aux AOS, aucune des conditions testées n'a induit d'augmentation significative de la sécrétion de cytokines (pro)-inflammatoire (Figure 4. 33.). Les profils observés à 72 h étaient comparables à ceux obtenus après 24 h, suggérant que les réponses inflammatoires initiales observées à court terme ne progressaient pas dans le temps. Ces résultats pourraient indiquer l'induction d'une réponse aigüe initiale suivie d'une phase de régulation impliquant l'activation de mécanismes de défense cellulaire.

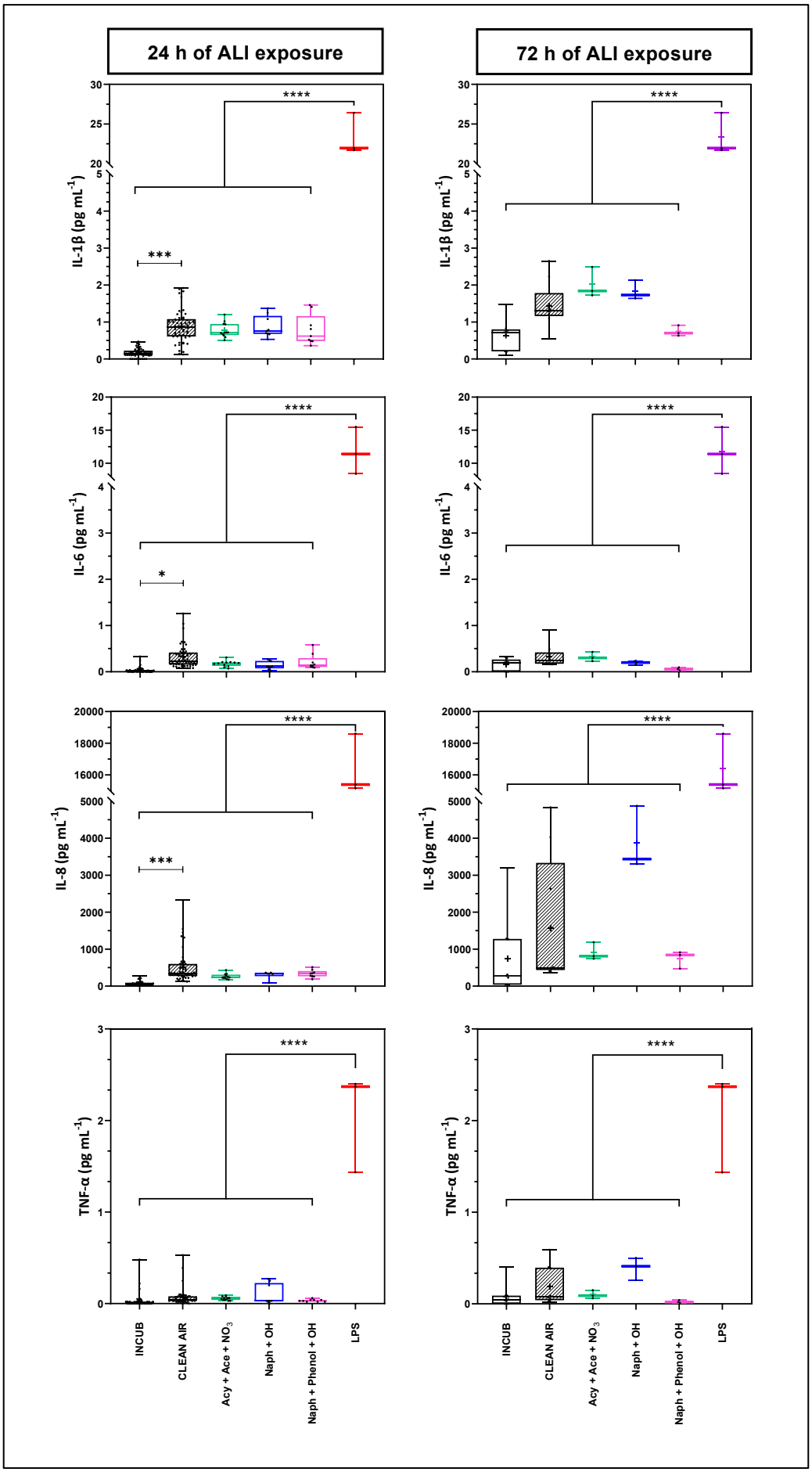

24 h of ALI exposure
72 h of ALI exposure
IL-1β (pg mL-1)
IL-6 (pg mL-1)
IL-8 (pg mL-1)
TNF-α (pg mL-1)
****
***
*
INCUB
CLEAN AIR
Acy + Ace + NO3
Naph + OH
Naph + Phenol + OH
LPS

Figure 4. 33. : Dosage des niveaux de sécrétion des cytokines (pro)-inflammatoires de la coculture maintenue à l'incubateur (INCUB), exposé 24 ou 72 h à de l'air propre (CT AIR) ou aux AOS. Les données pour chaque condition d'AOS exposées 24 h sont issues de trois expériences indépendantes (n = 6) et d'une seule expérience (n = 3) pour les expositions de 72 h (*p < 0,01 ; **p < 0,001 ; ***p < 0,0001). Les comparaisons statistiques ont été réalisées entre chaque condition AOS et les CT AIR correspondant à la même expérience.

L'évaluation du stress oxydant a été poursuivie afin d'explorer l'évolution temporelle des réponses redox cellulaires jusqu'à 72 d'exposition aux AOS. En raison du nombre limité de réplicas biologiques disponibles, aucune analyse statistique robuste n'a pu être réalisée et les résultats restent largement préliminaires (Figure 4. 34.). Comme indiqué précédemment (voir section 4.3.5), après 24 les niveaux de 4-HNE et de 8-OHdG ne montraient pas de variation notable, suggérant l'absence de dommages oxydatifs majeurs affectant les lipides et l'ADN. En revanche, une augmentation tendancielle des protéines carbonylées a été observée à la suite de l'exposition aux AOS ACY + ACE + NO_3, NAPH + OH et NAPH + phénol + OH, indiquant une possible accumulation progressive de modifications oxydatives des protéines (Figure 4. 34.). Contrairement aux expositions 24 h, aucune modification du ratio GSSG/GSH n'a été observée à 72 h, suggérant une absence de mobilisation détectable des défenses antioxydantes à ce stade. Collectivement, ces observations pourraient traduire une évolution temporelle des réponses cellulaires, passant d'un état initial dominé par des mécanismes adaptatifs de défense redox vers une phase où des altérations oxydatives plus discrètes pourraient commencer à apparaître, sans toutefois atteindre un niveau de dommages oxydatifs massifs dans les conditions étudiées.

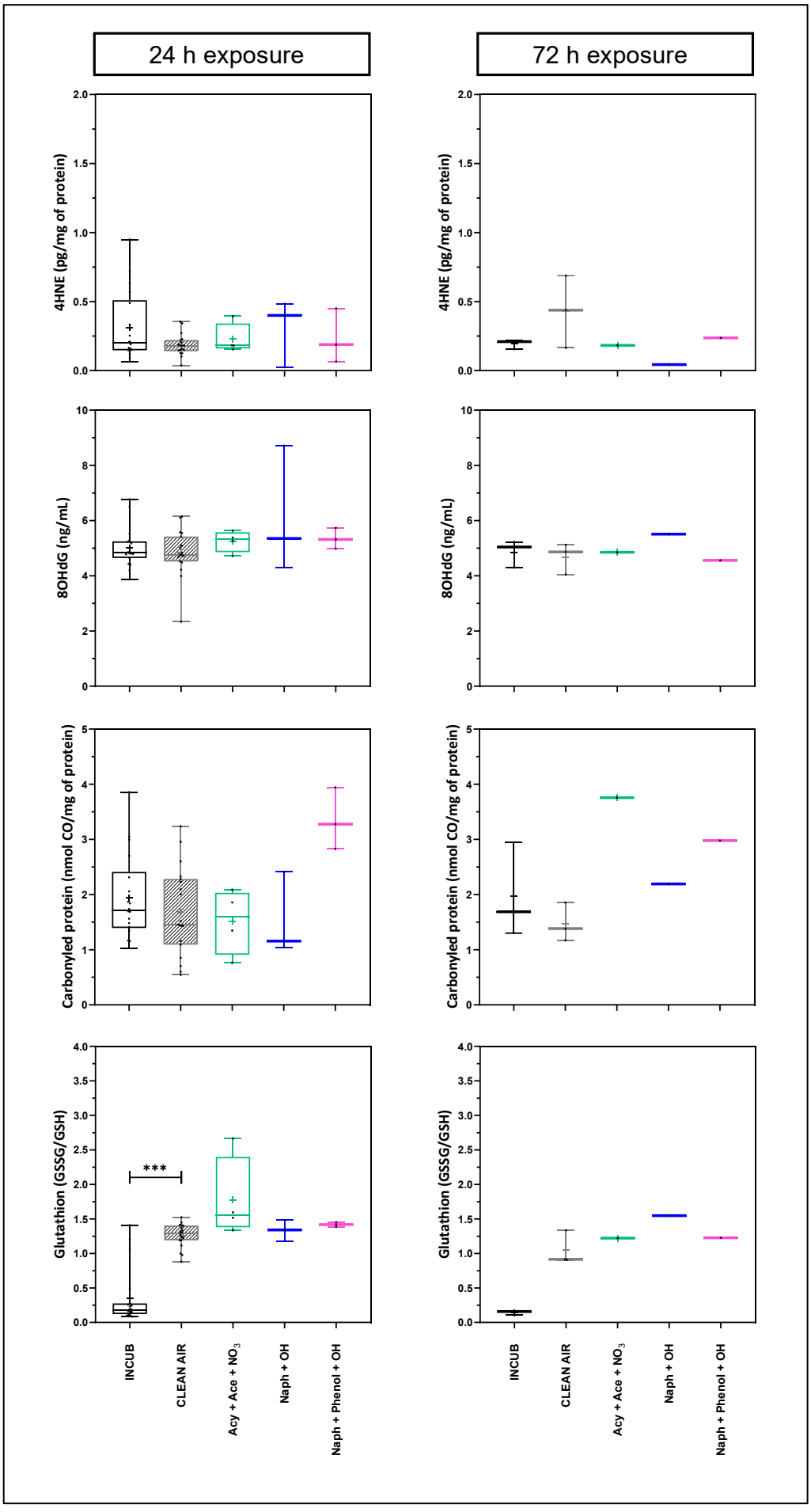

24 h exposure
72 h exposure
4HNE (pg/mg of protein)
8OHdG (ng/mL)
Carbonyled protein (nmol CO/mg of protein)
Glutathion (GSSG/GSH)
***
INCUB
CLEAN AIR
Acy + Ace + NO3
Naph + OH
Naph + Phenol + OH

Figure 4. 34. : Evaluation du stress oxydant produit lorsque la coculture maintenue à l'incubateur (INCUB), exposé 24 ou 72 h à de l'air propre (CT AIR) ou aux AOS. Les données pour chaque condition d'AOS exposées 24 h sont issues de trois expériences indépendantes (n = 6) et d'une seule expérience (n = 3) pour les expositions de 72 h (*p < 0,01 ; **p < 0,001 ; ***p < 0,0001). Les comparaisons statistiques ont été réalisées entre chaque condition AOS et les CT AIR correspondant à la même expérience.

Dans leur ensemble, ces observations préliminaires ont mis en évidence l'importance de la durée d'exposition dans la modulation des réponses cellulaires et suggèrent que certains effets toxiques initiaux peuvent être suivis par la mise en place de mécanismes adaptatifs. En particulier, l'exposition prolongée semblait permettre aux cellules de restaurer leur activité métabolique tout en modifiant certaines propriétés fonctionnelles, notamment au niveau de la barrière épithéliale. Par ailleurs, les tendances observées sur certains marqueurs de stress oxydant, en particulier l'augmentation progressive des protéines carbonylées en l'absence de mobilisation détectable du ratio GSSG/GSH, suggèrent une évolution temporelle des réponses redox, compatible avec l'apparition de modifications oxydatives discrètes sans dommages majeurs détectables.

Un résultat notable concerne l'exposition aux AOS NAPH + OH, pour laquelle un renforcement marqué de la résistance transépithéliale et une diminution de la perméabilité ont été observés après 72 h. Ce comportement reste inhabituel pour le modèle de coculture utilisé, qui présentait rarement des valeurs de résistance transépithéliale aussi élevées. Deux hypothèses pourraient être envisagées : soit cet effet correspondrait à une variabilité expérimentale, nécessitant une confirmation par des répétitions indépendantes, soit certains composés associés aux AOS NAPH + OH pourraient, à une certaine dose, induire un renforcement spécifique des propriétés de barrière épithéliale. L'abondance de ces composés était probablement moindre dans le cas des AOS NAPH + phénol + OH (voir section 4.3.3) en lien avec la prédominance réactionnelle de OH avec le phénol plutôt qu'avec NAPH (voir section 4.3.1). Ces observations pourraient suggérer que le modèle de coculture possède une capacité adaptative lui permettant de moduler ses propriétés barrières en réponse à certaines expositions.

Ainsi au-delà de leurs propriétés physico-chimiques, la toxicité induite par les AOS est également liée à la durée d'exposition et des capacités adaptatives des cellules épithéliales. Dans un contexte d'exposition prolongée, des réponses sublétales répétées, associées à des altérations redox discrètes, pourraient contribuer à une modulation progressive des propriétés de la barrière alvéolaire et participer à l'évolution de dysfonctionnements épithéliaux associés aux expositions atmosphériques chroniques.

Conclusion générale

Conclusions générales

Ce travail de thèse avait pour objectif principal d'évaluer la toxicité induite par des AOS issus de l'oxydation de précurseurs majoritairement émis lors de la combustion de biomasse notamment HAP et phénol, seuls ou en mélange. Pour cela, il était nécessaire de développer un modèle alvéolaire pertinent, permettant l'évaluation toxicologique de ces aérosols atmosphériques en ALI, tout en tenant compte des contraintes expérimentales propres aux expositions dynamiques et aux approches de criblage toxicologique. Dans ce contexte, une approche progressive a été adoptée afin de construire un cadre expérimental robuste, depuis la mise en place du modèle cellulaire, à son exposition à des AOS en ALI, jusqu'à l'évaluation des effets toxicologiques de ces AOS.

Au-delà de ses caractéristiques biologiques, le modèle cellulaire développé visait à offrir un équilibre optimal entre pertinence physiologique et accessibilité pratique, pour l'adapter aux criblages toxicologiques, notamment dans le contexte exigeant d'un travail de thèse multidisciplinaire. Le modèle cellulaire devait être compatible avec des expositions quotidiennes, et donc simple à mettre en œuvre, rapide à établir et économiquement accessible. Pour reproduire *in vitro* des conditions d'inhalation alvéolaires physiologiquement pertinentes, une coculture alvéolaire en ALI reposant sur l'association des lignées cellulaires humaines A549 et hAELVi a été développée. Ce modèle d'épithélium alvéolaire a permis de reproduire certaines caractéristiques morphologiques et fonctionnelles compatibles avec celles décrites pour la région alvéolaire humaine. L'expression génique et protéique de marqueurs spécifiques des PT1 et PT2 a confirmé l'établissement d'un phénotype mixte physiologiquement pertinent résultant de l'association des deux lignées. En plus de garantir des propriétés de barrière épithéliale stables et reproductibles, la coculture cellulaire a permis la sécrétion de protéines du surfactant nécessaires à la protection de l'épithélium. L'avantage majeur de ce modèle de coculture réside dans sa capacité à conserver sa stabilité structurale et fonctionnelle lors d'expositions en ALI prolongées jusqu'à 72 h, ce qui représente un intérêt considérable par rapport à de nombreux systèmes *in vitro* existants, souvent limités à des durées d'exposition plus courtes.

Néanmoins, cette simulation de la physiologie alvéolaire humaine demeure imparfaite et différentes améliorations devraient être conduites pour l'améliorer (e.g., ensemencement séquentiel, intégration de cellules immunitaires, etc.). Une autre limite importante réside dans l'absence de stimulation mécanique physiologique, notamment celle associée à la dynamique respiratoire et à la microcirculation alvéolaire qui jouent un rôle clé dans le fonctionnement du tissu pulmonaire *in vivo*.

Au-delà de ces améliorations techniques nécessaires de ce modèle cellulaire, les différences transcriptionnelles observées entre les cocultures maintenues à l'incubateur et celles exposées au flux d'air seul ont mis en évidence une limitation sous-jacente majeure, commune à la plupart des systèmes dynamiques en ALI. Le flux d'air, initialement considéré comme biologiquement neutre, s'est révélé capable d'induire des réponses cellulaires mesurables. Cette observation a soulevé alors une question fondamentale pour l'interprétation des expositions en ALI : Comment évaluer correctement l'impact d'un polluant exposé en ALI sans comprendre au préalable l'impact intrinsèque du flux d'air seul sur les cellules ?

Bien que le flux d'air soit essentiel pour reproduire des conditions d'inhalation réalistes en ALI, son impact biologique intrinsèque restait encore mal caractérisé et rarement étudié comme facteur expérimental indépendant. Cette situation peut en partie s'expliquer par la forte hétérogénéité des pratiques d'exposition dynamique en ALI, chaque dispositif étant adapté à des objectifs scientifiques spécifiques. Dans ce contexte, une harmonisation stricte des conditions expérimentales apparaît difficile à atteindre et souvent inadaptée à la diversité des approches expérimentales. Par conséquent, distinguer les réponses induites par les composés exposés de l'activation basale induite par le flux d'air représente un défi majeur pouvant limiter l'interprétation précise et la reproductibilité des données toxicologiques. Dans ce travail, l'impact biologique du flux d'air seul a été caractérisé de manière approfondie, mettant en évidence l'existence de contraintes mécaniques détectables au niveau cellulaire et moléculaire. Outre la confirmation des réponses inflammatoires déjà observées lors de la caractérisation initiale du modèle, les analyses transcriptomiques ont révélé une signature étendue de mécanotransduction, jusqu'alors inexplorée dans ce contexte. Cette signature inclut notamment l'activation de voies de signalisation associées au stress de cisaillement en réponse à l'exposition au flux

d'air. Ces résultats démontrent que le flux d'air seul peut constituer un stimulus mécanique continu, dépendant du temps, capable de perturber l'homéostasie épithéliale et d'induire successivement des réponses protectrices, réparatrices puis adaptatives, indépendamment de toute exposition à des polluants.

Toutefois, ces effets ne doivent pas être considérés comme une limite intrinsèque des systèmes en ALI, mais plutôt comme une caractéristique expérimentale pouvant être maîtrisée par la mise en place de contrôles appropriés. L'intégration systématique de conditions d'exposition à de l'air propre apparaît ainsi comme une stratégie essentielle pour distinguer les effets spécifiques des composés testés de ceux induits par le flux d'air lui-même. Ces résultats soulignent également que l'harmonisation stricte des conditions expérimentales en ALI dynamique reste difficile à envisager, chaque exposition dépendant fortement de la question scientifique posée, des paramètres expérimentaux choisis et de l'expérience de l'expérimentateur. Dans ce contexte, l'amélioration des contrôles expérimentaux constitue une approche pragmatique permettant de renforcer la robustesse, l'interprétation et la comparaison des études réalisées en ALI.

Ainsi, ce travail, associé aux études déjà publiées dans ce domaine, a démontré que le flux d'air ne constitue pas une condition biologiquement inerte, mais une variable expérimentale active devant être systématiquement prise en compte. Cet état basal mécaniquement induit, s'il n'est pas correctement intégré dans l'analyse expérimentale, peut conduire à une interprétation erronée des effets biologiques attribués aux polluants. Dans ce contexte, l'analyse approfondie de la qualité de l'exposition a permis de caractériser et maîtriser cet état basal, et d'aborder avec davantage de précision l'évaluation des effets toxicologiques spécifiquement induits par les AOS issus de HAP et du phénol.

Sur la base de ces fondations expérimentales, l'étude des effets toxicologiques des AOS de HAP et du phénol, seuls ou en mélange, a permis d'explorer l'influence spécifique de leurs caractéristiques physico-chimiques sur les réponses biologiques observées au sein du modèle de coculture alvéolaire. La pertinence du modèle *in vitro* développé ainsi que des paramètres d'exposition utilisés a été démontrée, renforçant ainsi la robustesse et la fiabilité des résultats obtenus. Les effets biologiques induits par les AOS issus de HAP et du phénol se sont révélés dépendre de leurs caractéristiques physico-chimiques en lien avec

les conditions expérimentales adoptées notamment en termes de réactivité (précurseurs en présence, radical OH ou NO_3, régime low- ou high-NO_x). Les AOS générés ont induit des profils biologiques distincts, incluant des altérations métaboliques, des modifications des propriétés barrières et des réponses cellulaires variables selon les conditions expérimentales.

Des effets toxicologiques spécifiques ont été observés au niveaux cellulaire et moléculaire selon la nature des AOS générés. Un effet plus important a été observé sur l'activité métabolique lors de l'exposition à un mélange d'AOS NAPH + phénol + OH, suggérant des interactions potentielles entre les composés formés. Les effets les plus marqués ont été observés pour les AOS issus de processus de réactivité nocturne (radical NO_3) ou réalisées en présence de NO_x, conditions favorisant la formation de composés nitro-organiques reconnus pour leur réactivité biologique élevée. D'autres facteurs expérimentaux ont également pu contribuer aux effets observés, notamment la formation d'acide nitrique lors en condition de réactivité nocturne, susceptible d'entraîner une diminution du pH et d'affecter directement la viabilité cellulaire. Par ailleurs, la présence potentiellement importante d'une fraction lipophile des particules émises a pu favoriser des interactions directes avec les membranes cellulaires, conduisant à des altérations des voies mitochondriales, lysosomales ou apoptotiques (Brinchmann et al., 2018). Les particules issues de l'oxydation diurne sont caractérisées par un diamètre d'environ 50 nm et une certaine viscosité, susceptibles d'accélérer leur internalisation par les cellules. À l'inverse, les particules plus volumineuses (200 nm) et de formes très sphérique issues de l'oxydation nocturne tendraient à persister plus longtemps au niveau de la membrane plasmique, favorisant le recrutement de vésicules membranaires. Ainsi, au-delà des hypothèses mécanistiques envisageables, les différences de composition chimique et de caractéristiques physiques des AOS générés apparaissaient clairement associées à des répercussions biologiques distinctes à différents niveaux cellulaires.

Le travail préliminaire portant sur les effets dépendants du temps d'exposition a apporté un éclairage complémentaire sur la dynamique des réponses cellulaires face à ces AOS. La durée d'exposition à un même type d'AOS s'est révélée être un facteur déterminant dans la modulation des réponses biologiques. Alors que les expositions de 24 h ont montré des effets toxicologiques marqués, associés à l'activation de mécanismes de défense

cellulaire, les expositions prolongées sur 72 h n'ont montré aucun effet précédemment observé. Cette activation des mécanismes de défense cellulaire s'est notamment traduite par une mobilisation des systèmes antioxydants, mise en évidence par l'augmentation du ratio GSSG/GSH aux temps d'exposition courts, suggérant l'activation précoce des défenses redox en réponse à l'exposition aux AOS. Le glutathion a protégé les cellules en s'oxydant lors du piégeage des ROS, expliquant ainsi l'absence de lésion significative des macromolécules telles que les lipides, les protéines et l'ADN et suggérant l'émergence progressive de modifications oxydatives discrètes compatibles avec une adaptation cellulaire soutenue potentiellement reliée à la cascade NRF2 et d'autres défenses antioxydante. La restauration de certaines fonctions cellulaires comme l'activité métabolique, observées après 72 h d'exposition a suggéré l'activation progressive de mécanismes compensatoires, tandis que le renforcement des propriétés de la barrière épithéliale a indiqué une capacité des cellules à ajuster leurs propriétés fonctionnelles en réponse à un stress environnemental prolongé. Ces observations ont souligné l'importance de considérer la dimension temporelle dans l'évaluation toxicologique des particules atmosphériques, les réponses cellulaires pouvant évoluer d'un état aigu vers des mécanismes adaptatifs ou protecteurs.

Bien que l'identification de signatures transcriptionnelles propres à chaque type d'AOS n'ait pas été possible dans les conditions expérimentales mises en œuvre, l'approche intégrative développée a permis de révéler une signature biologique commune associée à l'ensemble des AOS étudiés et donc typique des AOS de combustion de biomasse. Dans l'ensemble, les altérations transcriptionnelles identifiées sont apparues cohérentes avec les modifications fonctionnelles observées précédemment, incluant l'augmentation de l'activité lysosomale, les réponses antioxydantes et les variations de l'activité métabolique cellulaire. La dérégulation coordonnée de gènes impliqués dans le stress oxydatif, le métabolisme énergétique, le remodelage cellulaire et l'axe PI3K/AKT/mTOR a suggéré une réponse adaptative globale compatible avec une exposition à des composés très oxygénés (oxydés). Plus précisément, l'induction de gènes associés aux voies de réponse au stress oxydant et à la détoxification, tels que ceux impliqués dans l'activation de NRF2 et la biogenèse des peroxysomes, a confirmé l'activation de mécanismes cytoprotecteurs en réponse aux composés oxydés associés aux AOS. Parallèlement, la modulation de gènes

impliqués dans le métabolisme énergétique et l'organisation du cytosquelette a suggéré une reprogrammation fonctionnelle des cellules compatible avec les altérations métaboliques et structurales observées expérimentalement. Même si les résultats transcriptomiques devraient encore être validés au niveau protéomique, cette convergence entre données fonctionnelles, transcriptomiques et caractéristiques physico-chimiques des AOS a renforcé la plausibilité biologique des effets observés et soutient l'existence d'une réponse cellulaire structurée malgré l'absence de cytotoxicité massive. Dans leur ensemble, les approches fonctionnelles et transcriptomiques mises en œuvre dans ce travail ont convergé vers l'identification d'une signature biologique commune associée à l'exposition aux AOS typiques de la combustion de biomasse, caractérisée par l'activation coordonnée des réponses antioxydantes, la reprogrammation métabolique et le remodelage cellulaire. Cette convergence a renforcé la robustesse des observations suggérant que les réponses identifiées reflétaient des mécanismes biologiques fondamentaux plutôt que des effets spécifiques à une condition expérimentale isolée.

Malgré la cohérence des résultats obtenus, certaines limites doivent être prises en compte dans l'interprétation globale des données. Tout d'abord, l'ensemble des conditions de réactivité et des combinaisons de précurseurs n'a pas pu être exploré de manière exhaustive limitant l'établissement de profils toxicologiques complets pour chaque type d'AOS issus des HAP et du phénol. De plus, une dose unique a été testée ce qui ne permet pas l'établissement de relations dose-réponse et donc de renforcer la relation de causalité avec l'exposition testée. Cette limitation restreint la possibilité d'évaluer quantitativement les seuils de toxicité associés aux différents AOS étudiés. Le nombre restreint de réplicats réalisés et le nombre de conditions expérimentales testées lors des expositions 72 h constitue également une limite importante, ne permettant pas d'établir avec certitude des tendances générales sur les mécanismes adaptatifs observés. Enfin, bien que les caractéristiques physico-chimiques générales des AOS aient été prises en compte, l'absence d'une caractérisation chimique détaillée à échelle moléculaire et surtout d'une identification des composés en présence, des phases gazeuses et particulaires, pour chaque condition limite la mise en évidence précise des composés responsables des effets biologiques observés.

Ainsi, ce travail a mis en évidence l'importance d'une approche intégrée combinant le développement de modèles biologiques pertinents, la maîtrise des paramètres expérimentaux et la prise en compte des propriétés physico-chimiques des aérosols étudiés. En démontrant que la toxicité des AOS dépend non seulement de leurs caractéristiques physico-chimiques mais également des conditions de leur formation et de la durée d'exposition, cette thèse a contribué à améliorer la compréhension des mécanismes impliqués dans les réponses cellulaires aux particules atmosphériques. Au-delà des résultats obtenus, ce travail a proposé une démarche méthodologique progressive et rigoureuse, depuis le développement d'un modèle expérimental accessible, en passant par la définition d'expositions ALI rigoureuses, jusqu'à l'identification de profils toxicologiques différenciés selon les conditions de formation des AOS. Cette approche a constitué une contribution significative pour le développement d'outils expérimentaux adaptés à l'évaluation du potentiel toxique des aérosols atmosphériques. Dans un contexte d'exposition environnementale en constante évolution, marqué par la grande variété des sources d'émissions atmosphériques et un changement des conditions environnementales notamment en lien avec le réchauffement climatique, les résultats présentés dans cette thèse ont participé à renforcer les bases scientifiques nécessaires à une meilleure évaluation toxicologique des polluants atmosphériques. Ainsi, ce travail a contribué à faire progresser la compréhension des interactions entre aérosols atmosphériques et épithélium pulmonaire, ouvrant la voie à des approches plus intégrées pour l'étude des effets des particules sur la santé respiratoire.

Perspectives

Perspectives

Dans la continuité des résultats obtenus, plusieurs pistes de travail peuvent être envisagées pour renforcer la robustesse scientifique et la portée toxicologique des travaux. Ces améliorations concernent à la fois l'optimisation du modèle biologique, l'élargissement des conditions d'exposition en ALI et d'études de polluants et de sources de particules, et l'approfondissement des approches toxicologiques.

6.1. Perspectives directes à court terme

Compte tenu des différentes limites existantes sur les résultats obtenus, les perspectives directes à court terme concernent d'une part la caractérisation détaillée de la phase gazeuse à laquelle le modèle de coculture a été soumis lors des expérimentations avec les AOS de HAP et du phénol, et d'autre part, la mise en œuvre d'analyses protéomiques pour valider au niveau fonctionnel les signatures transcriptomiques identifiées. Dans le premier cas, des mesures PTR-MS ont été réalisées lors des essais mais les données n'ont pas encore été analysées. Les résultats qui pourraient en être obtenus permettrait d'obtenir une vue d'ensemble des composés organiques, gazeux et particulaires, auxquels les cellules ont été exposées et de faire le lien avec les réponses biologiques observées. La fraction protéique des cellules exposées aux AOS a été conservée. Ainsi, des analyses protéomiques pourront être réalisées afin de valider les signatures géniques associées aux réponses au stress oxydant, à la reprogrammation métabolique et au remodelage cellulaire (Han et al., 2020). Cette validation multi-niveau permettra de renforcer la compréhension des mécanismes biologiques impliqués et d'établir des liens plus robustes entre les altérations moléculaires et les réponses cellulaires observées. Elle pourrait également permettre d'établir un lien causal potentiel entre les altérations transcriptionnelles observées et le développement de pathologies spécifiques à la suite d'expositions à des AOS typiques de combustion de biomasse.

Dans la continuité des travaux réalisés au cours de cette thèse, une des perspectives majeures est déjà en cours de réalisation et constitue une étape logique dans l'évolution des approches mises en place. En effet, après avoir développé et validé un modèle expérimental capable d'évaluer la toxicité d'AOS générés en laboratoire dans des conditions

contrôlées, l'étape suivante consiste naturellement à appliquer ces outils à des émissions réelles primaires et vieillies de combustion de biomasse afin d'intégrer toute la complexité chimique des aérosols atmosphériques. Dans cette optique, le projet de recherche WOODTOX-ALI (Evaluation *in vitro* de la toxicité pulmonaire des particules primaires et secondaires émises par le chauffage résidentiel au bois, ANSES-24-EST-028) couplé au projet WOODNIGHT (Formation des particules secondaires à partir des émissions du chauffage au bois résidentiel en conditions diurne et nocturne, ADEME 2262D0034) a pour objectifs d'évaluer puis de comparer la toxicité pulmonaire des émissions primaires et secondaires (vieillies) d'un poêle à bûches et d'en étudier les mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués.

Dans ce cadre, les méthodologies développées au cours de cette thèse, notamment l'utilisation du modèle de coculture en ALI et son exposition, ont été appliquées à ce projet dans lequel je me suis investie pleinement en participant de façon significative aux expérimentations réalisées. Ainsi, des émissions primaires diluées issues directement d'un poêle à bûches et des émissions correspondantes soumises en parallèle à un vieillissement atmosphérique simulé en conditions de réactivité diurne (radical OH) et nocturne (radical NO_3), ont été exposées simultanément sur des cocultures d'A549/hAELVi en ALI. Cette approche intégrée, combinant exposition en ALI, caractérisation physico-chimique détaillée des aérosols et évaluation toxicologique multiparamétrique, permet d'aborder la toxicité des émissions de combustion dans toute leur complexité. L'utilisation d'émissions réelles issues de combustions domestiques confère par ailleurs une forte pertinence environnementale aux résultats obtenus, en rapprochant les conditions expérimentales des situations d'exposition rencontrées dans les environnements résidentiels. Les travaux engagés dans ce cadre ont déjà permis d'obtenir des résultats préliminaires particulièrement encourageants. Ceux-ci suggèrent l'existence de différences notables entre les effets induits par les émissions primaires et ceux associés aux émissions vieillies, notamment en termes de profils toxicologiques globaux et de réponses transcriptionnelles. Ces observations préliminaires indiquent que les transformations atmosphériques pourraient modifier la nature des réponses biologiques induites. Bien que ces résultats nécessitent encore d'être consolidés par des analyses complémentaires, ils confirment la

pertinence des approches développées dans cette thèse pour l'étude des effets sanitaires associés aux émissions domestiques réelles et à leur évolution dans l'atmosphère.

Par ailleurs, la communauté scientifique utilisant l'approche ALI s'est largement organisée dernièrement afin de pouvoir initier non seulement des travaux d'harmonisation des pratiques mais également de préparer l'intégration de ce type d'approche dans un cadre réglementaire d'évaluation de la toxicité des polluants atmosphériques. En ce sens, le groupe constitué au niveau européen, dont l'INERIS est partie prenante, a déposé récemment un projet d'action COST (European Cooperation in Science and Technology). Celle-ci, nommée ADviSE (Towards harmonization of air-liquid interface methods for regulatory acceptance) a pour objectif de construire un réseau paneuropéen transdisciplinaire pour harmoniser, comparer et optimiser les méthodes de toxicologie par inhalation basées sur l'ALI. En ce sens les résultats obtenus sur l'impact du flux d'air seul et les pistes proposées d'amélioration des contrôles expérimentaux afin de renforcer la robustesse et l'interprétation des études réalisées en ALI seront à prendre en considération.

6.2. Perspectives à moyen terme

Sur le plan expérimental, une optimisation du modèle alvéolaire pourrait être envisagée dans le but d'améliorer sa pertinence physiologique. L'amélioration des conditions d'ensemencement, notamment par une approche d'ensemencement séquentielle des lignées hAELVi et A549, pourrait favoriser l'organisation structurale de la barrière épithéliale et améliorer ses propriétés fonctionnelles. L'intégration de cellules immunitaires, telles que des macrophages dérivés de la lignée THP-1 positionnés sur la face apicale de l'épithélium, constituerait une évolution importante permettant de mieux reproduire les interactions entre les différents types cellulaires et d'intégrer une réponse inflammatoire plus physiologiquement pertinente. La simplicité et la robustesse de ce modèle d'épithélium alvéolaire constituent, à cet égard, un atout majeur, car elles permettent d'envisager ces évolutions sans compromettre la faisabilité expérimentale.

La consolidation du modèle biologique et des conditions d'exposition développées dans cette thèse et dans le cadre l'action COST AdviSE (si retenue) constitueront une base solide pour le développement de protocoles expérimentaux harmonisés compatibles avec des

approches réglementaires. À terme, l'adaptation de ce système à des cadres méthodologiques et métrologiques reconnus, tels que des lignes directrices inspirées des tests de OCDE (Organisation de Coopération et de Développement Économiques), pourrait permettre l'évaluation toxicologique d'autres polluants atmosphériques dans des conditions représentatives d'expositions inhalées. Une telle harmonisation favoriserait la comparabilité des données entre laboratoires et contribuerait à renforcer l'intégration des modèles *in vitro* en ALI dans les stratégies modernes d'évaluation des risques toxicologiques.

Dans un contexte environnemental en évolution rapide, la prise en compte de situations d'exposition réalistes constitue un enjeu majeur pour l'évaluation toxicologique des aérosols atmosphériques. Si les périodes hivernales, impactées par le chauffage domestique au bois, sont caractérisés par des élévations marquées, et reconnues, des concentrations en $PM_{2.5}$, de manière encore plus préoccupante, l'augmentation récente de la fréquence et de l'intensité des incendies de végétation au cours des périodes estivales, en lien avec le changement climatique, entraîne l'émission massive directe de particules et de précurseurs de particules secondaires sur des zones étendues (Cunningham et al., 2024; Zhao et al., 2025). Face à ces évolutions, des populations vivant à proximité des zones touchées peuvent être exposées, parfois de manière prolongée et sans perception immédiate du risque, à des niveaux élevés de particules primaires et vieillies (secondaires). Ainsi, il serait intéressant d'appliquer les mêmes approches que celles développées lors de cette thèse et mises en œuvre lors des projets WOODNIGHT et WOODTOX-ALI dans le cas spécifique des incendies de forêt afin de pourvoir non seulement évaluer les effets toxicologiques de ces émissions primaires et secondaires mais également de les mettre en regard des effets induits par le chauffage résidentiel au bois (Gould et al., 2024; Joo et al., 2024; Heibati et al., 2025; Huang and Skidmore, 2025; Lopes et al., 2025).

Par ailleurs, l'évaluation de plusieurs doses d'exposition constituerait une évolution indispensable pour renforcer la portée toxicologique des résultats obtenus dans ce travail sur la toxicité des AOS issus de HAP et du phénol typiques de la combustion de biomasse. Ainsi, comme indiqué auparavant, l'établissement de relations dose-réponse permettrait de renforcer la relation de causalité avec l'exposition testée. L'acquisition de ces données quantitatives offrirait la possibilité d'identifier des seuils d'effet biologiques pertinents et

contribuerait à la production de données expérimentales exploitables dans le cadre de l'élaboration de recommandations sanitaires et de lignes directrices relatives à la qualité de l'air. Dans cette perspective, l'étude d'une gamme étendue de concentrations, incluant des niveaux représentatifs des épisodes de pollution observés lors des périodes hivernales impactées par chauffage domestique au bois ou lors d'événements extrêmes tels que les incendies de forêt, apparaît particulièrement pertinente. Ces situations peuvent conduire à des expositions ponctuelles mais élevées en $PM_{2.5}$ et en composés organiques volatils et semi-volatils, susceptibles de générer des AOS en quantités importantes. L'intégration de ces scénarios expérimentaux permettrait d'évaluer la réponse biologique à des concentrations représentatives de situations environnementales critiques, contribuant ainsi à mieux anticiper les risques sanitaires associés à ces épisodes.

Au-delà des améliorations biologiques, l'élargissement des conditions expérimentales constitue une étape essentielle pour consolider les observations réalisées. En particulier, l'étude systématique de chaque précurseur individuel soumis à des conditions d'oxydation distinctes impliquant soit les radicaux OH soit les radicaux NO_3 permettrait de mieux discriminer l'influence respective des mécanismes d'oxydation diurne et nocturne ainsi que du précurseur en lui-même, approche qui n'a pas pu être réalisée de manière exhaustive dans ce travail. De même, l'augmentation du nombre de répliquats expérimentaux apparaît nécessaire pour renforcer la robustesse statistique des observations, notamment pour les expositions prolongées à 72 h, pour lesquelles des tendances biologiques ont été identifiées mais nécessitent une confirmation expérimentale supplémentaire pour être affirmées.

6.3. Perspectives à long terme et générales

À plus long terme, le système *in vitro* d'exposition dynamique en ALI développé dans ce travail ouvre la voie au développement de modèles plus complexes permettant d'étudier les effets systémiques des polluants atmosphériques au-delà du compartiment pulmonaire. Une évolution particulièrement prometteuse consisterait à développer un modèle multi-organes en ALI qui permettrait d'évaluer les répercussions du passage des particules ultrafines sur les organes vitaux tels que le cœur, le foie, ou encore le cerveau. Celui-ci comprendrait un premier modèle multicellulaire reproduisant une barrière alvéolo-capillaire fonctionnelle, intégrant des cellules épithéliales alvéolaires, des macrophages et

des fibroblastes pulmonaires afin de reproduire de manière réaliste l'architecture du tissu pulmonaire. Un second modèle cellulaire viendrait compléter ce système au niveau du compartiment basal. Ce modèle doit être essentiellement composé d'organoïdes spécifiques d'un organe.

L'intégration d'organoïdes représente une approche particulièrement pertinente, dans la mesure où ces structures tridimensionnelles permettent de reproduire l'architecture cellulaire et fonctionnelle d'organes complexes tout en étant compatibles avec les systèmes d'exposition dynamique en ALI (Yin et al., 2025). L'utilisation de modules d'exposition avancés limitant le contact direct entre l'air et le compartiment basal constituerait une amélioration technique majeure, permettant de réduire les artefacts expérimentaux et d'améliorer la pertinence physiologique du modèle. Dans ce contexte, une perspective particulièrement innovante consisterait à coupler ce modèle pulmonaire à d'autres compartiments biologiques par l'intégration d'organoïdes déjà développés. Ces perspectives apparaissent aujourd'hui techniquement réalisables grâce aux avancées récentes dans le développement de modèles tridimensionnels humains. Le choix des organes cibles à intégrer dans ce modèle multi-organes repose sur des considérations physiologiques et toxicologiques.

Le cœur constitue une cible particulièrement pertinente dans la mesure où le sang oxygéné quittant les poumons est immédiatement redistribué vers la circulation systémique *via* le compartiment cardiaque. Ainsi, toute substance capable de franchir la barrière alvéolo-capillaire peut être rapidement exposée au tissu cardiaque. Par ailleurs, de nombreuses études épidémiologiques ont mis en évidence une association forte entre l'exposition chronique aux $PM_{2.5}$ et l'augmentation du risque de pathologies cardiovasculaires, incluant l'arythmie, l'hypertension et les infarctus du myocarde (de Bont et al., 2022; Abdul-Rahman et al., 2024; Liang et al., 2024; Münzel et al., 2025). L'intégration d'organoïdes cardiaques humains reproduisant des propriétés structurales et électrophysiologiques ont été décrits et utilisés pour l'évaluation de la cardiotoxicité de nombreux composés chimiques (Richards et al., 2017, 2020; Hoang et al., 2021; Kim et al., 2022; Chen et al., 2023; Zhou et al., 2023).

Le foie représente également un organe d'intérêt majeur en toxicologie, en raison de son rôle central dans les processus de biotransformation et de détoxification des xénobiotiques (Grant, 1991; Almazroo et al., 2017; Bissig et al., 2018; Alnasser, 2025). Il constitue ainsi un compartiment clé pour l'étude du devenir métabolique des composés inhalés et de leurs éventuels métabolites toxiques ainsi que pour les pathologies hépatiques en découlant. Par ailleurs, des organoïdes hépatiques fonctionnels capables de reproduire certaines activités métaboliques clés, notamment celles impliquées dans la biotransformation des xénobiotiques, ont été développés et sont aujourd'hui utilisés en toxicologie prédictive (Prior et al., 2019; Brooks et al., 2021; Afonso et al., 2024; Shao et al., 2025).

Le cerveau constitue également une cible d'intérêt croissant dans l'étude des effets systémiques des polluants atmosphériques. En effet, certaines particules ultrafines, et les composés chimiques associés, sont susceptibles de franchir la barrière alvéolo-capillaire, d'entrer dans la circulation sanguine et, dans certaines conditions, d'atteindre le système nerveux central après franchissement de la barrière hémato-encéphalique (Heusinkveld et al., 2016; Iqubal et al., 2020; Fu et al., 2022). Par ailleurs, un nombre croissant d'études épidémiologiques et expérimentales suggère une association entre l'exposition chronique aux $PM_{2.5}$ et le développement ou l'aggravation de pathologies neurologiques, incluant notamment les troubles neurodéveloppementaux, les maladies neurodégénératives et certaines pathologies inflammatoires du système nerveux central (Fu et al., 2019; Zammit et al., 2021; Louis et al., 2023). L'étude du compartiment cérébral apparaît ainsi comme une extension pertinente pour mieux comprendre les effets à long terme des polluants inhalés sur des organes distants (Armstrong, 2020; Costa et al., 2020; Noorimotlagh et al., 2021; Lotfi et al., 2022; Mohammadi et al., 2022; Hussain et al., 2023; Gouider et al., 2024; Olloquequi et al., 2024; Dorsey et al., 2025). L'intégration de neurosphères pourrait permettre d'explorer l'impact potentiel des particules atmosphériques sur le neurodéveloppement ou plus particulièrement sur la myélinisation ou la dégénérescence impliquer dans l'apparition de pathologies neurodégénératives majeures telles que la maladie d'Alzheimer ou de Parkinson (Qian et al., 2019; Fan et al., 2022; Li et al., 2022; Li et al., 2024; Xie et al., 2025). Une telle approche permettrait d'étudier le passage potentiel de composés à travers la barrière pulmonaire et d'évaluer leurs effets sur des tissus distants,

contribuant ainsi à mieux comprendre les liens émergents entre pollution atmosphérique et pathologies neurologiques. Ce modèle constituerait une base particulièrement intéressante, bien que certaines limitations demeurent. En effet, la simulation de la barrière hémato-encéphalique n'est pas prise en compte et pour cela, il faudrait réaliser un système de double membrane par inserts qui nécessite un développement important et particulier. Ce projet reste tout de même réalisable et serait extrêmement intéressant.

Dans un contexte plus global, ces développements pourraient contribuer à l'émergence de plateformes expérimentales intégrées dédiées à l'évaluation toxicologique de polluants atmosphériques dans des conditions d'exposition toujours plus représentatives de l'environnement réel. De telles plateformes permettraient non seulement d'étudier des composés ciblés, mais également d'exposer les modèles cellulaires à des mélanges complexes issus de l'air ambiant, ou de diverses sources de particules anthropiques (e.g. émissions de combustion véhiculaire, émissions hors-échappement, émissions liées aux activités culinaires ou industrielles, etc.), naturelles (e.g., feux de forêt), primaires et secondaires (notamment AOS d'origine biogénique et issus l'oxydation de VCPs – volatile chemical products provenants de solvants, adhésifs, produits d'entretiens, soins personnels, encres, pesticides, peintures, etc.).

L'étude directe de l'air ambiant constitue également une étape essentielle pour mieux comprendre l'impact global des expositions environnementales quotidiennes, caractérisées par des mélanges dynamiques et difficilement reproductibles par des systèmes modèles simplifiés. Par ailleurs, ces approches pourraient être étendues à l'évaluation de polluants émergents d'intérêt croissant, tels que les composés per- et polyfluoroalkylés (PFAS) ou les micro- et nanoplastiques, dont la présence dans l'atmosphère suscite un intérêt scientifique et réglementaire croissant mais où l'exposition par inhalation est encore peu abordée (Dragon et al., 2023; Li, Tao, et al., 2023; Rafiee et al., 2024; Sands et al., 2025; Dameris et al., 2026). L'étude de ces contaminants dans des modèles multicellulaires avancés permettrait d'évaluer non seulement leur toxicité pulmonaire directe, mais également leurs effets systémiques potentiels après franchissement des barrières biologiques.

Une telle approche s'inscrirait pleinement dans les enjeux actuels liés à la surveillance de la qualité de l'air et à l'identification des risques sanitaires associés à des expositions environnementales complexes et multi-polluants. À terme, le développement de plateformes expérimentales intégrées pourrait contribuer à la production de données mécanistiques robustes, utiles pour l'amélioration des modèles d'évaluation des risques sanitaires, la définition de seuils réglementaires plus pertinents et l'adaptation des stratégies de gestion de la qualité de l'air dans un contexte marqué par l'évolution des sources d'émission et des conditions climatiques.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

Abbas, I., Badran, G., Verdin, A. et al. (2018). Polycyclic aromatic hydrocarbon derivatives in airborne particulate matter: sources, analysis and toxicity. *Environ Chem Lett 16*, 439–475. https://doi.org/10.1007/s10311-017-0697-0.

Abdul-Rahman, T., Roy, P., Bliss, Z. S. B. et al. (2024). The impact of air quality on cardiovascular health: A state of the art review. *Current Problems in Cardiology 49*, 102174. https://doi.org/10.1016/j.cpcardiol.2023.102174.

Abo, K. M., Sainz de Aja, J., Lindstrom-Vautrin, J. et al. (2022). Air-liquid interface culture promotes maturation and allows environmental exposure of pluripotent stem cell–derived alveolar epithelium. *JCI Insight 7*, e155589. https://doi.org/10.1172/jci.insight.155589.

Afonso, M. B., Marques, V., van Mil, S. W. C. et al. (2024). Human liver organoids: From generation to applications. *Hepatology 79*, 1432–1451. https://doi.org/10.1097/HEP.0000000000000343.

Agarwal, S., Tomar, N., Makwana, M. et al. (2024). Air pollution, dysbiosis and diseases: pneumonia, asthma, COPD, lung cancer and irritable bowel syndrome. *Future Microbiol 19*, 1497–1513. https://doi.org/10.1080/17460913.2024.2401263.

Ahern, A. T., Robinson, E. S., Tkacik, D. S. et al. (2019). Production of Secondary Organic Aerosol During Aging of Biomass Burning Smoke From Fresh Fuels and Its Relationship to VOC Precursors. *Journal of Geophysical Research: Atmospheres 124*, 3583–3606. https://doi.org/10.1029/2018JD029068.

Ahmed, C. M. S., Cui, Y., Frie, A. L. et al. (2019). Exposure to Dimethyl Selenide (DMSe)-Derived Secondary Organic Aerosol Alters Transcriptomic Profiles in Human Airway Epithelial Cells. *Environ Sci Technol 53*, 14660–14669. https://doi.org/10.1021/acs.est.9b04376.

Akherati, A., He, Y., Coggon, M. M. et al. (2020). Oxygenated Aromatic Compounds are Important Precursors of Secondary Organic Aerosol in Biomass Burning Emissions. *Environ Sci Technol*. Available at: https://doi.org/10.1021/acs.est.0c01345 [Accessed June 22, 2020].

Albanese, A., Tang, P. S. and Chan, W. C. W. (2012). The effect of nanoparticle size, shape, and surface chemistry on biological systems. *Annu Rev Biomed Eng 14*, 1–16. https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-071811-150124.

Albinet, A., Mais, A. E. R. E., Noblet, C. et al. (2023). Differential toxicological potential of the main sources contributing to the particle pollution events observed in France. In *Scientific Research Abstract*. Bari (IT), Italy: Digilabs. Available at: https://univ-smb.hal.science/hal-04417007 [Accessed April 21, 2026].

Albinet, A., Petit, J.-E., Lambe, A. T. et al. (2019). Overview of the ACMCC particulate organonitrates (pON) experiment. Portland, OR, USA.

Alcorn, J. L. (2017). Chapter 4 - Pulmonary Surfactant Trafficking and Homeostasis. In V. K. Sidhaye and M. Koval (eds.), *Lung Epithelial Biology in the Pathogenesis of Pulmonary Disease* (59–75). Boston: Academic Press. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803809-3.00004-X.

Allouche, Y. (2020). *Caractérisation chimique et compréhension des mécanismes de formation des organonitrates particulaires*. INERIS.

Allouche, Y., Marchetti, S., Bengalli, R. et al. (2025). Comparison of submerged and air liquid interface exposure: limitations and differences in the toxicological effects evaluated in bronchial epithelial cells. *Environ Res 279*, 121856. https://doi.org/10.1016/j.envres.2025.121856.

Almazroo, O. A., Miah, M. K. and Venkataramanan, R. (2017). Drug Metabolism in the Liver. *Clin Liver Dis 21*, 1–20. https://doi.org/10.1016/j.cld.2016.08.001.

Alnasser, S. M. (2025). From gut to liver: organoids as platforms for next-generation toxicology assessment vehicles for xenobiotics. *Stem Cell Res Ther 16*, 150. https://doi.org/10.1186/s13287-025-04264-y.

Alunni, A., Simonin, O., Barbier, G. et al. (2026). A549 and Ci-hAELVi cell lines coculture as a new human alveolar epithelium model for air-liquid interface exposure. *Toxicology in Vitro 112*, 106200. https://doi.org/10.1016/j.tiv.2026.106200.

An, J., He, H., Wang, L. et al. (2019). Fresh and ozonized black carbon promoted DNA damage and repair responses in A549 cells. *Toxicol Res 8*, 180–187. https://doi.org/10.1039/c8tx00281a.

An, J., Zhou, Q., Qian, G. et al. (2017). Comparison of gene expression profiles induced by fresh or ozone-oxidized black carbon particles in A549 cells. *Chemosphere 180*, 212–220. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.04.001.

An, Z., Liu, G., Shen, L. et al. (2024). Mitochondrial dysfunction induced by ambient fine particulate matter and potential mechanisms. *Environ Res 262*, 119930. https://doi.org/10.1016/j.envres.2024.119930.

Anderson, J. O., Thundiyil, J. G. and Stolbach, A. (2012). Clearing the Air: A Review of the Effects of Particulate Matter Air Pollution on Human Health. *J Med Toxicol 8*, 166–175. https://doi.org/10.1007/s13181-011-0203-1.

Anderson, S. E., Jackson, L. G., Franko, J. et al. (2010). Evaluation of Dicarbonyls Generated in a Simulated Indoor Air Environment Using an In Vitro Exposure System. *Toxicological Sciences 115*, 453–461. https://doi.org/10.1093/toxsci/kfq067.

Anderson, S. E., Khurshid, S. S., Meade, B. J. et al. (2013). Toxicological analysis of limonene reaction products using an *in vitro* exposure system. *Toxicology in Vitro 27*, 721–730. https://doi.org/10.1016/j.tiv.2012.11.017.

Andreae, M. O. (2019). Emission of trace gases and aerosols from biomass burning – an updated assessment. *Atmospheric Chemistry and Physics 19*, 8523–8546. https://doi.org/10.5194/acp-19-8523-2019.

Andreae, M. O. and Merlet, P. (2001). Emission of trace gases and aerosols from biomass burning. *Global Biogeochemical Cycles 15*, 955–966. https://doi.org/10.1029/2000GB001382.

Anenberg, S. C., Henze, D. K., Tinney, V. et al. (2018). Estimates of the Global Burden of Ambient PM2.5, Ozone, and NO2 on Asthma Incidence and Emergency Room Visits. *Environ Health Perspect 126*, 107004. https://doi.org/10.1289/EHP3766.

Anita, W. M., Ueda, K., Uttajug, A. et al. (2023). Association between Long-Term Ambient PM2.5 Exposure and under-5 Mortality: A Scoping Review. *Int J Environ Res Public Health 20*, 3270. https://doi.org/10.3390/ijerph20043270.

Antiñolo, M., Willis, M. D., Zhou, S. et al. (2015). Connecting the oxidation of soot to its redox cycling abilities. *Nat Commun 6*, 6812. https://doi.org/10.1038/ncomms7812.

Apte, J. S., Marshall, J. D., Cohen, A. J. et al. (2015). Addressing Global Mortality from Ambient PM2.5. *Environ Sci Technol 49*, 8057–8066. https://doi.org/10.1021/acs.est.5b01236.

Arashiro, M., Lin, Y.-H., Sexton, K. G. et al. (2016). In vitro exposure to isoprene-derived secondary organic aerosol by direct deposition and its effects on *COX-2* and *IL-8* gene expression. *Atmospheric Chemistry and Physics 16*, 14079–14090. https://doi.org/10.5194/acp-16-14079-2016.

Araujo, J. A. and Nel, A. E. (2009). Particulate matter and atherosclerosis: role of particle size, composition and oxidative stress. *Part Fibre Toxicol 6*, 24. https://doi.org/10.1186/1743-8977-6-24.

Arfin, T., Pillai, A. M., Mathew, N. et al. (2023). An overview of atmospheric aerosol and their effects on human health. *Environ Sci Pollut Res 30*, 125347–125369. https://doi.org/10.1007/s11356-023-29652-w.

Arias-Pérez, R. D., Taborda, N. A., Gómez, D. M. et al. (2020). Inflammatory effects of particulate matter air pollution. *Environ Sci Pollut Res Int 27*, 42390–42404. https://doi.org/10.1007/s11356-020-10574-w.

Armstrong, R. (2020). What causes neurodegenerative disease? *Folia Neuropathol 58*, 93–112. https://doi.org/10.5114/fn.2020.96707.

Asaf, D., Tas, E., Pedersen, D. et al. (2010). Long-Term Measurements of NO3 Radical at a Semiarid Urban Site: 2. Seasonal Trends and Loss Mechanisms. *Environ Sci Technol 44*, 5901–5907. https://doi.org/10.1021/es100967z.

Asgharian, B., Hofmann, W. and Bergmann, R. (2001). Particle Deposition in a Multiple-Path Model of the Human Lung. *Aerosol Science and Technology 34*, 332–339. https://doi.org/10.1080/02786820119122.

Ashrin, A., Anna, E., Peyret, E. et al. (2025). Evaluation of the toxicity of combustion smokes at the air–liquid interface: a comparison between two lung cell models and two exposure methods. *Arch Toxicol 99*, 1471–1484. https://doi.org/10.1007/s00204-025-03964-x.

Asimakopoulou, A., Daskalos, E., Lewinski, N. et al. (2013). Development of a dose-controlled multiculture cell exposure chamber for efficient delivery of airborne and engineered nanoparticles. *J Phys: Conf Ser 429*, 012023. https://doi.org/10.1088/1742-6596/429/1/012023.

Atkinson, R. and Arey, J. (2007). Mechanisms of the Gas-Phase Reactions of Aromatic Hydrocarbons and Pahs with Oh and No 3 Radicals. *Polycyclic Aromatic Compounds 27*, 15–40. https://doi.org/10.1080/10406630601134243.

Atkinson, R. W., Kang, S., Anderson, H. R. et al. (2014). Epidemiological time series studies of PM2.5 and daily mortality and hospital admissions: a systematic review and meta-analysis. *Thorax 69*, 660–665. https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2013-204492.

ATSDR (2023). *Toxicological Profile for Nitrophenols*. Atlanta (GA): Agency for Toxic Substances and Disease Registry (US). Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK601142/ [Accessed January 29, 2026].

Aufderheide, M., Halter, B., Möhle, N. et al. (2013). The CULTEX RFS: A Comprehensive Technical Approach for the *In Vitro* Exposure of Airway Epithelial Cells to the Particulate Matter at the Air-Liquid Interface. *BioMed Research International 2013*, e734137. https://doi.org/10.1155/2013/734137.

Aufderheide, M. and Mohr, U. (1999). CULTEX — a new system and technique for the cultivation and exposure of cells at the air/liquid interface. *Experimental and Toxicologic Pathology 51*, 489–490. https://doi.org/10.1016/S0940-2993(99)80121-3.

Aufderheide, M., Scheffler, S., Möhle, N. et al. (2011). Analytical in vitro approach for studying cyto- and genotoxic effects of particulate airborne material. *Anal Bioanal Chem 401*, 3213–3220. https://doi.org/10.1007/s00216-011-5163-4.

Augustin, P., Billet, S., Crumeyrolle, S. et al. (2020). Impact of Sea Breeze Dynamics on Atmospheric Pollutants and Their Toxicity in Industrial and Urban Coastal Environments. *Remote Sensing 12*, 648. https://doi.org/10.3390/rs12040648.

Baber, O., Jang, M., Barber, D. et al. (2011). Amorphous silica coatings on magnetic nanoparticles enhance stability and reduce toxicity to in vitro BEAS-2B cells. *Inhalation Toxicology 23*, 532–543. https://doi.org/10.3109/08958378.2011.592869.

Baeza, A. and Marano, F. (2007). Pollution atmosphérique et maladies respiratoires - Un rôle central pour le stress oxidant. *Med Sci (Paris) 23*, 497–501. https://doi.org/10.1051/medsci/2007235497.

Bai, R., Guan, L., Zhang, W. et al. (2016). Comparative study of the effects of PM1-induced oxidative stress on autophagy and surfactant protein B and C expressions in lung alveolar type II epithelial MLE-12 cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects 1860*, 2782–2792. https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2016.05.020.

Baldassi, D., Gabold, B. and Merkel, O. M. (2021). Air−Liquid Interface Cultures of the Healthy and Diseased Human Respiratory Tract: Promises, Challenges, and Future Directions. *Advanced NanoBiomed Research 1*, 2000111. https://doi.org/10.1002/anbr.202000111.

Bannuscher, A., Schmid, O., Drasler, B. et al. (2022). An inter-laboratory effort to harmonize the cell-delivered in vitro dose of aerosolized materials. *NanoImpact 28*, 100439. https://doi.org/10.1016/j.impact.2022.100439.

Baranov, M. V., Kumar, M., Sacanna, S. et al. (2020). Modulation of Immune Responses by Particle Size and Shape. *Front Immunol 11*, 607945. https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.607945.

Barkauskas, C. E., Chung, M.-I., Fioret, B. et al. (2017). Lung organoids: current uses and future promise. *Development 144*, 986–997. https://doi.org/10.1242/dev.140103.

Barkauskas, C. E., Cronce, M. J., Rackley, C. R. et al. (2013). Type 2 alveolar cells are stem cells in adult lung. *J Clin Invest 123*, 3025–3036. https://doi.org/10.1172/JCI68782.

Barone, G., Staples, C. J., Ganesh, A. et al. (2016). Human CDK18 promotes replication stress signaling and genome stability. *Nucleic Acids Res 44*, 8772–8785. https://doi.org/10.1093/nar/gkw615.

Barosova, H., Meldrum, K., Karakocak, B. B. et al. (2021). Inter-laboratory variability of A549 epithelial cells grown under submerged and air-liquid interface conditions. *Toxicol In Vitro 75*, 105178. https://doi.org/10.1016/j.tiv.2021.105178.

Bateman, J. W. P., Meldrum, K., Mitchell, S. M. et al. (2025). A human relevant in vitro alveolar epithelial barrier model to assess inhaled pollutant hazard. *Sci Rep 15*, 39909. https://doi.org/10.1038/s41598-025-23768-4.

Bates, J. T., Fang, T., Verma, V. et al. (2019). Review of Acellular Assays of Ambient Particulate Matter Oxidative Potential: Methods and Relationships with Composition, Sources, and Health Effects. *Environ Sci Technol 53*, 4003–4019. https://doi.org/10.1021/acs.est.8b03430.

Baudic, A., Gros, V., Sauvage, S. et al. (2016). Seasonal variability and source apportionment of volatile organic compounds (VOCs) in the Paris megacity (France). *Atmos Chem Phys 16*, 11961–11989. https://doi.org/10.5194/acp-16-11961-2016.

Baumgartner, J., Zhang, Y., Schauer, J. J. et al. (2014). Highway proximity and black carbon from cookstoves as a risk factor for higher blood pressure in rural China. *Proceedings of the National Academy of Sciences 111*, 13229–13234. https://doi.org/10.1073/pnas.1317176111.

Bausch, C., Peekhaus, N., Utz, C. et al. (1998). Sequence analysis of the GntII (subsidiary) system for gluconate metabolism reveals a novel pathway for L-idonic acid catabolism in Escherichia coli. *J Bacteriol 180*, 3704–3710. https://doi.org/10.1128/JB.180.14.3704-3710.1998.

Becker, S., Dailey, L., Soukup, J. M. et al. (2005). TLR-2 is involved in airway epithelial cell response to air pollution particles. *Toxicology and Applied Pharmacology 203*, 45–52. https://doi.org/10.1016/j.taap.2004.07.007.

Beers, M. F., Atochina, E. N., Preston, A. M. et al. (1999). Inhibition of lung surfactant protein B expression during *Pneumocystis carinii* pneumonia in mice. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine 133*, 423–433. https://doi.org/10.1016/S0022-2143(99)90019-7.

Bellussi, L. M., Iosif, C., Sarafoleanu, C. et al. (2013). Are HMGB1 protein expression and secretion markers of upper airways inflammatory diseases. *J Biol Regul Homeost Agents 27*, 791–804

Berggren-Nylund, R., Ryde, M., Löfdahl, A. et al. (2023). Effects of hypoxia on bronchial and alveolar epithelial cells linked to pathogenesis in chronic lung disorders. *Front Physiol 14*, 1094245. https://doi.org/10.3389/fphys.2023.1094245.

Berndt, T. and Böge, O. (2003). Gas-phase reaction of OH radicals with phenol. *Phys Chem Chem Phys 5*, 342–350. https://doi.org/10.1039/B208187C.

Bertrand, A., Stefenelli, G., Bruns, E. A. et al. (2017). Primary emissions and secondary aerosol production potential from woodstoves for residential heating: Influence of the stove technology and combustion efficiency. *Atmospheric Environment 169*, 65–79. https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2017.09.005.

Bessa, M. J., Brandão, F., Fokkens, P. H. B. et al. (2021). In Vitro Toxicity of Industrially Relevant Engineered Nanoparticles in Human Alveolar Epithelial Cells: Air–Liquid Interface versus Submerged Cultures. *Nanomaterials (Basel) 11*, 3225. https://doi.org/10.3390/nano11123225.

Bessaguet, F. and Desmoulière, A. (2021). Les poumons. *Actualités Pharmaceutiques 60*, 55–59. https://doi.org/10.1016/j.actpha.2020.12.017.

Bhatnagar, A. (2022). Cardiovascular Effects of Particulate Air Pollution. *Annu Rev Med 73*, 393–406. https://doi.org/10.1146/annurev-med-042220-011549.

Bhatt, S. P. and Dransfield, M. T. (2013). Chronic obstructive pulmonary disease and cardiovascular disease. *Transl Res 162*, 237–251. https://doi.org/10.1016/j.trsl.2013.05.001.

Bilan de la qualité de l'air extérieur en France en 2022 Données et études statistiques pour le changement climatique, l'énergie, l'environnement, le logement, et les transports. Available at: https://www.statistiques.developpement-durable.gouv.fr/bilan-de-la-qualite-de-lair-exterieur-en-france-en-2022 [Accessed January 15, 2026].

Binder, S., Rastak, N., Karg, E. et al. (2022). Construction of an In Vitro Air-Liquid Interface Exposure System to Assess the Toxicological Impact of Gas and Particle Phase of Semi-Volatile Organic Compounds. *Toxics 10*, 730. https://doi.org/10.3390/toxics10120730.

Birukov, K. G., Jacobson, J. R., Flores, A. A. et al. (2003). Magnitude-dependent regulation of pulmonary endothelial cell barrier function by cyclic stretch. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology 285*, L785–L797. https://doi.org/10.1152/ajplung.00336.2002.

Bissig, K.-D., Han, W., Barzi, M. et al. (2018). P450-Humanized and Human Liver Chimeric Mouse Models for Studying Xenobiotic Metabolism and Toxicity. *Drug Metab Dispos 46*, 1734–1744. https://doi.org/10.1124/dmd.118.083303.

Bitterle, E., Karg, E., Schroeppel, A. et al. (2006). Dose-controlled exposure of A549 epithelial cells at the air–liquid interface to airborne ultrafine carbonaceous particles. *Chemosphere 65*, 1784–1790. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.04.035.

Bluhmki, T., Traub, S., Müller, A.-K. et al. (2021). Functional human iPSC-derived alveolar-like cells cultured in a miniaturized 96-Transwell air–liquid interface model. *Sci Rep 11*, 17028. https://doi.org/10.1038/s41598-021-96565-4.

van den Bogaard, E. H. J., Dailey, L. A., Thorley, A. J. et al. (2009). Inflammatory Response and Barrier Properties of a New Alveolar Type 1-Like Cell Line (TT1). *Pharm Res 26*, 1172–1180. https://doi.org/10.1007/s11095-009-9838-x.

Bolton, J. L., Trush, M. A., Penning, T. M. et al. (2000). Role of Quinones in Toxicology. *Chem Res Toxicol 13*, 135–160. https://doi.org/10.1021/tx9902082.

Bolzacchini, E., Bruschi, M., Hjorth, J. et al. (2001). Gas-Phase Reaction of Phenol with NO3. *Environ Sci Technol 35*, 1791–1797. https://doi.org/10.1021/es001290m.

de Bont, J., Jaganathan, S., Dahlquist, M. et al. (2022). Ambient air pollution and cardiovascular diseases: An umbrella review of systematic reviews and meta-analyses. *Journal of Internal Medicine 291*, 779–800. https://doi.org/10.1111/joim.13467.

Boulé, S., Verhaeghe, L., Courcot, D. et al. (2025). Comparison of the behavior of human lung epithelial cell lines cultured at the air-liquid interface and assessment of their responses after benzo(*a*)pyrene exposure. *Toxicology in Vitro 109*, 106122. https://doi.org/10.1016/j.tiv.2025.106122.

Bowden, D. H. (1984). The alveolar macrophage. *Environ Health Perspect 55*, 327–341. https://doi.org/10.1289/ehp.8455327.

Bowers, E. C., Martin, E. M., Jarabek, A. M. et al. (2021). Ozone Responsive Gene Expression as a Model for Describing Repeat Exposure Response Trajectories and Interindividual Toxicodynamic Variability In Vitro. *Toxicol Sci 185*, 38–49. https://doi.org/10.1093/toxsci/kfab128.

Bowler, R. P. and Crapo, J. D. (2002). Oxidative stress in allergic respiratory diseases. *J Allergy Clin Immunol 110*, 349–356. https://doi.org/10.1067/mai.2002.126780.

Boyd, N. L., Park, H., Yi, H. et al. (2003). Chronic shear induces caveolae formation and alters ERK and Akt responses in endothelial cells. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology 285*, H1113–H1122. https://doi.org/10.1152/ajpheart.00302.2003.

Braakhuis, H. M., Gremmer, E. R., Bannuscher, A. et al. (2023). Transferability and reproducibility of exposed air-liquid interface co-culture lung models. *NanoImpact 31*, 100466. https://doi.org/10.1016/j.impact.2023.100466.

Brandt, R., Timm, S., López, J. L. G. et al. (2020). Metabolic Glycoengineering Enables the Ultrastructural Visualization of Sialic Acids in the Glycocalyx of the Alveolar Epithelial Cell Line hAELVi. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology 8*. https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.614357.

Brauer, M., Roth, G. A., Aravkin, A. Y. et al. (2024). Global burden and strength of evidence for 88 risk factors in 204 countries and 811 subnational locations, 1990–2021: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2021. *The Lancet 403*, 2162–2203. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(24)00933-4.

Bredeck, G., Wahle, T., Kämpfer, A. A. M. et al. (2025). Assessing the toxicity of traffic-derived air pollution using a primary human air-liquid interface airway *in vitro* model. *Environmental Research 285*, 122399. https://doi.org/10.1016/j.envres.2025.122399.

Bressi, M., Cavalli, F., Putaud, J. P. et al. (2021). A European aerosol phenomenology - 7: High-time resolution chemical characteristics of submicron particulate matter across Europe. *Atmospheric Environment: X 10*, 100108. https://doi.org/10.1016/j.aeaoa.2021.100108.

Bridges, J. P., Davis, H. W., Damodarasamy, M. et al. (2000). Pulmonary Surfactant Proteins A and D Are Potent Endogenous Inhibitors of Lipid Peroxidation and Oxidative Cellular Injury *. *Journal of Biological Chemistry 275*, 38848–38855. https://doi.org/10.1074/jbc.M005322200.

Brinchmann, B. C., Skuland, T., Rambøl, M. H. et al. (2018). Lipophilic components of diesel exhaust particles induce pro-inflammatory responses in human endothelial cells through AhR dependent pathway(s). *Part Fibre Toxicol 15*, 21. https://doi.org/10.1186/s12989-018-0257-1.

Brook, R. D. (2008). Cardiovascular effects of air pollution. *Clin Sci (Lond) 115*, 175–187. https://doi.org/10.1042/CS20070444.

Brookes, O., Boland, S., Kuen, R. L. et al. (2021). Co-culture of type I and type II pneumocytes as a model of alveolar epithelium. *PLOS ONE 16*, e0248798. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0248798.

Brooks, A., Liang, X., Zhang, Y. et al. (2021). Liver organoid as a 3D in vitro model for drug validation and toxicity assessment. *Pharmacol Res 169*, 105608. https://doi.org/10.1016/j.phrs.2021.105608.

Brown, S. S. and Stutz, J. (2012). Nighttime radical observations and chemistry. *Chem Soc Rev 41*, 6405–6447. https://doi.org/10.1039/c2cs35181a.

de Bruijne, K., Ebersviller, S., Sexton, K. G. et al. (2009). Design and Testing of Electrostatic Aerosol In Vitro Exposure System (EAVES): An Alternative Exposure System for Particles. *Inhalation Toxicology 21*, 91–101. https://doi.org/10.1080/08958370802166035.

Brunekreef, B., Strak, M., Chen, J. et al. (2021). Mortality and Morbidity Effects of Long-Term Exposure to Low-Level PM2.5, BC, NO2, and O3: An Analysis of European Cohorts in the ELAPSE Project. *Res Rep Health Eff Inst 2021*, 208

Bruns, E. A., El Haddad, I., Keller, A. et al. (2015). Inter-comparison of laboratory smog chamber and flow reactor systems on organic aerosol yield and composition. *Atmospheric Measurement Techniques 8*, 2315–2332. https://doi.org/10.5194/amt-8-2315-2015.

Bruns, E. A., El Haddad, I., Slowik, J. G. et al. (2016). Identification of significant precursor gases of secondary organic aerosols from residential wood combustion. *Scientific Reports 6*, 27881. https://doi.org/10.1038/srep27881.

Bryan, T. M. and Reddel, R. R. (1994). SV40-induced immortalization of human cells. *Crit Rev Oncog 5*, 331–357. https://doi.org/10.1615/critrevoncog.v5.i4.10.

Buckley, A., Guo, C., Laycock, A. et al. (2024). Aerosol exposure at air-liquid-interface (AE-ALI) in vitro toxicity system characterisation: Particle deposition and the importance of air control responses. *Toxicology in Vitro 100*, 105889. https://doi.org/10.1016/j.tiv.2024.105889.

Bui, T. M., Wiesolek, H. L. and Sumagin, R. (2020). ICAM-1: A master regulator of cellular responses in inflammation, injury resolution, and tumorigenesis. *J Leukoc Biol 108*, 787–799. https://doi.org/10.1002/JLB.2MR0220-549R.

Burke, M., Childs, M. L., de la Cuesta, B. et al. (2023). The contribution of wildfire to PM2.5 trends in the USA. *Nature 622*, 761–766. https://doi.org/10.1038/s41586-023-06522-6.

Burnett, R., Chen, H., Szyszkowicz, M. et al. (2018). Global estimates of mortality associated with long-term exposure to outdoor fine particulate matter. *Proc Natl Acad Sci U S A 115*, 9592–9597. https://doi.org/10.1073/pnas.1803222115.

Buseck, P. R. and Adachi, K. (2008). Nanoparticles in the Atmosphere. *Elements 4*, 389–394. https://doi.org/10.2113/gselements.4.6.389.

Camassa, L. M. A., Elje, E., Mariussen, E. et al. (2022). Advanced Respiratory Models for Hazard Assessment of Nanomaterials-Performance of Mono-, Co- and Tricultures. *Nanomaterials (Basel) 12*, 2609. https://doi.org/10.3390/nano12152609.

Campbell, S. J., Utinger, B., Barth, A. et al. (2025). Short-lived reactive components substantially contribute to particulate matter oxidative potential. *Science Advances 11*, eadp8100. https://doi.org/10.1126/sciadv.adp8100.

Cao, X., Coyle, J. P., Xiong, R. et al. (2021). Invited review: human air-liquid-interface organotypic airway tissue models derived from primary tracheobronchial epithelial cells—overview and perspectives. *In Vitro CellDevBiol-Animal 57*, 104–132. https://doi.org/10.1007/s11626-020-00517-7.

Cappellini, F., Bucchianico, S. D., Karri, V. et al. (2020). Dry Generation of CeO2 Nanoparticles and Deposition onto a Co-Culture of A549 and THP-1 Cells in Air-Liquid Interface—Dosimetry Considerations and Comparison to Submerged Exposure. *Nanomaterials 10*. https://doi.org/10.3390/nano10040618.

Carius, P., Jungmann, A., Bechtel, M. et al. (2023). A Monoclonal Human Alveolar Epithelial Cell Line (“Arlo”) with Pronounced Barrier Function for Studying Drug Permeability and Viral Infections. *Adv Sci (Weinh) 10*, 2207301. https://doi.org/10.1002/advs.202207301.

Carlton, A. G., Wiedinmyer, C. and Kroll, J. H. (2009). A review of Secondary Organic Aerosol (SOA) formation from isoprene. *Atmospheric Chemistry and Physics 9*, 4987–5005. https://doi.org/10.5194/acp-9-4987-2009.

Carvalheira, G., Nozima, B. H. and Cerutti, J. M. (2015). microRNA-106b-mediated down-regulation of C1orf24 expression induces apoptosis and suppresses invasion of thyroid cancer. *Oncotarget 6*, 28357–28370. https://doi.org/10.18632/oncotarget.4947.

Caspersson, T., Zech, L. and Johansson, C. (1999). Analysis of Human Metaphase Chromosome Set by Aid of DNA-Binding Fluorescent Agents. *Experimental Cell Research 253*, 302–304. https://doi.org/10.1006/excr.1999.4745.

CelTox Sampler® MedTec Biolab Inc. *MedTec Biolab Inc*. Available at: https://www.medtecbiolab.com/ [Accessed April 22, 2026].

CEN - EN 12341 (2023). European Committee for Standardization: EN 12341: Ambient air. Standard gravimetric measurement method for the determination of the PM10 or PM2.5 mass concentration of suspended particulate matter, CEN, Brussels (Belgium).

CEN/TS 16645 (2014). XP CEN/TS 16645 - Air ambiant - Mesurage pour la mesure de benz(a)anthracène, benzo(b)fluoranthène, benzo(j)fluoranthène, benzo(k)fluoranthène, dibenz(a,h)anthracène, indéno(1,2,3-cd)pyrène et benzo(ghi)perylène. *Afnor EDITIONS*. Available at: https://www.boutique.afnor.org/fr-fr/norme/xp-cen-ts-16645/air-ambiant-mesurage-pour-la-mesure-de-benzaanthracene-benzobfluoranthene-b/fa173568/43389 [Accessed April 27, 2026].

Cervena, T., Vojtisek-Lom, M., Vrbova, K. et al. (2020). Ordinary Gasoline Emissions Induce a Toxic Response in Bronchial Cells Grown at Air-Liquid Interface. *International Journal of Molecular Sciences 22*. https://doi.org/10.3390/ijms22010079.

Chafe, Z. A., Brauer, M., Klimont, Z. et al. (2014). Household Cooking with Solid Fuels Contributes to Ambient $PM_{2.5}$ Air Pollution and the Burden of Disease. *Environ Health Perspect 122*, 1314–1320. https://doi.org/10.1289/ehp.1206340.

Chakir, J. (2009). Rôle de l'épithélium bronchique dans l'asthme. *Revue Française d'Allergologie 49*, 211–213. https://doi.org/10.1016/j.reval.2009.01.035.

Champion, J. A. and Mitragotri, S. (2009). Shape induced inhibition of phagocytosis of polymer particles. *Pharm Res 26*, 244–249. https://doi.org/10.1007/s11095-008-9626-z.

Champion, J. A., Walker, A. and Mitragotri, S. (2008). Role of particle size in phagocytosis of polymeric microspheres. *Pharm Res 25*, 1815–1821. https://doi.org/10.1007/s11095-008-9562-y.

Chan, A. W. H., Kautzman, K. E., Chhabra, P. S. et al. (2009). Secondary organic aerosol formation from photooxidation of naphthalene and alkylnaphthalenes: implications for oxidation of intermediate volatility organic compounds (IVOCs). *Atmospheric Chemistry and Physics 9*, 3049–3060. https://doi.org/10.5194/acp-9-3049-2009.

Chanput, W., Mes, J. J. and Wichers, H. J. (2014). THP-1 cell line: An in vitro cell model for immune modulation approach. *International Immunopharmacology 23*, 37–45. https://doi.org/10.1016/j.intimp.2014.08.002.

Chary, A., Stoffels, C. B. A., Ribalta, C. et al. (2025). P29-20 Establishing realistic dry aerosol exposure conditions at the Air-Liquid Interface with an *in vitro* alveolar model. *Toxicology Letters 411*, S372–S372b. https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2025.07.861.

Chebaicheb, H. (2024). Guide méthodologique : mesure de la composition chimique des particules submicroniques non réfractaires (NR-PM1) par Aerosol Chemical Speciation Monitor (ACSM) - Révision 2025 | LCSQA. Available at: https://www.lcsqa.org/fr/rapport/guide-methodologique-mesure-de-la-

composition-chimique-des-particules-submicroniques-non [Accessed February 25, 2026].

Chebaicheb, H., de Brito, J. F., Amodeo, T. et al. (2024). Multiyear high-temporal-resolution measurements of submicron aerosols at 13 French urban sites: data processing and chemical composition. *Earth System Science Data 16*, 5089–5109. https://doi.org/10.5194/essd-16-5089-2024.

Chebaicheb, H., F. de Brito, J., Petit, J.-E. et al. (2026). A phenomenology of submicron organic aerosol components in urban France based on long-term online observations and modeling. https://doi.org/10.2139/ssrn.6432988.

Chen, G., Canonaco, F., Tobler, A. et al. (2022). European aerosol phenomenology − 8: Harmonised source apportionment of organic aerosol using 22 Year-long ACSM/AMS datasets. *Environment International 166*, 107325. https://doi.org/10.1016/j.envint.2022.107325.

Chen, G., Dellinger, R. W., Sun, D. et al. (2008). Glucuronidation of tobacco-specific nitrosamines by UGT2B10. *Drug Metab Dispos 36*, 824–830. https://doi.org/10.1124/dmd.107.019406.

Chen, J., Braun, D., Christidis, T. et al. (2023). Long-Term Exposure to Low-Level PM2.5 and Mortality: Investigation of Heterogeneity by Harmonizing Analyses in Large Cohort Studies in Canada, United States, and Europe. *Environ Health Perspect 131*, 127003. https://doi.org/10.1289/EHP12141.

Chen, J. and Hoek, G. (2020). Long-term exposure to PM and all-cause and cause-specific mortality: A systematic review and meta-analysis. *Environment International 143*, 105974. https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.105974.

Chen, J., Hoek, G., de Hoogh, K. et al. (2022). Long-Term Exposure to Source-Specific Fine Particles and Mortality–A Pooled Analysis of 14 European Cohorts within the ELAPSE Project. *Environ Sci Technol 56*, 9277–9290. https://doi.org/10.1021/acs.est.2c01912.

Chen, J., Li, C., Ristovski, Z. et al. (2017). A review of biomass burning: Emissions and impacts on air quality, health and climate in China. *Science of The Total Environment 579*, 1000–1034. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.11.025.

Chen, S. and Schoen, J. (2019). Air-liquid interface cell culture: From airway epithelium to the female reproductive tract. *Reproduction in Domestic Animals 54*, 38–45. https://doi.org/10.1111/rda.13481.

Chen, X., Lu, N., Huang, S. et al. (2023). Assessment of doxorubicin toxicity using human cardiac organoids: A novel model for evaluating drug cardiotoxicity. *Chem Biol Interact 386*, 110777. https://doi.org/10.1016/j.cbi.2023.110777.

Chen, Y., Zhang, L., Wu, Y. et al. (2024). Cytotoxicity and Epithelial Barrier Toxicity of Fine Particles from Residential Biomass Pellet Burning. *Environ Sci Technol 58*, 17786–17796. https://doi.org/10.1021/acs.est.4c04687.

Chen, Y., Zhou, Y., Ren, R. et al. (2024). Harnessing lipid metabolism modulation for improved immunotherapy outcomes in lung adenocarcinoma. *J Immunother Cancer 12*, e008811. https://doi.org/10.1136/jitc-2024-008811.

Cheng, Z., Atwi, K. M., Yu, Z. et al. (2020). Evolution of the light-absorption properties of combustion brown carbon aerosols following reaction with nitrate radicals. *Aerosol Science and Technology 54*, 849–863. https://doi.org/10.1080/02786826.2020.1726867.

Cheung, A. H.-K., Wong, K.-Y., Liu, X. et al. (2023). MLK4 promotes glucose metabolism in lung adenocarcinoma through CREB-mediated activation of phosphoenolpyruvate carboxykinase and is regulated by KLF5. *Oncogenesis 12*, 35. https://doi.org/10.1038/s41389-023-00478-y.

Chhabra, S. and Prasad, A. K. (2010). Flow and particle dispersion in a pulmonary alveolus--part II: effect of gravity on particle transport. *J Biomech Eng 132*, 051010. https://doi.org/10.1115/1.4001113.

Chhabra, S. and Prasad, A. K. (2011). Flow and Particle Dispersion in Lung Acini: Effect of Geometric and Dynamic Parameters During Synchronous Ventilation. *J Fluids Eng 133*, 071001. https://doi.org/10.1115/1.4004362.

Chowdhury, P. H., He, Q., Carmieli, R. et al. (2019). Connecting the Oxidative Potential of Secondary Organic Aerosols with Reactive Oxygen Species in Exposed Lung Cells. *Environ Sci Technol 53*, 13949–13958. https://doi.org/10.1021/acs.est.9b04449.

Chowdhury, P. H., He, Q., Lasitza Male, T. et al. (2018). Exposure of Lung Epithelial Cells to Photochemically Aged Secondary Organic Aerosol Shows Increased Toxic Effects. *Environ Sci Technol Lett 5*, 424–430. https://doi.org/10.1021/acs.estlett.8b00256.

Chowdhury, S., Pozzer, A., Haines, A. et al. (2022). Global health burden of ambient PM2.5 and the contribution of anthropogenic black carbon and organic aerosols. *Environment International 159*, 107020. https://doi.org/10.1016/j.envint.2021.107020.

Ciarelli, G., Aksoyoglu, S., Haddad, I. E. et al. (2017). Modelling winter organic aerosol at the European scale with CAMx: evaluation and source apportionment with a VBS parameterization based on novel wood burning smog chamber experiments. *Atmospheric Chemistry and Physics 17*, 7653–7669. https://doi.org/https://doi.org/10.5194/acp-17-7653-2017.

CITEPA (2025). CITEPA: Rapport Secten – Emissions de gaz à effet de serre et de polluants atmosphériques 1990-2024., CITEPA (Centre Interprofessionnel Technique d'Etudes de la Pollution Atmosphérique), 2025. Available at:

https://www.citepa.org/donnees-air-climat/donnees-gaz-a-effet-de-serre/secten/ [Accessed April 15, 2026].

Clergé, A., Le Goff, J., Lopez, C. et al. (2019). Oxy-PAHs: occurrence in the environment and potential genotoxic/mutagenic risk assessment for human health. *Critical Reviews in Toxicology 49*, 302–328. https://doi.org/10.1080/10408444.2019.1605333.

Cohen, A. J., Brauer, M., Burnett, R. et al. (2017). Estimates and 25-year trends of the global burden of disease attributable to ambient air pollution: an analysis of data from the Global Burden of Diseases Study 2015. *The Lancet 389*, 1907–1918. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)30505-6.

Cole, F. S. (2003). Surfactant protein B: unambiguously necessary for adult pulmonary function. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology 285*, L540–L542. https://doi.org/10.1152/ajplung.00111.2003.

Collins, T., Read, M. A., Neish, A. S. et al. (1995). Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: NF-kappa B and cytokine-inducible enhancers. *FASEB J 9*, 899–909

Comings, D. E., Kovacs, B. W., Avelino, E. et al. (1975). Mechanisms of chromosome banding. *Chromosoma 50*, 111–145. https://doi.org/10.1007/BF00283236.

Comouth, A., Saathoff, H., Naumann, K.-H. et al. (2013). Modelling and measurement of particle deposition for cell exposure at the air–liquid interface. *Journal of Aerosol Science 63*, 103–114. https://doi.org/10.1016/j.jaerosci.2013.04.009.

Cone, R. A. (2009). Barrier properties of mucus. *Adv Drug Deliv Rev 61*, 75–85. https://doi.org/10.1016/j.addr.2008.09.008.

Conway, D. E., Sakurai, Y., Weiss, D. et al. (2009). Expression of CYP1A1 and CYP1B1 in human endothelial cells: regulation by fluid shear stress. *Cardiovasc Res 81*, 669–677. https://doi.org/10.1093/cvr/cvn360.

Cooper, J. R., Abdullatif, M. B., Burnett, E. C. et al. (2016). Long Term Culture of the A549 Cancer Cell Line Promotes Multilamellar Body Formation and Differentiation towards an Alveolar Type II Pneumocyte Phenotype. *PLoS One 11*, e0164438. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164438.

Coraux, C., Hajj, R., Lesimple, P. et al. (2005). Réparation et régénération de l'épithélium respiratoire. *Med Sci (Paris) 21*, 1063–1069. https://doi.org/10.1051/medsci/200521121063.

Corsini, E., Marinovich, M. and Vecchi, R. (2019). Ultrafine Particles from Residential Biomass Combustion: A Review on Experimental Data and Toxicological Response. *International Journal of Molecular Sciences 20*, 4992. https://doi.org/10.3390/ijms20204992.

Costa, A., de Souza Carvalho-Wodarz, C., Seabra, V. et al. (2019). Triple co-culture of human alveolar epithelium, endothelium and macrophages for studying the interaction of nanocarriers with the air-blood barrier. *Acta Biomater 91*, 235–247. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.04.037.

Costa, L. G., Cole, T. B., Dao, K. et al. (2020). Effects of air pollution on the nervous system and its possible role in neurodevelopmental and neurodegenerative disorders. *Pharmacol Ther 210*, 107523. https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2020.107523.

Crandall, E. D. and Matthay, M. A. (2001). Alveolar Epithelial Transport. *Am J Respir Crit Care Med 163*, 1021–1029. https://doi.org/10.1164/ajrccm.163.4.2006116.

Crenn, V., Sciare, J., Croteau, P. L. et al. (2015). ACTRIS ACSM intercomparison – Part 1: Reproducibility of concentration and fragment results from 13 individual Quadrupole Aerosol Chemical Speciation Monitors (Q-ACSM) and consistency with co-located instruments. *Atmospheric Measurement Techniques 8*, 5063–5087. https://doi.org/10.5194/amt-8-5063-2015.

Crippa, M., DeCarlo, P. F., Slowik, J. G. et al. (2013). Wintertime aerosol chemical composition and source apportionment of the organic fraction in the metropolitan area of Paris. *Atmospheric Chemistry and Physics 13*, 961–981. https://doi.org/10.5194/acp-13-961-2013.

Crutzen, P. J. and Stoermer, E. F. (2000). The 'Anthropocene' (2000). In S. Benner, G. Lax, P. J. Crutzen, et al. (eds.), *Paul J. Crutzen and the Anthropocene: A New Epoch in Earth's History* (19–21). Cham: Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-82202-6_2.

Cui, T., Zeng, Z., Dos Santos, E. O. et al. (2018). Development of a hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) method for the chemical characterization of water-soluble isoprene epoxydiol (IEPOX)-derived secondary organic aerosol. *Environ Sci Process Impacts 20*, 1524–1536. https://doi.org/10.1039/c8em00308d.

Cultex® Cultex® Technology GmbH. *Cultex®*. Available at: https://www.cultex-technology.com/ [Accessed February 10, 2026].

Cunningham, C. X., Williamson, G. J. and Bowman, D. M. J. S. (2024). Increasing frequency and intensity of the most extreme wildfires on Earth. *Nat Ecol Evol 8*, 1420–1425. https://doi.org/10.1038/s41559-024-02452-2.

Czech, H., Pieber, S. M., Tiitta, P. et al. (2017). Time-resolved analysis of primary volatile emissions and secondary aerosol formation potential from a small-scale pellet boiler. *Atmospheric Environment 158*, 236–245. https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2017.03.040.

Dabo, A. J., Geraghty, P., Evgrafov, O. et al. (2026). CXCL11 levels regulate lung Treg responses to deter the onset of HIV-related COPD. *Respir Res 27*, 121. https://doi.org/10.1186/s12931-026-03495-8.

Daellenbach, K. R., Uzu, G., Jiang, J. et al. (2020). Sources of particulate-matter air pollution and its oxidative potential in Europe. *Nature 587*, 414–419. https://doi.org/10.1038/s41586-020-2902-8.

Dagher, Z., Garçon, G., Billet, S. et al. (2006). Activation of different pathways of apoptosis by air pollution particulate matter (PM2.5) in human epithelial lung cells (L132) in culture. *Toxicology 225*, 12–24. https://doi.org/10.1016/j.tox.2006.04.038.

Daigneault, M., Preston, J. A., Marriott, H. M. et al. (2010). The Identification of Markers of Macrophage Differentiation in PMA-Stimulated THP-1 Cells and Monocyte-Derived Macrophages. *PLOS ONE 5*, e8668. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008668.

Dameris, L., Carberry, V., Seifert, C. et al. (2026). Current Status of Per- and Poly-Fluoroalkyl Substances (PFAS) Exposure on Lung Cell Biology and Pulmonary Outcomes along Human Health Risk Assessment Steps. *Curr Allergy Asthma Rep 26*, 30. https://doi.org/10.1007/s11882-026-01273-6.

Das, A., Delaval, M. N., Ihalainen, M. et al. (2025). Technical Note: Quantification of ultrafine particle mass deposition in an *in vitro* air-liquid interface exposure system. *Journal of Aerosol Science*, 106710. https://doi.org/10.1016/j.jaerosci.2025.106710.

De Grove, K. C., Provoost, S., Brusselle, G. G. et al. (2018). Insights in particulate matter-induced allergic airway inflammation: Focus on the epithelium. *Clin Exp Allergy 48*, 773–786. https://doi.org/10.1111/cea.13178.

DeCarlo, P. F., Slowik, J. G., Worsnop, D. R. et al. (2004). Particle Morphology and Density Characterization by Combined Mobility and Aerodynamic Diameter Measurements. Part 1: Theory. *Aerosol Science and Technology 38*, 1185–1205. https://doi.org/10.1080/027868290903907.

Degrendele, C., Collet, S., Mais, A.-E.-R. E. et al. (2022). Primary and secondary emissions of pellets and logwood residential heating appliances: emissions factors, secondary aerosol formation potential and chemical characterization. Available at: https://ineris.hal.science/ineris-03988874 [Accessed April 21, 2026].

Déméautis, T., Delles, M., Tomaz, S. et al. (2022). Pathogenic Mechanisms of Secondary Organic Aerosols. *Chem Res Toxicol 35*, 1146–1161. https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.1c00353.

Deng, F., Shen, L., Wang, H. et al. (2020). Classify multicategory outcome in patients with lung adenocarcinoma using clinical, transcriptomic and clinico-transcriptomic data: machine learning versus multinomial models. *Am J Cancer Res 10*, 4624–4639

Deng, X., Feng, N., Zheng, M. et al. (2017). PM2.5 exposure-induced autophagy is mediated by lncRNA loc146880 which also promotes the migration and invasion of lung cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects 1861*, 112–125. https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2016.11.009.

Deng, X., Rui, W., Zhang, F. et al. (2013). 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 29*, 143–157. https://doi.org/10.1007/s10565-013-9242-5.

Denier van der Gon, H. a. C., Bergström, R., Fountoukis, C. et al. (2015). Particulate emissions from residential wood combustion in Europe – revised estimates and an evaluation. *Atmospheric Chemistry and Physics 15*, 6503–6519. https://doi.org/10.5194/acp-15-6503-2015.

Di Bucchianico, S., Gliga, A. R., Åkerlund, E. et al. (2018). Calcium-dependent cyto- and genotoxicity of nickel metal and nickel oxide nanoparticles in human lung cells. *Part Fibre Toxicol 15*, 32. https://doi.org/10.1186/s12989-018-0268-y.

Diana, P. and Carvalheira, G. M. G. (2022). NIBAN1, Exploring its Roles in Cell Survival Under Stress Context. *Front Cell Dev Biol 10*, 867003. https://doi.org/10.3389/fcell.2022.867003.

Diem, K., Fauler, M., Fois, G. et al. (2020). Mechanical stretch activates piezo1 in caveolae of alveolar type I cells to trigger ATP release and paracrine stimulation of surfactant secretion from alveolar type II cells. *FASEB J 34*, 12785–12804. https://doi.org/10.1096/fj.202000613RRR.

Dilger, A. E., Shelley, J., Bergmark, R. W. et al. (2024). Addressing Climate Health: A Practical Guide to Quantifying and Reducing Health Care-Associated Emissions. *Otolaryngology–Head and Neck Surgery 170*, 981–986. https://doi.org/10.1002/ohn.603.

Ding, J., Cui, X. and Liu, Q. (2017). Emerging role of HMGB1 in lung diseases: friend or foe. *Journal of Cellular and Molecular Medicine 21*, 1046–1057. https://doi.org/10.1111/jcmm.13048.

Ding, J., Guan, Y., Cong, Y. et al. (2020). Single-Particle Analysis for Structure and Iron Chemistry of Atmospheric Particulate Matter. *Anal Chem 92*, 975–982. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b03913.

Ding, Y., Weindl, P., Lenz, A.-G. et al. (2020). Quartz crystal microbalances (QCM) are suitable for real-time dosimetry in nanotoxicological studies using VITROCELL®Cloud cell exposure systems. *Part Fibre Toxicol 17*, 44. https://doi.org/10.1186/s12989-020-00376-w.

Directive 2024/2881 *Directive - EU - 2024/2881*. Available at: https://eur-lex.europa.eu/eli/dir/2024/2881/oj/eng [Accessed August 15, 2025].

Dizdaroglu, M. (2012). Oxidatively induced DNA damage: Mechanisms, repair and disease. *Cancer Letters 327*, 26–47. https://doi.org/10.1016/j.canlet.2012.01.016.

Dockery, D. W., Pope, C. A., Xu, X. et al. (1993). An Association between Air Pollution and Mortality in Six U.S. Cities. *New England Journal of Medicine 329*, 1753–1759. https://doi.org/10.1056/NEJM199312093292401.

Dominici, F., Zanobetti, A., Schwartz, J. et al. (2022). Assessing Adverse Health Effects of Long-Term Exposure to Low Levels of Ambient Air Pollution: Implementation of Causal Inference Methods. *Res Rep Health Eff Inst 2022*, 211

Dong, H., Xia, Y., Qi, J. et al. (2025). lncRNA IGFL2-AS1 mediates NSCLC chemoresistance via YBX1-induced HSPA1A/RAP1 activation. *Cell Mol Biol Lett 30*, 133. https://doi.org/10.1186/s11658-025-00808-5.

Dong, J., Yang, Y. and Zhu, Y. (2022). Recent advances in the understanding of alveolar flow. *Biomicrofluidics 16*, 021502. https://doi.org/10.1063/5.0084415.

Dorsey, E. R., De Miranda, B. R., Hussain, S. et al. (2025). Environmental toxicants and Parkinson's disease: recent evidence, risks, and prevention opportunities. *Lancet Neurol 24*, 976–986. https://doi.org/10.1016/S1474-4422(25)00287-X.

Dos Santos, C. C. and Slutsky, A. S. (2000). Invited Review: Mechanisms of ventilator-induced lung injury: a perspective. *Journal of Applied Physiology 89*, 1645–1655. https://doi.org/10.1152/jappl.2000.89.4.1645.

Doyle, M., Sexton, K. G., Jeffries, H. et al. (2007). Atmospheric photochemical transformations enhance 1,3-butadiene-induced inflammatory responses in human epithelial cells: The role of ozone and other photochemical degradation products. *Chemico-Biological Interactions 166*, 163–169. https://doi.org/10.1016/j.cbi.2006.05.016.

Doyle, M., Sexton, K. G., Jeffries, H. et al. (2004). Effects of 1,3-Butadiene, Isoprene, and Their Photochemical Degradation Products on Human Lung Cells. *Environmental Health Perspectives 112*, 1488–1495. https://doi.org/10.1289/ehp.7022.

Dragon, J., Hoaglund, M., Badireddy, A. R. et al. (2023). Perfluoroalkyl Substances (PFAS) Affect Inflammation in Lung Cells and Tissues. *Int J Mol Sci 24*, 8539. https://doi.org/10.3390/ijms24108539.

Duan, R.-R., Hao, K. and Yang, T. (2020). Air pollution and chronic obstructive pulmonary disease. *Chronic Diseases and Translational Medicine 06*, 260–269. https://doi.org/10.1016/j.cdtm.2020.05.004.

Duester, G. (2008). Retinoic Acid Synthesis and Signaling during Early Organogenesis. *Cell 134*, 921–931. https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.09.002.

Durant, J. L., Lafleur, A. L., Plummer, E. F. et al. (1998). Human Lymphoblast Mutagens in Urban Airborne Particles. *Environ Sci Technol 32*, 1894–1906. https://doi.org/10.1021/es9706965.

Dymicka-Piekarska, V. and Kemona, H. (2009). Does colorectal cancer clinical advancement affect adhesion molecules (sP- selectin, sE- selectin and ICAM-1) concentration? *Thrombosis Research 124*, 80–83. https://doi.org/10.1016/j.thromres.2008.11.021.

Eaves, L. A., Smeester, L., Hartwell, H. J. et al. (2020). Isoprene-Derived Secondary Organic Aerosol Induces the Expression of MicroRNAs Associated with Inflammatory/Oxidative Stress Response in Lung Cells. *Chem Res Toxicol 33*, 381–387. https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.9b00322.

Ebrahimi, B., Molayem, M., Sadr, S. et al. (2025). Particulate Matter (PM) as a Major Threat to Autophagy-Induced Homeostasis Regulation, a Systematic Review of the Literature. *Indoor Air 2025*, 8142593. https://doi.org/10.1155/ina/8142593.

EHC 229 (2003). Selected Nitro- and Nitro-oxy-polycyclic Aromatic Hydrocarbons (EHC 229, 2003). Available at: https://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc229.htm [Accessed January 16, 2026].

El Mais, A. E. R., D'Anna, B., Albinet, A. et al. (2025). *In vitro* assessment of aryl hydrocarbon, estrogen, and androgen receptor-mediated activities of secondary organic aerosols formed from the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons and furans. *Environmental Research 273*, 121220. https://doi.org/10.1016/j.envres.2025.121220.

El Mais, A. E. R., D'Anna, B., Drinovec, L. et al. (2023). Insights into secondary organic aerosol formation from the day- and nighttime oxidation of PAHs and furans in an oxidation flow reactor. *EGUsphere*, 1–34. https://doi.org/10.5194/egusphere-2023-1355.

Elder, A. and Oberdörster, G. (2006). Translocation and effects of ultrafine particles outside of the lung. *Clin Occup Environ Med 5*, 785–796. https://doi.org/10.1016/j.coem.2006.07.003.

Elje, E., Camassa, L. M. A., Shaposhnikov, S. et al. (2024). Toward Standardization of a Lung New Approach Model for Toxicity Testing of Nanomaterials. *Nanomaterials (Basel) 14*, 1888. https://doi.org/10.3390/nano14231888.

Enomoto, T., Shirai, Y., Takeda, Y. et al. (2024). SFTPB in serum extracellular vesicles as a biomarker of progressive pulmonary fibrosis. *JCI Insight 9*, e177937. https://doi.org/10.1172/jci.insight.177937.

Estimates, N. R. C. (US) P. on D. A. A. the A. of R. R. (1991). Breathing, Deposition, and Clearance. In *Comparative Dosimetry of Radon in Mines and Homes*. National Academies Press (US). Available at: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK234222/ [Accessed January 20, 2026].

European Environment Agency (2025). Premature deaths due to exposure to fine particulate matter in Europe. Available at: https://www.eea.europa.eu/en/analysis/indicators/health-impacts-of-exposure-to [Accessed April 13, 2026].

Evtyugina, M., Alves, C., Calvo, A. et al. (2014). VOC emissions from residential combustion of Southern and mid-European woods. *Atmospheric Environment 83*, 90–98. https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2013.10.050.

Fan, M., Xiong, X., Han, L. et al. (2022). SERPINA5 promotes tumour cell proliferation by modulating the PI3K/AKT/mTOR signalling pathway in gastric cancer. *J Cell Mol Med 26*, 4837–4846. https://doi.org/10.1111/jcmm.17514.

Fan, P., Wang, Y., Xu, M. et al. (2022). The Application of Brain Organoids in Assessing Neural Toxicity. *Front Mol Neurosci 15*, 799397. https://doi.org/10.3389/fnmol.2022.799397.

Fang, T., Guo, H., Zeng, L. et al. (2017). Highly Acidic Ambient Particles, Soluble Metals, and Oxidative Potential: A Link between Sulfate and Aerosol Toxicity. *Environ Sci Technol 51*, 2611–2620. https://doi.org/10.1021/acs.est.6b06151.

Fang, Z., Lai, A., Dongmei Cai et al. (2024). Secondary Organic Aerosol Generated from Biomass Burning Emitted Phenolic Compounds: Oxidative Potential, Reactive Oxygen Species, and Cytotoxicity. *Environ Sci Technol 58*, 8194–8206. https://doi.org/10.1021/acs.est.3c09903.

Faust, J. A., Wong, J. P. S., Lee, A. K. Y. et al. (2017). Role of Aerosol Liquid Water in Secondary Organic Aerosol Formation from Volatile Organic Compounds. *Environ Sci Technol 51*, 1405–1413. https://doi.org/10.1021/acs.est.6b04700.

Fehrenbach, H. (2001). Alveolar epithelial type II cell: defender of the alveolus revisited. *Respir Res 2*, 33–46. https://doi.org/10.1186/rr36.

Feng, Y., Li, J., Wang, Y. et al. (2025). Fine particulate matter exposure and cancer risk: a systematic review and meta-analysis of prospective cohort studies. *Rev Environ Health 40*, 792–819. https://doi.org/10.1515/reveh-2024-0171.

Fernandes-Silva, H., Araújo-Silva, H., Correia-Pinto, J. et al. (2020). Retinoic Acid: A Key Regulator of Lung Development. *Biomolecules 10*, 152. https://doi.org/10.3390/biom10010152.

FH JOANNEUM (2022). PEMS – Portable Emission Measurement System. Available at: https://www.fh-joanneum.at/en/research/research-centres/automotive-testing-lab/infrastructure-test-beds/pems-portable-emission-measurement-system/ [Accessed February 11, 2026].

Finewax, Z., de Gouw, J. A. and Ziemann, P. J. (2018). Identification and Quantification of 4-Nitrocatechol Formed from OH and NO3 Radical-Initiated Reactions of Catechol in Air in the Presence of NOx: Implications for Secondary Organic Aerosol Formation from Biomass Burning. *Environ Sci Technol 52*, 1981–1989. https://doi.org/10.1021/acs.est.7b05864.

Fingar, V. H., Taber, S. W., Buschemeyer, W. C. et al. (1997). Constitutive and stimulated expression of ICAM-1 protein on pulmonary endothelial cells in vivo. *Microvasc Res 54*, 135–144. https://doi.org/10.1006/mvre.1997.2034.

Fink, S. L. and Cookson, B. T. (2005). Apoptosis, Pyroptosis, and Necrosis: Mechanistic Description of Dead and Dying Eukaryotic Cells. *Infection and Immunity 73*, 1907–1916. https://doi.org/10.1128/iai.73.4.1907-1916.2005.

Finlayson-Pitts, B. J. and Pitts, J. N. (2000a). CHAPTER 8 - Acid Deposition: Formation and Fates of Inorganic and Organic Acids in the Troposphere. In B. J. Finlayson-Pitts and J. N. Pitts (eds.), *Chemistry of the Upper and Lower Atmosphere* (294–348). San Diego: Academic Press. https://doi.org/10.1016/B978-012257060-5/50010-1.

Finlayson-Pitts, B. J. and Pitts, J. N. (2000b). *Chemistry of the upper and lower atmosphere: theory, experiments, and applications*. Nachdr. San Diego, Calif.: Academic Press. Available at: https://doi.org/10.1016/B978-0-12-257060-5.X5000-X.

Finlayson-Pitts, B. J., Wingen, L. M., Perraud, V. et al. (2020). Open questions on the chemical composition of airborne particles. *Commun Chem 3*, 1–5. https://doi.org/10.1038/s42004-020-00347-4.

Foster, K. A., Oster, C. G., Mayer, M. M. et al. (1998). Characterization of the A549 cell line as a type II pulmonary epithelial cell model for drug metabolism. *Exp Cell Res 243*, 359–366. https://doi.org/10.1006/excr.1998.4172.

Fraire, A. E., Woda, B. A., Savas, L. et al. (2003). Intercellular adhesion molecules (ICAM-1, VCAM-1, and LFA-1) in adenocarcinoma of lung. Technical aspects. *Methods Mol Med 74*, 243–249. https://doi.org/10.1385/1-59259-323-2:243.

Fredoc-Louison, J., Cherrière, M., Rival, B. et al. (2025). Beyond cytotoxicity: pollutant mixtures elicit unconventional epithelial-fibroblast signaling in a human lung air-liquid interface co-culture model. *Front Toxicol 7*, 1722968. https://doi.org/10.3389/ftox.2025.1722968.

Freney, E., Zhang, Y., Croteau, P. et al. (2019). The second ACTRIS inter-comparison (2016) for Aerosol Chemical Speciation Monitors (ACSM): Calibration protocols and instrument performance evaluations. *Aerosol Science and Technology 53*, 830–842. https://doi.org/10.1080/02786826.2019.1608901.

Frijns, E., Verstraelen, S., Stoehr, L. C. et al. (2017). A Novel Exposure System Termed NAVETTA for In Vitro Laminar Flow Electrodeposition of Nanoaerosol and Evaluation of Immune Effects in Human Lung Reporter Cells. *Environ Sci Technol 51*, 5259–5269. https://doi.org/10.1021/acs.est.7b00493.

Fröhlich, E., Bonstingl, G., Höfler, A. et al. (2013). Comparison of two in vitro systems to assess cellular effects of nanoparticles-containing aerosols. *Toxicol In Vitro 27–360*, 409–417. https://doi.org/10.1016/j.tiv.2012.08.008.

Fröhlich, E. and Salar-Behzadi, S. (2014). Toxicological Assessment of Inhaled Nanoparticles: Role of in Vivo, ex Vivo, in Vitro, and in Silico Studies. *International Journal of Molecular Sciences 15*, 4795–4822. https://doi.org/10.3390/ijms15034795.

Fry, J. L., Brown, S. S., Middlebrook, A. M. et al. (2018). Secondary organic aerosol (SOA) yields from NO_3 radical + isoprene based on nighttime aircraft power plant plume transects. *Atmospheric Chemistry and Physics 18*, 11663–11682. https://doi.org/10.5194/acp-18-11663-2018.

Fu, C., Kuang, D., Zhang, H. et al. (2022). Different components of air pollutants and neurological disorders. *Front Public Health 10*, 959921. https://doi.org/10.3389/fpubh.2022.959921.

Fu, P., Guo, X., Cheung, F. M. H. et al. (2019). The association between PM2.5 exposure and neurological disorders: A systematic review and meta-analysis. *Science of The Total Environment 655*, 1240–1248. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.11.218.

Fujitani, Y., Sugaya, Y., Hashiguchi, M. et al. (2015). Particle deposition efficiency at air–liquid interface of a cell exposure chamber. *Journal of Aerosol Science 81*, 90–99. https://doi.org/10.1016/j.jaerosci.2014.10.012.

Fuller, R., Landrigan, P. J., Balakrishnan, K. et al. (2022). Pollution and health: a progress update. *The Lancet Planetary Health 6*, e535–e547. https://doi.org/10.1016/S2542-5196(22)00090-0.

Fung, Y. (1988). A model of the lung structure and its validation. *Journal of Applied Physiology 64*, 2132–2141. https://doi.org/10.1152/jappl.1988.64.5.2132.

Fushimi, A., Nakajima, D., Furuyama, A. et al. (2021). Source contributions to multiple toxic potentials of atmospheric organic aerosols. *Science of The Total Environment 773*, 145614. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145614.

Gamble, J. F. (1998). PM2.5 and mortality in long-term prospective cohort studies: cause-effect or statistical associations? *Environ Health Perspect 106*, 535–549. https://doi.org/10.1289/ehp.98106535.

Gangwar, R. S., Bevan, G. H., Palanivel, R. et al. (2020). Oxidative stress pathways of air pollution mediated toxicity: Recent insights. *Redox Biol 34*, 101545. https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101545.

Gao, S., Jin, L., Liu, G. et al. (2017). Overexpression of RASD1 inhibits glioma cell migration/invasion and inactivates the AKT/mTOR signaling pathway. *Sci Rep 7*, 3202. https://doi.org/10.1038/s41598-017-03612-0.

Gao, W., Guo, L., Yang, Y. et al. (2021). Dissecting the Crosstalk Between Nrf2 and NF-κB Response Pathways in Drug-Induced Toxicity. *Front Cell Dev Biol 9*, 809952. https://doi.org/10.3389/fcell.2021.809952.

Garcia, S. R. (2018). *Catching cellular heterogeneity and differentiation dynamics of normal and pathological airway epithelia through single cell transcriptional profiling*. phdthesis. COMUE Université Côte d'Azur (2015 - 2019). Available at: https://theses.hal.science/tel-02108264 [Accessed March 10, 2026].

Gaschen, A., Lang, D., Kalberer, M. et al. (2010). Cellular responses after exposure of lung cell cultures to secondary organic aerosol particles. *Environ Sci Technol 44*, 1424–1430. https://doi.org/10.1021/es902261m.

Gazdar, A. F., Linnoila, R. I., Kurita, Y. et al. (1990). Peripheral airway cell differentiation in human lung cancer cell lines. *Cancer Res 50*, 5481–5487

Ge, J., Chu, H., Xiao, Q. et al. (2021). BC and 1,4NQ-BC up-regulate the cytokines and enhance IL-33 expression in LPS pretreatment of human bronchial epithelial cells☆. *Environmental Pollution 273*, 116452. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.116452.

George, I. J., Vlasenko, A., Slowik, J. G. et al. (2007). Heterogeneous oxidation of saturated organic aerosols by hydroxyl radicals: uptake kinetics, condensed-phase products, and particle size change. *Atmospheric Chemistry and Physics 7*, 4187–4201. https://doi.org/10.5194/acp-7-4187-2007.

Georgopoulou, M. P., Florou, K., Matrali, A. et al. (2025). Diurnal aging of biomass burning emissions: Impacts on secondary organic aerosol formation and oxidative potential. *EGUsphere*, 1–39. https://doi.org/10.5194/egusphere-2025-2728.

Gettins, P. G. W. (2002). Serpin Structure, Mechanism, and Function. *Chem Rev 102*, 4751–4804. https://doi.org/10.1021/cr010170+.

Ghio, A. J., Dailey, L. A., Richards, J. H. et al. (2009). Acid and organic aerosol coatings on magnetic nanoparticles increase iron concentrations in human airway epithelial cells. *Inhalation Toxicology 21*, 659–667. https://doi.org/10.1080/08958370802406282.

Giard, D. J., Aaronson, S. A., Todaro, G. J. et al. (1973). In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst 51*, 1417–1423. https://doi.org/10.1093/jnci/51.5.1417.

Gminski, R., Tang, T. and Mersch-Sundermann, V. (2010). Cytotoxicity and genotoxicity in human lung epithelial A549 cells caused by airborne volatile organic compounds emitted from pine wood and oriented strand boards. *Toxicology Letters 196*, 33–41. https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2010.03.015.

Godbole, N. M., Chowdhury, A. A., Chataut, N. et al. (2022). Tight Junctions, the Epithelial Barrier, and Toll-like Receptor-4 During Lung Injury. *Inflammation 45*, 2142–2162. https://doi.org/10.1007/s10753-022-01708-y.

Golay, Z. M., Vandergrift, G. W., Kamal, S. et al. (2026). Sunlight can turn smoldering pine wood smoke into a glass. *npj Clean Air 2*, 29. https://doi.org/10.1038/s44407-026-00070-9.

Goldstein, A. H. and Galbally, I. E. (2007). Known and unknown organic constituents in the Earth' s atmosphere. *Environ Sci Technol 41*, 1514–1521. https://doi.org/10.1021/es072476p.

Gong, F.-H., Liu, L., Wang, X. et al. (2025). Ferroptosis induced by environmental pollutants and its health implications. *Cell Death Discov 11*, 20. https://doi.org/10.1038/s41420-025-02305-2.

Gong, L., Huang, D., Shi, Y. et al. (2023). Regulated cell death in cancer: from pathogenesis to treatment. *Chin Med J (Engl) 136*, 653–665. https://doi.org/10.1097/CM9.0000000000002239.

Gonzalez-Rivera, J. C., Baldridge, K. C., Wang, D. S. et al. (2020). Post-transcriptional air pollution oxidation to the cholesterol biosynthesis pathway promotes pulmonary stress phenotypes. *Commun Biol 3*, 392. https://doi.org/10.1038/s42003-020-01118-6.

Gouider, R., Souissi, A., Mrabet, S. et al. (2024). Environmental factors related to multiple sclerosis progression. *J Neurol Sci 464*, 123161. https://doi.org/10.1016/j.jns.2024.123161.

Gould, C. F., Heft-Neal, S., Johnson, M. et al. (2024). Health Effects of Wildfire Smoke Exposure. *Annual Review of Medicine 75*, 277–292. https://doi.org/10.1146/annurev-med-052422-020909.

Graf, J., Trautmann-Rodriguez, M., Sabnis, S. et al. (2023). On the Path to Predicting Immune Responses in the Lung: Modeling the Pulmonary Innate Immune system at the Air-Liquid Interface (ALI). *Eur J Pharm Sci 191*, 106596. https://doi.org/10.1016/j.ejps.2023.106596.

Granja, T., Köhler, D., Mirakaj, V. et al. (2014). Crucial role of Plexin C1 for pulmonary inflammation and survival during lung injury. *Mucosal Immunol 7*, 879–891. https://doi.org/10.1038/mi.2013.104.

Grant, D. M. (1991). Detoxification pathways in the liver. *J Inherit Metab Dis 14*, 421–430. https://doi.org/10.1007/BF01797915.

Gregory, T. J., Longmore, W. J., Moxley, M. A. et al. (1991). Surfactant chemical composition and biophysical activity in acute respiratory distress syndrome. *J Clin Invest 88*, 1976–1981. https://doi.org/10.1172/JCI115523.

Grieshop, A. P., Logue, J. M., Donahue, N. M. et al. (2009). Laboratory investigation of photochemical oxidation of organic aerosol from wood fires 1: measurement and simulation of organic aerosol evolution. *Atmospheric Chemistry and Physics 9*, 1263–1277. https://doi.org/10.5194/acp-9-1263-2009.

Grotberg, J. B., Romanò, F. and Grotberg, J. C. (2025). Flow mechanisms of the air-blood barrier. *PLoS Comput Biol 21*, e1012917. https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1012917.

Gualtieri, M., Grollino, M. G., Consales, C. et al. (2018). Is it the time to study air pollution effects under environmental conditions? A case study to support the shift of *in vitro* toxicology from the bench to the field. *Chemosphere 207*, 552–564. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.05.130.

Gualtieri, M., Melzi, G., Costabile, F. et al. (2024). On the dose-response association of fine and ultrafine particles in an urban atmosphere: toxicological outcomes on bronchial cells at realistic doses of exposure at the Air Liquid Interface. *Chemosphere 366*, 143417. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2024.143417.

Guénette, J., Breznan ,Dalibor and and Thomson, E. M. (2022). Establishing an air-liquid interface exposure system for exposure of lung cells to gases. *Inhalation Toxicology 34*, 80–89. https://doi.org/10.1080/08958378.2022.2039332.

Guenther, A., Hewitt, C. N., Erickson, D. et al. (1995). A global model of natural volatile organic compound emissions. *Journal of Geophysical Research: Atmospheres 100*, 8873–8892. https://doi.org/10.1029/94JD02950.

Guillot, L., Nathan, N., Tabary, O. et al. (2013). Alveolar epithelial cells: Master regulators of lung homeostasis. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 45*, 2568–2573. https://doi.org/10.1016/j.biocel.2013.08.009.

Guo, C., Buckley, A., Robertson, S. et al. (2026). Modulatory effects of CeO2 nanoparticles on bleomycin-induced active pulmonary disease processes in animal and human airway epithelium models. *Part Fibre Toxicol 23*, 5. https://doi.org/10.1186/s12989-026-00658-9.

Guo, M., Tomoshige, K., Meister, M. et al. (2017). Gene signature driving invasive mucinous adenocarcinoma of the lung. *EMBO Mol Med 9*, 462–481. https://doi.org/10.15252/emmm.201606711.

Gurjar, B. R., Molina, L. T. and Ojha, C. S. P. (2010). *Air Pollution: Health and Environmental Impacts*. CRC Press.

Gutleb, A. C., Behrsing, A. C., Burla, S. et al. (2026). Advanced in vitro systems available for respiratory toxicology. , 436–461. https://doi.org/10.1016/B978-0-323-95488-4.00223-0.

Gutleb, A. C., Murugadoss, S., Stępnik, M. et al. (2025). New Approach Methods (NAMs) for genotoxicity assessment of nano- and advanced materials; Advantages and challenges. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis 904*, 503867. https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2025.503867.

Hackenberg, S., Scherzed, A., Technau, A. et al. (2011). Cytotoxic, genotoxic and pro-inflammatory effects of zinc oxide nanoparticles in human nasal mucosa cells in vitro. *Toxicol In Vitro 25*, 657–663. https://doi.org/10.1016/j.tiv.2011.01.003.

Hahad, O., Lelieveld, J., Birklein, F. et al. (2020). Ambient Air Pollution Increases the Risk of Cerebrovascular and Neuropsychiatric Disorders through Induction of Inflammation and Oxidative Stress. *Int J Mol Sci 21*, 4306. https://doi.org/10.3390/ijms21124306.

Hall, S. B., Notter, R. H., Smith, R. J. et al. (1990). Altered function of pulmonary surfactant in fatty acid lung injury. *Journal of Applied Physiology 69*, 1143–1149. https://doi.org/10.1152/jappl.1990.69.3.1143.

Hallquist, M., Wenger, J. C., Baltensperger, U. et al. (2009). The formation, properties and impact of secondary organic aerosol: current and emerging issues. *Atmos Chem Phys 9*, 5155–5236. https://doi.org/10.5194/acp-9-5155-2009.

Hallquist, M., Wenger, J. C., Baltensperger, U. et al. (2009). The formation, properties and impact of secondary organic aerosol: current and emerging issues. *Atmospheric Chemistry and Physics 9*, 5155–5236. https://doi.org/10.5194/acp-9-5155-2009.

Han, J., Wang, S., Yeung, K. et al. (2020). Proteome-wide effects of naphthalene-derived secondary organic aerosol in BEAS-2B cells are caused by short-lived unsaturated carbonyls. *Proceedings of the National Academy of Sciences 117*, 25386–25395. https://doi.org/10.1073/pnas.2001378117.

Han, Z., Miwa, Y., Obikane, H. et al. (2008). Aryl hydrocarbon receptor mediates laminar fluid shear stress-induced CYP1A1 activation and cell cycle arrest in vascular endothelial cells. *Cardiovasc Res 77*, 809–818. https://doi.org/10.1093/cvr/cvm095.

Harrison, M. A. J., Barra, S., Borghesi, D. et al. (2005). Nitrated phenols in the atmosphere: a review. *Atmospheric Environment 39*, 231–248. https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2004.09.044.

Hartikainen, A., Tiitta, P., Ihalainen, M. et al. (2020). Photochemical transformation of residential wood combustion emissions: dependence of organic aerosol composition on OH exposure. *Atmospheric Chemistry and Physics 20*, 6357–6378. https://doi.org/10.5194/acp-20-6357-2020.

Hartikainen, A., Yli-Pirilä, P., Tiitta, P. et al. (2018). Volatile Organic Compounds from Logwood Combustion: Emissions and Transformation under Dark and Photochemical Aging Conditions in a Smog Chamber. *Environ Sci Technol 52*, 4979–4988. https://doi.org/10.1021/acs.est.7b06269.

Harush-Frenkel, O., Debotton, N., Benita, S. et al. (2007). Targeting of nanoparticles to the clathrin-mediated endocytic pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications 353*, 26–32. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.11.135.

Hassanipour, S., Nikbakht, H.-A., Amrane, A. et al. (2023). The Relationship between Air Pollution and Brain Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Ann Glob Health 89*, 45. https://doi.org/10.5334/aogh.3889.

Hatch, L. E., Luo, W., Pankow, J. F. et al. (2015). Identification and quantification of gaseous organic compounds emitted from biomass burning using two-dimensional gas chromatography–time-of-flight mass spectrometry. *Atmospheric Chemistry and Physics 15*, 1865–1899. https://doi.org/https://doi.org/10.5194/acp-15-1865-2015.

Hatch, L. E., Yokelson, R. J., Stockwell, C. E. et al. (2017). Multi-instrument comparison and compilation of non-methane organic gas emissions from biomass burning and implications for smoke-derived secondary organic aerosol precursors. *Atmospheric Chemistry and Physics 17*, 1471–1489. https://doi.org/https://doi.org/10.5194/acp-17-1471-2017.

Hawley, B. and Volckens, J. (2013). Proinflammatory effects of cookstove emissions on human bronchial epithelial cells. *Indoor Air 23*, 4–13. https://doi.org/10.1111/j.1600-0668.2012.00790.x.

He, C., Clifton, O., Felker-Quinn, E. et al. (2021). Interactions between Air Pollution and Terrestrial Ecosystems: Perspectives on Challenges and Future Directions. https://doi.org/10.1175/BAMS-D-20-0066.1.

He, R., Liu, Y., Fu, W. et al. (2024). Mechanisms and cross-talk of regulated cell death and their epigenetic modifications in tumor progression. *Mol Cancer 23*, 267. https://doi.org/10.1186/s12943-024-02172-y.

He, X., Barnett, L. M., Jeon, J. et al. (2024). Real-Time Exposure to 3D-Printing Emissions Elicits Metabolic and Pro-Inflammatory Responses in Human Airway Epithelial Cells. *Toxics 12*, 67. https://doi.org/10.3390/toxics12010067.

Heal, M. R., Kumar, P. and Harrison, R. M. (2012). Particles, air quality, policy and health. *Chem Soc Rev 41*, 6606–6630. https://doi.org/10.1039/C2CS35076A.

Heald, C. L. and Kroll, J. H. (2020). The fuel of atmospheric chemistry: Toward a complete description of reactive organic carbon. *Science Advances 6*, eaay8967. https://doi.org/10.1126/sciadv.aay8967.

Heck, A. J., Ostertag, T., Schnell, L. et al. (2019). Supramolecular Toxin Complexes for Targeted Pharmacological Modulation of Polymorphonuclear Leukocyte Functions. *Advanced Healthcare Materials 8*, 1900665. https://doi.org/10.1002/adhm.201900665.

HEI (2017). State of Global Air/2017. Available at: https://www.stateofglobalair.org/sites/default/files/soga_2017_report.pdf.

Heibati, B., Renz, H. and Lacy, P. (2025). Wildfire and wood smoke effects on human airway epithelial cells: A scoping review. *Environmental Research 272*, 121153. https://doi.org/10.1016/j.envres.2025.121153.

Hein, S., Bur, M., Kolb, T. et al. (2010). The Pharmaceutical Aerosol Deposition Device on Cell Cultures (PADDOCC) In Vitro System: Design and Experimental Protocol. *Altern Lab Anim 38*, 285–295. https://doi.org/10.1177/026119291003800408.

Hein, S., Bur, M., Schaefer, U. F. et al. (2011). A new Pharmaceutical Aerosol Deposition Device on Cell Cultures (PADDOCC) to evaluate pulmonary drug absorption for metered dose dry powder formulations. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 77*, 132–138. https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2010.10.003.

Henriquez, A. R., Godbout-Cheliak, M., Filiatreault, A. et al. (2025). Ozone and particulate matter co-exposure at the air-liquid interface: Establishing an approach to assess pollutant interactions *in vitro*. *Toxicology in Vitro 107*, 106060. https://doi.org/10.1016/j.tiv.2025.106060.

Herich, H., Gianini, M. F. D., Piot, C. et al. (2014). Overview of the impact of wood burning emissions on carbonaceous aerosols and PM in large parts of the Alpine region. *Atmospheric Environment 89*, 64–75. https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2014.02.008.

Heringa, M. F., DeCarlo, P. F., Chirico, R. et al. (2012). Time-Resolved Characterization of Primary Emissions from Residential Wood Combustion Appliances. *Environ Sci Technol 46*, 11418–11425. https://doi.org/10.1021/es301654w.

Heusinkveld, H. J., Wahle, T., Campbell, A. et al. (2016). Neurodegenerative and neurological disorders by small inhaled particles. *Neurotoxicology 56*, 94–106. https://doi.org/10.1016/j.neuro.2016.07.007.

Hiemstra, P. S., McCray, P. B. and Bals, R. (2015). The innate immune function of airway epithelial cells in inflammatory lung disease. *Eur Respir J 45*, 1150–1162. https://doi.org/10.1183/09031936.00141514.

Hiemstra, P. S., Tetley, T. D. and Janes, S. M. (2019). Airway and alveolar epithelial cells in culture. *European Respiratory Journal 54*. https://doi.org/10.1183/13993003.00742-2019.

Hoang, P., Kowalczewski, A., Sun, S. et al. (2021). Engineering spatial-organized cardiac organoids for developmental toxicity testing. *Stem Cell Reports 16*, 1228–1244. https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2021.03.013.

Hoffmann, C., Maglakelidze, M., von Schneidemesser, E. et al. (2022). Asthma and COPD exacerbation in relation to outdoor air pollution in the metropolitan area of Berlin, Germany. *Respir Res 23*, 64. https://doi.org/10.1186/s12931-022-01983-1.

Holder, A. L., Carter, B. J., Goth–Goldstein, R. et al. (2012). Increased cytotoxicity of oxidized flame soot. *Atmospheric Pollution Research 3*, 25–31. https://doi.org/10.5094/APR.2012.001.

Holder, A. L., Lucas, D., Goth-Goldstein, R. et al. (2008). Cellular Response to Diesel Exhaust Particles Strongly Depends on the Exposure Method. *Toxicol Sci 103*, 108–115. https://doi.org/10.1093/toxsci/kfn014.

Holder, A. L. and Marr, L. C. (2013). Toxicity of Silver Nanoparticles at the Air-Liquid Interface. *Biomed Res Int 2013*, 328934. https://doi.org/10.1155/2013/328934.

Holme, J. A., Vondráček, J., Machala, M. et al. (2023). Lung cancer associated with combustion particles and fine particulate matter (PM2.5) - The roles of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and the aryl hydrocarbon receptor (AhR). *Biochemical Pharmacology 216*, 115801. https://doi.org/10.1016/j.bcp.2023.115801.

Holtjer, J. C. S., Bloemsma, L. D., Beijers, R. J. H. C. G. et al. (2023). Identifying risk factors for COPD and adult-onset asthma: an umbrella review. *European Respiratory Review 32*. https://doi.org/10.1183/16000617.0009-2023.

Hopke, P. K., Dai, Q., Li, L. et al. (2020). Global review of recent source apportionments for airborne particulate matter. *Science of The Total Environment 740*, 140091. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140091.

Hoppentocht, M., Hoste, C., Hagedoorn, P. et al. (2014). *In vitro* evaluation of the DP-4M PennCentury™ insufflator. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 88*, 153–159. https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2014.06.014.

Horton, A. A., Fairhurst, S. and Bus, J. S. (1987). Lipid Peroxidation and Mechanisms of Toxicity. *CRC Critical Reviews in Toxicology 18*, 27–79. https://doi.org/10.3109/10408448709089856.

Hou, T., Zhu, L., Wang, Y. et al. (2024). Oxidative stress is the pivot for PM2.5-induced lung injury. *Food Chem Toxicol 184*, 114362. https://doi.org/10.1016/j.fct.2023.114362.

HRH - CES1332 Cell gas exposure instrument for Cell poisoning experiment. Available at: https://www.instrumentstrade.com/hrh-ces1332-cell-gas-exposure-instrument-for-cell-poisoning-experiment_p1563.html [Accessed February 6, 2026].

Hu, X., Li, Z., Lin, R. et al. (2021). Guidelines for Regulated Cell Death Assays: A Systematic Summary, A Categorical Comparison, A Prospective. *Front Cell Dev Biol 9*. https://doi.org/10.3389/fcell.2021.634690.

Huang, F., Pan, B., Wu, J. et al. (2017). Relationship between exposure to PM2.5 and lung cancer incidence and mortality: A meta-analysis. *Oncotarget 8*, 43322–43331. https://doi.org/10.18632/oncotarget.17313.

Huang, Z. and Skidmore, M. (2025). The impacts of wildfires and wildfire-induced air pollution on mortality in the United States. *Environmental Challenges 21*, 101339. https://doi.org/10.1016/j.envc.2025.101339.

Hubrecht, R. C. and Carter, E. (2019). The 3Rs and Humane Experimental Technique: Implementing Change. *Animals (Basel) 9*, 754. https://doi.org/10.3390/ani9100754.

Hufnagel, M., May, N., Wall, J. et al. (2021). Impact of Nanocomposite Combustion Aerosols on A549 Cells and a 3D Airway Model. *Nanomaterials 11*. https://doi.org/10.3390/nano11071685.

Huh, D., Leslie, D. C., Matthews, B. D. et al. (2012). A human disease model of drug toxicity-induced pulmonary edema in a lung-on-a-chip microdevice. *Sci Transl Med 4*, 159ra147. https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3004249.

Hulina, A., Grdić Rajković, M., Jakšić Despot, D. et al. (2018). Extracellular Hsp70 induces inflammation and modulates LPS/LTA-stimulated inflammatory response in THP-1 cells. *Cell Stress and Chaperones 23*, 373–384. https://doi.org/10.1007/s12192-017-0847-0.

Huo, M., Zhang, M., Fan, L. et al. (2026). Tanreqing injection regulates Sema7a/Plxnc1 signaling pathway mediated neutrophil extracellular trap formation to alleviate lipopolysaccharide-induced acute lung injury. *J Ethnopharmacol 363*, 121397. https://doi.org/10.1016/j.jep.2026.121397.

Hurley, K., Ding, J., Villacorta-Martin, C. et al. (2020). Reconstructed Single-Cell Fate Trajectories Define Lineage Plasticity Windows during Differentiation of Human PSC-Derived Distal Lung Progenitors. *Cell Stem Cell 26*, 593-608.e8. https://doi.org/10.1016/j.stem.2019.12.009.

Hussain, R., Graham, U., Elder, A. et al. (2023). Air pollution, glymphatic impairment, and Alzheimer's disease. *Trends Neurosci 46*, 901–911. https://doi.org/10.1016/j.tins.2023.08.010.

Idell, S. (2003). Coagulation, fibrinolysis, and fibrin deposition in acute lung injury. *Crit Care Med 31*, S213-220. https://doi.org/10.1097/01.CCM.0000057846.21303.AB.

Idowu, O., Semple, K. T., Ramadass, K. et al. (2019). Beyond the obvious: Environmental health implications of polar polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environment International 123*, 543–557. https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.12.051.

Ihalainen, M., Jalava, P., Ihantola, T. et al. (2019). Design and validation of an air-liquid interface (ALI) exposure device based on thermophoresis. *Aerosol Science and Technology 53*, 133–145. https://doi.org/10.1080/02786826.2018.1556775.

Ihantola, T., Di Bucchianico, S., Happo, M. et al. (2020). Influence of wood species on toxicity of log-wood stove combustion aerosols: a parallel animal and air-liquid interface cell exposure study on spruce and pine smoke. *Part Fibre Toxicol 17*, 27. https://doi.org/10.1186/s12989-020-00355-1.

Ihantola, T., Hirvonen, M.-R., Ihalainen, M. et al. (2022). Genotoxic and inflammatory effects of spruce and brown coal briquettes combustion aerosols on lung cells at the air-

liquid interface. *Science of The Total Environment 806*, 150489. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150489.

Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC) (2023). *Climate Change 2021 – The Physical Science Basis: Working Group I Contribution to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Cambridge: Cambridge University Press. https://doi.org/10.1017/9781009157896.

Iqubal, A., Ahmed, M., Ahmad, S. et al. (2020). Environmental neurotoxic pollutants: review. *Environ Sci Pollut Res Int 27*, 41175–41198. https://doi.org/10.1007/s11356-020-10539-z.

ISO 12884 (2000). ISO 12884:2000 - Air ambiant — Dosage des hydrocarbures aromatiques polycycliques totales (phase gazeuse et particulaire) — Prélèvement sur filtres à sorption et analyses par chromatographie en phase gazeuse/spectrométrie en masse. *ISO*. Available at: https://www.iso.org/fr/standard/1343.html [Accessed April 27, 2026].

Ito, T., Bekki, K., Fujitani, Y. et al. (2019). The toxicological analysis of secondary organic aerosol in human lung epithelial cells and macrophages. *Environ Sci Pollut Res 26*, 22747–22755. https://doi.org/10.1007/s11356-019-05317-5.

Jaber, N. and Billet, S. (2024). How to use an in vitro approach to characterize the toxicity of airborne compounds. *Toxicol In Vitro 94*, 105718. https://doi.org/10.1016/j.tiv.2023.105718.

Jacob, A., Morley, M., Hawkins, F. et al. (2017). Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells into Functional Lung Alveolar Epithelial Cells. *Cell Stem Cell 21*, 472-488.e10. https://doi.org/10.1016/j.stem.2017.08.014.

Jang, M., Ghio, A. J. and Cao, G. (2006). Exposure of BEAS-2B Cells to Secondary Organic Aerosol Coated on Magnetic Nanoparticles. *Chem Res Toxicol 19*, 1044–1050. https://doi.org/10.1021/tx0503597.

Jarvis, I. W. H., Enlo-Scott, Z., Nagy, E. et al. (2018). Genotoxicity of fine and coarse fraction ambient particulate matter in immortalised normal (TT1) and cancer-derived (A549) alveolar epithelial cells. *Environ Mol Mutagen 59*, 290–301. https://doi.org/10.1002/em.22166.

Jeannet, N., Fierz, M., Kalberer, M. et al. (2015). Nano Aerosol Chamber for In-Vitro Toxicity (NACIVT) studies. *Nanotoxicology 9*, 34–42. https://doi.org/10.3109/17435390.2014.886739.

Ji, J., Hedelin, A., Malmlöf, M. et al. (2017). Development of Combining of Human Bronchial Mucosa Models with XposeALI® for Exposure of Air Pollution Nanoparticles. *PLOS ONE 12*, e0170428. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170428.

Jia, R., Wei, M., Zhang, X. et al. (2022). Pyroptosis participates in PM2.5-induced air-blood barrier dysfunction. *Environ Sci Pollut Res Int 29*, 60987–60997. https://doi.org/10.1007/s11356-022-20098-0.

Jiang, K., Xing, R., Luo, Z. et al. (2024). Pollutant emissions from biomass burning: A review on emission characteristics, environmental impacts, and research perspectives. *Particuology 85*, 296–309. https://doi.org/10.1016/j.partic.2023.07.012.

Jiang, X., Tsona, N. T., Jia, L. et al. (2019). Secondary organic aerosol formation from photooxidation of furan: effects of NO_x and humidity. *Atmospheric Chemistry and Physics 19*, 13591–13609. https://doi.org/10.5194/acp-19-13591-2019.

Jiang, Y., Li, Z., Huang, Z. et al. (2025). Chemerin in Pulmonary Fibrosis: Advances in Mechanistic and Fundamental Research. *Biomolecules 15*, 1469. https://doi.org/10.3390/biom15101469.

Jimenez, J. L., Canagaratna, M. R., Donahue, N. M. et al. (2009). Evolution of organic aerosols in the atmosphere. *Science 326*, 1525–1529. https://doi.org/10.1126/science.1180353.

Joelsson, J. P., Myszor, I. T., Sigurdsson, S. et al. (2020). Azithromycin has lung barrier protective effects in a cell model mimicking ventilator-induced lung injury. *ALTEX - Alternatives to Animal Experimentation 37*, 545–560. https://doi.org/10.14573/altex.2001271.

John, W. (2011). Size Distribution Characteristics of Aerosols in “Aerosol Measurement: Principles, Techniques, and Applications.” In *Aerosol Measurement: Principles, Techniques, and Applications* (41–54). John Wiley & Sons, Ltd. https://doi.org/10.1002/9781118001684.ch4.

Johnson, D., Utembe, S. R. and Jenkin, M. E. (2006). Simulating the detailed chemical composition of secondary organic aerosol formed on a regional scale during the TORCH 2003 campaign in the southern UK. *Atmospheric Chemistry and Physics 6*, 419–431. https://doi.org/10.5194/acp-6-419-2006.

Joo, T., Rogers, M. J., Soong, C. et al. (2024). Aged and Obscured Wildfire Smoke Associated with Downwind Health Risks. *Environ Sci Technol Lett*. https://doi.org/10.1021/acs.estlett.4c00785.

Joshi, N., Walter, J. M. and Misharin, A. V. (2018). Alveolar Macrophages. *Cell Immunol 330*, 86–90. https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2018.01.005.

Juárez-Facio, A. T., Introna, M., Gustavsson, S. Å. et al. (2025). A mobile air-liquid interface exposure system optimized for outdoor toxicity testing of aerosols. *Aerosol Science and Technology 59*, 214–226. https://doi.org/10.1080/02786826.2024.2426487.

Judy, R. M., Sheedy, C. J. and Gardner, B. M. (2022). Insights into the Structure and Function of the Pex1/Pex6 AAA-ATPase in Peroxisome Homeostasis. *Cells 11*, 2067. https://doi.org/10.3390/cells11132067.

Jung, K.-A., Choi, B.-H., Nam, C.-W. et al. (2013). Identification of aldo-keto reductases as NRF2-target marker genes in human cells. *Toxicol Lett 218*, 39–49. https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2012.12.026.

Kamal, R., Srivastava ,Anup Kumar, Kesavachandran ,Chandrasekharan Nair et al. (2022). Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) in women due to indoor biomass burning: a meta analysis. *International Journal of Environmental Health Research 32*, 1403–1417. https://doi.org/10.1080/09603123.2021.1887460.

Kanashova, T., Sippula, O., Oeder, S. et al. (2018). Emissions from a modern log wood masonry heater and wood pellet boiler: Composition and biological impact on air-liquid interface exposed human lung cancer cells. *JMCM 1*, 23–35. https://doi.org/10.31083/j.jmcm.2018.01.004.

Kang, E., Root, M. J., Toohey, D. W. et al. (2007). Introducing the concept of Potential Aerosol Mass (PAM). *Atmospheric Chemistry and Physics 7*, 5727–5744. https://doi.org/10.5194/acp-7-5727-2007.

Karanasiou, A., Alastuey, A., Amato, F. et al. (2021). Short-term health effects from outdoor exposure to biomass burning emissions: A review. *Science of The Total Environment 781*, 146739. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146739.

Kaspar, J. W., Niture, S. K. and Jaiswal, A. K. (2009). Nrf2:INrf2 (Keap1) signaling in oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine 47*, 1304–1309. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.07.035.

Kathiriya, J. J., Wang, C., Zhou, M. et al. (2022). Human alveolar type 2 epithelium transdifferentiates into metaplastic KRT5+ basal cells. *Nat Cell Biol 24*, 10–23. https://doi.org/10.1038/s41556-021-00809-4.

Kautzman, K. E., Surratt, J. D., Chan, M. N. et al. (2010). Chemical Composition of Gas- and Aerosol-Phase Products from the Photooxidation of Naphthalene. *J Phys Chem A 114*, 913–934. https://doi.org/10.1021/jp908530s.

Keller, A. and Burtscher, H. (2017). Characterizing particulate emissions from wood burning appliances including secondary organic aerosol formation potential. *Journal of Aerosol Science 114*, 21–30. https://doi.org/10.1016/j.jaerosci.2017.08.014.

Keller-Rudek, H., Moortgat, G. K., Sander, R. et al. (2013). The MPI-Mainz UV/VIS Spectral Atlas of Gaseous Molecules of Atmospheric Interest. *Earth System Science Data 5*, 365–373. https://doi.org/10.5194/essd-5-365-2013.

Kelly, F. J. (2003). Oxidative stress: its role in air pollution and adverse health effects. *Occup Environ Med 60*, 612–616. https://doi.org/10.1136/oem.60.8.612.

Kelly, F. J. and Fussell, J. C. (2020). Global nature of airborne particle toxicity and health effects: a focus on megacities, wildfires, dust storms and residential biomass burning. *Toxicol Res 9*, 331–345. https://doi.org/10.1093/toxres/tfaa044.

Kelly, F. J. and Fussell, J. C. (2012). Size, source and chemical composition as determinants of toxicity attributable to ambient particulate matter. *Atmospheric Environment 60*, 504–526. https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2012.06.039.

Kelly, F., Kennedy, V., Jain, R. et al. (2012). Epithelial Clara Cell Injury Occurs in Bronchiolitis Obliterans Syndrome after Human Lung Transplantation. *Am J Transplant 12*, 3076–3084. https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2012.04201.x.

Kelly, J. M., Doherty, R. M., O'Connor, F. M. et al. (2018). The impact of biogenic, anthropogenic, and biomass burning volatile organic compound emissions on regional and seasonal variations in secondary organic aerosol. *Atmospheric Chemistry and Physics 18*, 7393–7422. https://doi.org/10.5194/acp-18-7393-2018.

Kelsall, I. R., Voss, M., Munro, S. et al. (2011). R3F, a novel membrane-associated glycogen targeting subunit of protein phosphatase 1 regulates glycogen synthase in astrocytoma cells in response to glucose and extracellular signals. *J Neurochem 118*, 596–610. https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2011.07345.x.

Keyte, I. J., Harrison, R. M. and Lammel, G. (2013). Chemical reactivity and long-range transport potential of polycyclic aromatic hydrocarbons – a review. *Chem Soc Rev 42*, 9333–9391. https://doi.org/10.1039/C3CS60147A.

Khan, F., Jaoui, M., Rudziński, K. et al. (2022). Cytotoxicity and oxidative stress induced by atmospheric mono-nitrophenols in human lung cells. *Environ Pollut 301*, 119010. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.119010.

Khayami, R., Hashemi, S. R. and Kerachian, M. A. (2020). Role of aldo-keto reductase family 1 member B1 (AKR1B1) in the cancer process and its therapeutic potential. *J Cell Mol Med 24*, 8890–8902. https://doi.org/10.1111/jcmm.15581.

Khetan, J., Shahinuzzaman, M., Barua, S. et al. (2019). Quantitative Analysis of the Correlation between Cell Size and Cellular Uptake of Particles. *Biophysical Journal 116*, 347–359. https://doi.org/10.1016/j.bpj.2018.11.3134.

Khomenko, S., Pisoni, E., Thunis, P. et al. (2023). Spatial and sector-specific contributions of emissions to ambient air pollution and mortality in European cities: a health impact assessment. *The Lancet Public Health 8*, e546–e558. https://doi.org/10.1016/S2468-2667(23)00106-8.

Kim, B., Shin, J. H., Kim, H. P. et al. (2022). On-Site Deployment of an Air-Liquid-Interphase Device to Assess Health Hazard Potency of Airborne Workplace Contaminants: The Case of 3-D Printers. *Front Toxicol 4*. https://doi.org/10.3389/ftox.2022.818942.

Kim, D., Chen, Z., Zhou, L.-F. et al. (2018). Air pollutants and early origins of respiratory diseases. *Chronic Dis Transl Med 4*, 75–94. https://doi.org/10.1016/j.cdtm.2018.03.003.

Kim, H., Kamm, R. D., Vunjak-Novakovic, G. et al. (2022). Progress in multicellular human cardiac organoids for clinical applications. *Cell Stem Cell 29*, 503–514. https://doi.org/10.1016/j.stem.2022.03.012.

Kim, J. S., Klösener, J., Flor, S. et al. (2014). Toxicity Assessment of Air-delivered Particle-bound Polybrominated Diphenyl Ethers. *Toxicology 317*, 31–39. https://doi.org/10.1016/j.tox.2014.01.005.

Kim, K.-H., Kabir, E. and Kabir, S. (2015). A review on the human health impact of airborne particulate matter. *Environment International 74*, 136–143. https://doi.org/10.1016/j.envint.2014.10.005.

King, B. M., Janechek, N. J., Bryngelson, N. et al. (2020). Lung cell exposure to secondary photochemical aerosols generated from OH oxidation of cyclic siloxanes. *Chemosphere 241*, 125126. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125126.

King, T. C. (2007). Cell Injury, Cellular Responses to Injury, and Cell Death. *Elsevier's Integrated Pathology, Mosby, Missouri, USA*, Pages 1-20. https://doi.org/10.1016/B978-0-323-04328-1.50007-3.

Kinney, P. L. (2018). Interactions of Climate Change, Air Pollution, and Human Health. *Curr Envir Health Rpt 5*, 179–186. https://doi.org/10.1007/s40572-018-0188-x.

Kiraz, Y., Adan, A., Kartal Yandim, M. et al. (2016). Major apoptotic mechanisms and genes involved in apoptosis. *Tumour Biol 37*, 8471–8486. https://doi.org/10.1007/s13277-016-5035-9.

Klein, S. G., Serchi, T., Hoffmann, L. et al. (2013). An improved 3D tetraculture system mimicking the cellular organisation at the alveolar barrier to study the potential toxic effects of particles on the lung. *Part Fibre Toxicol 10*, 31. https://doi.org/10.1186/1743-8977-10-31.

Kletting, S., Barthold, S., Repnik, U. et al. (2018). Co-culture of human alveolar epithelial (hAELVi) and macrophage (THP-1) cell lines. *ALTEX 35*, 211–222. https://doi.org/10.14573/altex.1607191.

Knaapen, A. M., Borm, P. J. A., Albrecht, C. et al. (2004). Inhaled particles and lung cancer. Part A: Mechanisms. *International Journal of Cancer 109*, 799–809. https://doi.org/10.1002/ijc.11708.

Kocbach Bølling, A., Pagels, J., Yttri, K. E. et al. (2009). Health effects of residential wood smoke particles: the importance of combustion conditions and physicochemical particle properties. *Part Fibre Toxicol 6*, 29. https://doi.org/10.1186/1743-8977-6-29.

Kodros, J. K., Papanastasiou, D. K., Paglione, M. et al. (2020). Rapid dark aging of biomass burning as an overlooked source of oxidized organic aerosol. *Proceedings of the National Academy of Sciences 117*, 33028–33033. https://doi.org/10.1073/pnas.2010365117.

Kogan, V., Millstein, J., London, S. J. et al. (2018). Genetic-Epigenetic Interactions in Asthma Revealed by a Genome-Wide Gene-Centric Search. *Hum Hered 83*, 130–152. https://doi.org/10.1159/000489765.

Kohli, A. K. and Alpar, H. O. (2004). Potential use of nanoparticles for transcutaneous vaccine delivery: effect of particle size and charge. *International Journal of Pharmaceutics 275*, 13–17. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2003.10.038.

Kong, J., An, J., Zhang, D. et al. (2019). Transcriptomic analyses of the biological effects of black carbon exposure to A549 cells. *Journal of Environmental Management 246*, 289–298. https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.05.123.

Kono, M., Takaishi, M., Okuda, T. et al. (2024). A simple air–liquid interface exposure system for exposing cultured human 3D epidermis and cornea to PM2.5 collected through cyclonic separation. *The Journal of Toxicological Sciences 49*, 61–68. https://doi.org/10.2131/jts.49.61.

Koop, T., Bookhold, J., Shiraiwa, M. et al. (2011). Glass transition and phase state of organic compounds: dependency on molecular properties and implications for secondary organic aerosols in the atmosphere. *Physical Chemistry Chemical Physics 13*, 19238–19255. https://doi.org/10.1039/C1CP22617G.

Kotteas, E. A., Boulas, P., Gkiozos, I. et al. (2014). The Intercellular Cell Adhesion Molecule-1 (ICAM-1) in Lung Cancer: Implications for Disease Progression and Prognosis. *Anticancer Research 34*, 4665–4672

Kovacic, P. and Somanathan, R. (2014). Nitroaromatic compounds: Environmental toxicity, carcinogenicity, mutagenicity, therapy and mechanism. *Journal of Applied Toxicology 34*, 810–824. https://doi.org/10.1002/jat.2980.

Koval, L. E., Carberry, C. K., Kim, Y. H. et al. (2022). Wildfire Variable Toxicity: Identifying Biomass Smoke Exposure Groupings through Transcriptomic Similarity Scoring. *Environ Sci Technol 56*, 17131–17142. https://doi.org/10.1021/acs.est.2c06043.

Krapf, M., Künzi, L., Allenbach, S. et al. (2017). Wood combustion particles induce adverse effects to normal and diseased airway epithelia. *Environ Sci Process Impacts 19*, 538–548. https://doi.org/10.1039/c6em00586a.

Kreyling, W. G., Semmler-Behnke, M., Takenaka, S. et al. (2013). Differences in the biokinetics of inhaled nano- versus micron-sized particles. *Acc Chem Res 46*, 714–722. https://doi.org/10.1021/ar300043r.

Krittanawong, C., Qadeer, Y. K., Hayes, R. B. et al. (2023). PM2.5 and cardiovascular diseases: State-of-the-Art review. *Int J Cardiol Cardiovasc Risk Prev 19*, 200217. https://doi.org/10.1016/j.ijcrp.2023.200217.

Krogh, A. and Lindhard, J. (1914). On the average composition of the alveolar air and its variations during the respiratory cycle. *J Physiol 47*, 431–445. https://doi.org/10.1113/jphysiol.1914.sp001635.

Kroll, J. H. and Seinfeld, J. H. (2008). Chemistry of secondary organic aerosol: Formation and evolution of low-volatility organics in the atmosphere. *Atmospheric Environment 42*, 3593–3624. https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2008.01.003.

Kuehn, A. (2016). Human alveolar epithelial cells expressing tight junctions to model the air-blood barrier. *ALTEX*. https://doi.org/10.14573/altex.1511131.

Künzi, L., Mertes, P., Schneider, S. et al. (2013). Responses of lung cells to realistic exposure of primary and aged carbonaceous aerosols. *Atmospheric Environment 68*, 143–150. https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2012.11.055.

Kuroki, Y., Takahashi, H., Chiba, H. et al. (1998). Surfactant proteins A and D: disease markers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease 1408*, 334–345. https://doi.org/10.1016/S0925-4439(98)00079-9.

Küstner, M. J., Eckstein, D., Brauer, D. et al. (2024). Modular air–liquid interface aerosol exposure system (MALIES) to study toxicity of nanoparticle aerosols in 3D-cultured A549 cells in vitro. *Arch Toxicol 98*, 1061–1080. https://doi.org/10.1007/s00204-023-03673-3.

Kwamena, N.-O. A. and Abbatt, J. P. D. (2008). Heterogeneous nitration reactions of polycyclic aromatic hydrocarbons and n-hexane soot by exposure to NO3/NO2/N2O5. *Atmospheric Environment 42*, 8309–8314. https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2008.07.037.

Lacroix, G., Koch, W., Ritter, D. et al. (2018). Air–Liquid Interface In Vitro Models for Respiratory Toxicology Research: Consensus Workshop and Recommendations. *Appl In Vitro Toxicol 4*, 91–106. https://doi.org/10.1089/aivt.2017.0034.

Lai, C.-H., Lee, C.-N., Bai, K.-J. et al. (2016). Protein oxidation and degradation caused by particulate matter. *Sci Rep 6*, 33727. https://doi.org/10.1038/srep33727.

Lai, K., Song, C., Gao, M. et al. (2023). Uridine Alleviates Sepsis-Induced Acute Lung Injury by Inhibiting Ferroptosis of Macrophage. *Int J Mol Sci 24*, 5093. https://doi.org/10.3390/ijms24065093.

Lambe, A., Massoli, P., Zhang, X. et al. (2017). Controlled nitric oxide production via $O(^1D)$ + N_2O reactions for use in oxidation flow reactor studies. *Atmospheric Measurement Techniques 10*, 2283–2298. https://doi.org/10.5194/amt-10-2283-2017.

Lambe, A. T., Ahern, A. T., Williams, L. R. et al. (2011). Characterization of aerosol photooxidation flow reactors: heterogeneous oxidation, secondary organic aerosol formation and cloud condensation nuclei activity measurements. *Atmospheric Measurement Techniques 4*, 445–461. https://doi.org/10.5194/amt-4-445-2011.

Lambe, A. T., Wood, E. C., Krechmer, J. E. et al. (2020). Nitrate radical generation via continuous generation of dinitrogen pentoxide in a laminar flow reactor coupled to an oxidation flow reactor. *Atmospheric Measurement Techniques 13*, 2397–2411. https://doi.org/10.5194/amt-13-2397-2020.

Lammel, G., Kitanovski, Z., Kukučka, P. et al. (2020). Oxygenated and Nitrated Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Ambient Air—Levels, Phase Partitioning, Mass Size Distributions, and Inhalation Bioaccessibility. *Environ Sci Technol 54*, 2615–2625. https://doi.org/10.1021/acs.est.9b06820.

Land, W. G. (2018). Regulated Cell Death. *Damage-Associated Molecular Patterns in Human Diseases*, 427–466. https://doi.org/10.1007/978-3-319-78655-1_19.

Landrigan, P. J. (2017). Air pollution and health. *The Lancet Public Health 2*, e4–e5. https://doi.org/10.1016/S2468-2667(16)30023-8.

Landsiedel, R., Fabian, E., Ma-Hock, L. et al. (2012). Toxico-/biokinetics of nanomaterials. *Arch Toxicol 86*, 1021–1060. https://doi.org/10.1007/s00204-012-0858-7.

Lanièce, A. (2018). *Alveoli-on-a-chip : a close-contact dynamic model of the alveolar capillary barrier : microengineering, microfluidics and induced pluripotent stem cells*. thesis. Sorbonne Paris Cité. Available at: https://theses.fr/2018USPCC132 [Accessed July 27, 2026].

Lannuque, V. and Sartelet, K. (2024). Development of a detailed gaseous oxidation scheme of naphthalene for secondary organic aerosol (SOA) formation and speciation. *Atmospheric Chemistry and Physics 24*, 8589–8606. https://doi.org/10.5194/acp-24-8589-2024.

Lano, G., Laforêt, M., Von Kotze, C. et al. (2020). Aryl Hydrocarbon Receptor Activation and Tissue Factor Induction by Fluid Shear Stress and Indoxyl Sulfate in Endothelial Cells. *International Journal of Molecular Sciences 21*, 2392. https://doi.org/10.3390/ijms21072392.

Latvala, S., Hedberg, J., Möller, L. et al. (2016). Optimization of an air–liquid interface exposure system for assessing toxicity of airborne nanoparticles. *Journal of Applied Toxicology 36*, 1294–1301. https://doi.org/10.1002/jat.3304.

Leclercq, B., Happillon, M., Antherieu, S. et al. (2016). Differential responses of healthy and chronic obstructive pulmonary diseased human bronchial epithelial cells repeatedly exposed to air pollution-derived PM4. *Environmental Pollution 218*, 1074–1088. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.08.059.

Ledebur, H. C. and Parks, T. P. (1995). Transcriptional Regulation of the Intercellular Adhesion Molecule-1 Gene by Inflammatory Cytokines in Human Endothelial Cells: ESSENTIAL ROLES OF A VARIANT NF-κB SITE AND p65 HOMODIMERS (∗). *Journal of Biological Chemistry 270*, 933–943. https://doi.org/10.1074/jbc.270.2.933.

Lee, E., Song, C.-H., Bae, S.-J. et al. (2023). Regulated cell death pathways and their roles in homeostasis, infection, inflammation, and tumorigenesis. *Exp Mol Med 55*, 1632–1643. https://doi.org/10.1038/s12276-023-01069-y.

Lee, H., Abston, E., Zhang, D. et al. (2018). Extracellular Vesicle: An Emerging Mediator of Intercellular Crosstalk in Lung Inflammation and Injury. *Front Immunol 9*, 924. https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00924.

Lei, R., Wei, Z., Chen, M. et al. (2023). Aging Effects on the Toxicity Alteration of Different Types of Organic Aerosols: A Review. *Curr Pollution Rep 9*, 590–601. https://doi.org/10.1007/s40726-023-00272-9.

Leibrock, L., Wagener, S., Singh, A. V. et al. (2019). Nanoparticle induced barrier function assessment at liquid–liquid and air–liquid interface in novel human lung epithelia cell lines. *Toxicology Research 8*, 1016–1027. https://doi.org/10.1039/c9tx00179d.

Leikauf, G. D., Kim, S.-H. and Jang, A.-S. (2020). Mechanisms of ultrafine particle-induced respiratory health effects. *Exp Mol Med 52*, 329–337. https://doi.org/10.1038/s12276-020-0394-0.

Lelieveld, J., Evans, J. S., Fnais, M. et al. (2015). The contribution of outdoor air pollution sources to premature mortality on a global scale. *Nature 525*, 367–371. https://doi.org/10.1038/nature15371.

Leni, Z., Ess, M. N., Keller, A. et al. (2022). Role of Secondary Organic Matter on Soot Particle Toxicity in Reconstituted Human Bronchial Epithelia Exposed at the Air-Liquid Interface. *Environ Sci Technol 56*, 17007–17017. https://doi.org/10.1021/acs.est.2c03692.

Lenz, A. G., Karg, E., Lentner, B. et al. (2009). A dose-controlled system for air-liquid interface cell exposure and application to zinc oxide nanoparticles. *Part Fibre Toxicol 6*, 32. https://doi.org/10.1186/1743-8977-6-32.

Lenz, A.-G., Karg, E., Brendel, E. et al. (2013). Inflammatory and oxidative stress responses of an alveolar epithelial cell line to airborne zinc oxide nanoparticles at the air-liquid interface: a comparison with conventional, submerged cell-culture conditions. *Biomed Res Int 2013*, 652632. https://doi.org/10.1155/2013/652632.

Lenz, A.-G., Stoeger, T., Cei, D. et al. (2014). Efficient bioactive delivery of aerosolized drugs to human pulmonary epithelial cells cultured in air-liquid interface conditions. *Am J Respir Cell Mol Biol 51*, 526–535. https://doi.org/10.1165/rcmb.2013-0479OC.

Lewinski, N. A., Secondo, L. E. and Ferri, J. K. (2019). On-site three-dimensional printer aerosol hazard assessment: Pilot study of a portable in vitro exposure cassette. *Process Safety Progress 38*, e12030. https://doi.org/10.1002/prs.12030.

Li, B., Gao, M.-H., Chu, X.-M. et al. (2015). The synergistic antitumor effects of all-trans retinoic acid and C-phycocyanin on the lung cancer A549 cells *in vitro* and *in vivo*. *European Journal of Pharmacology 749*, 107–114. https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.01.009.

Li, C., Misovich, M. V., Pardo, M. et al. (2022). Secondary organic aerosol formation from atmospheric reactions of anisole and associated health effects. *Chemosphere 308*, 136421. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.136421.

Li, F., Zhou, S., Du, L. et al. (2023). Aqueous-phase chemistry of atmospheric phenolic compounds: A critical review of laboratory studies. *Science of The Total Environment 856*, 158895. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.158895.

Li, L., Pan, Y., Mo, X. et al. (2020). A novel metastatic promoter CEMIP and its downstream molecular targets and signaling pathway of cellular migration and invasion in SCLC cells based on proteome analysis. *J Cancer Res Clin Oncol 146*, 2519–2534. https://doi.org/10.1007/s00432-020-03308-5.

Li, L., Xie, J., Liang, J. et al. (2026). CEMIP promotes gefitinib resistance in lung cancer with EGFR-mutation possibly through forming a stable complex CEMIP/c-MYC. *BBA Adv 9*, 100176. https://doi.org/10.1016/j.bbadva.2025.100176.

Li, M., Gong, J., Gao, L. et al. (2022). Advanced human developmental toxicity and teratogenicity assessment using human organoid models. *Ecotoxicol Environ Saf 235*, 113429. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.113429.

Li, M., Yuan, Y., Hou, Z. et al. (2024). Human brain organoid: trends, evolution, and remaining challenges. *Neural Regen Res 19*, 2387–2399. https://doi.org/10.4103/1673-5374.390972.

Li, M., Zhang, L., Gao, A. et al. (2025). Molecular mechanisms of lung injury from ultra high and conventional dose rate pulsed radiation based on 4D DIA proteomics study. *Sci Rep 15*, 5425. https://doi.org/10.1038/s41598-025-87247-6.

Li, R., Palm, B. B., Ortega, A. M. et al. (2015). Modeling the Radical Chemistry in an Oxidation Flow Reactor: Radical Formation and Recycling, Sensitivities, and the OH Exposure Estimation Equation. *J Phys Chem A 119*, 4418–4432. https://doi.org/10.1021/jp509534k.

Li, Y., Jiang, M., Aye, L. et al. (2024). UPP1 promotes lung adenocarcinoma progression through the induction of an immunosuppressive microenvironment. *Nat Commun 15*, 1200. https://doi.org/10.1038/s41467-024-45340-w.

Li, Y., Tao, L., Wang, Q. et al. (2023). Potential Health Impact of Microplastics: A Review of Environmental Distribution, Human Exposure, and Toxic Effects. *Environ Health 1*, 249–257. https://doi.org/10.1021/envhealth.3c00052.

Liang, C., Ding, R., Sun, Q. et al. (2024). An Overview of Adverse Outcome Pathway Links between PM2.5 Exposure and Cardiac Developmental Toxicity. *Environ Health 2*, 105–113. https://doi.org/10.1021/envhealth.3c00143.

Lieber, M., Todaro, G., Smith, B. et al. (1976). A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells. *International Journal of Cancer 17*, 62–70. https://doi.org/10.1002/ijc.2910170110.

Lim, Y. B., Tan, Y., Perri, M. J. et al. (2010). Aqueous chemistry and its role in secondary organic aerosol (SOA) formation. *Atmospheric Chemistry and Physics 10*, 10521–10539. https://doi.org/10.5194/acp-10-10521-2010.

Lima de Albuquerque, Y., Berger, E., Tomaz, S. et al. (2021). Evaluation of the Toxicity on Lung Cells of By-Products Present in Naphthalene Secondary Organic Aerosols. *Life 11*, 319. https://doi.org/10.3390/life11040319.

Limbach, L. K., Li, Y., Grass, R. N. et al. (2005). Oxide nanoparticle uptake in human lung fibroblasts: effects of particle size, agglomeration, and diffusion at low concentrations. *Environ Sci Technol 39*, 9370–9376. https://doi.org/10.1021/es051043o.

Lin, Y.-H., Arashiro, M., Clapp, P. W. et al. (2017). Gene Expression Profiling in Human Lung Cells Exposed to Isoprene-Derived Secondary Organic Aerosol. *Environ Sci Technol 51*, 8166–8175. https://doi.org/10.1021/acs.est.7b01967.

Lin, Y.-H., Arashiro, M., Martin, E. et al. (2016). Isoprene-Derived Secondary Organic Aerosol Induces the Expression of Oxidative Stress Response Genes in Human Lung Cells. *Environ Sci Technol Lett 3*, 250–254. https://doi.org/10.1021/acs.estlett.6b00151.

Lippmann, M., Yeates, D. B. and Albert, R. E. (1980). Deposition, retention, and clearance of inhaled particles. *Br J Ind Med 37*, 337–362. https://doi.org/10.1136/oem.37.4.337.

Liu, F., Saavedra, M. G., Champion, J. A. et al. (2020). Prominent Contribution of Hydrogen Peroxide to Intracellular Reactive Oxygen Species Generated upon Exposure to Naphthalene Secondary Organic Aerosols. *Environ Sci Technol Lett 7*, 171–177. https://doi.org/10.1021/acs.estlett.9b00773.

Liu, F., Xu, T., Ng, N. L. et al. (2023). Linking Cell Health and Reactive Oxygen Species from Secondary Organic Aerosols Exposure. *Environ Sci Technol 57*, 1039–1048. https://doi.org/10.1021/acs.est.2c05171.

Liu, H., Wang, J., Xiong, J. et al. (2024). cGAS deficiency mitigated PM2.5-induced lung injury by inhibiting ferroptosis. *Ecotoxicol Environ Saf 288*, 117321. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2024.117321.

Liu, H., Zhang, X., Sun, Z. et al. (2023). Ambient Fine Particulate Matter and Cancer: Current Evidence and Future Perspectives. *Chem Res Toxicol 36*, 141–156. https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.2c00216.

Liu, J., Zhang, J., Ren, L. et al. (2019). Fine particulate matters induce apoptosis via the ATM/P53/CDK2 and mitochondria apoptosis pathway triggered by oxidative stress in rat and GC-2spd cell. *Ecotoxicology and Environmental Safety 180*, 280–287. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.05.013.

Liu, M., Wang, L., Xia, X. et al. (2022). Regulated lytic cell death in breast cancer. *Cell Biol Int 46*, 12–33. https://doi.org/10.1002/cbin.11705.

Liu, Y., Jiang, H., Liu, C. et al. (2019). Influence of functional groups on toxicity of carbon nanomaterials. *Atmospheric Chemistry and Physics 19*, 8175–8187. https://doi.org/10.5194/acp-19-8175-2019.

Liu, Y. and Zhang, Z. (2025). Effects of Atmospheric Particulate Matter on Microbial Communities in Wetland Ecosystems. *Water 17*, 66. https://doi.org/10.3390/w17010066.

Lo, S. K., Janakidevi, K., Lai, L. et al. (1993). Hydrogen peroxide-induced increase in endothelial adhesiveness is dependent on ICAM-1 activation. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology 264*, L406–L412. https://doi.org/10.1152/ajplung.1993.264.4.L406.

Loncarevic, I., Mutlu, S., Dzepic, M. et al. (2024). Current Challenges to Align Inflammatory Key Events in Animals and Lung Cell Models In Vitro. *Chem Res Toxicol 37*, 1601–1611. https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.4c00113.

Lopes, M., Monteiro, A., Mouzourides, P. et al. (2025). The health burden of wildfire smoke in a changing climate: Exposure, risks, and strategies for mitigation. *Current Opinion in Environmental Science & Health 46*, 100631. https://doi.org/10.1016/j.coesh.2025.100631.

Lopez-Hilfiker, F. D., Pospisilova, V., Huang, W. et al. (2019). An extractive electrospray ionization time-of-flight mass spectrometer (EESI-TOF) for online measurement of atmospheric aerosol particles. *Atmospheric Measurement Techniques 12*, 4867–4886. https://doi.org/10.5194/amt-12-4867-2019.

Loret, T., Peyret, E., Dubreuil, M. et al. (2016). Air-liquid interface exposure to aerosols of poorly soluble nanomaterials induces different biological activation levels compared to exposure to suspensions. *Part Fibre Toxicol 13*, 58. https://doi.org/10.1186/s12989-016-0171-3.

Lotfi, F., Mansourian, M., Mirmoayyeb, O. et al. (2022). Association of Exposure to Particulate Matters and Multiple Sclerosis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Neuroimmunomodulation 29*, 21–27. https://doi.org/10.1159/000516559.

Louis, S., Carlson, A. K., Suresh, A. et al. (2023). Impacts of Climate Change and Air Pollution on Neurologic Health, Disease, and Practice. *Neurology 100*, 474–483. https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000201630.

Lovén, K., Dobric, J., Bölükbas, D. A. et al. (2021). Toxicological effects of zinc oxide nanoparticle exposure: an in vitro comparison between dry aerosol air-liquid interface and submerged exposure systems. *Nanotoxicology 15*, 494–510. https://doi.org/10.1080/17435390.2021.1884301.

Lovett, C., Baasiri, M., Atwi, K. et al. (2019). Comparison of the oxidative potential of primary (POA) and secondary (SOA) organic aerosols derived from α-pinene and gasoline engine exhaust precursors. https://doi.org/10.12688/f1000research.15445.2.

Lu, J. W., Flores, J. M., Lavi, A. et al. (2011). Changes in the optical properties of benzo[a]pyrene-coated aerosols upon heterogeneous reactions with NO2 and NO3. *Phys Chem Chem Phys 13*, 6484–6492. https://doi.org/10.1039/C0CP02114H.

Lucci, F., Castro, N. D., Rostami, A. A. et al. (2018). Characterization and modeling of aerosol deposition in Vitrocell® exposure systems - exposure well chamber deposition efficiency. *Journal of Aerosol Science 123*, 141–160. https://doi.org/10.1016/j.jaerosci.2018.06.015.

Lunov, O., Syrovets, T., Loos, C. et al. (2011). Amino-functionalized polystyrene nanoparticles activate the NLRP3 inflammasome in human macrophages. *ACS Nano 5*, 9648–9657. https://doi.org/10.1021/nn203596e.

Lynch, A. M., Noun, T., Yang, S. et al. (2025). AP-1 mediated chromatin changes govern alveolar type 2 cell transition in lung injury-repair. *bioRxiv*, 2025.10.25.684549. https://doi.org/10.1101/2025.10.25.684549.

Ma, J., Rubin, B. K. and Voynow, J. A. (2018). Mucins, Mucus, and Goblet Cells. *Chest 154*, 169–176. https://doi.org/10.1016/j.chest.2017.11.008.

Ma, Q. (2013). Role of Nrf2 in Oxidative Stress and Toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol 53*, 401–426. https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-011112-140320.

Ma, S., Xu, R., Lin, C. et al. (2026). SFTPB: A signature gene for lung adenocarcinoma development. *Comput Biol Chem 123*, 109026. https://doi.org/10.1016/j.compbiolchem.2026.109026.

Mache, C., Schulze, J., Holland, G. et al. (2022). SARS-CoV-2 Omicron variant is attenuated for replication in a polarized human lung epithelial cell model. *Commun Biol 5*, 1138. https://doi.org/10.1038/s42003-022-04068-3.

Mackay, I. F. S. (1940). The composition of alveolar air. *J Physiol 98*, 73–78. https://doi.org/10.1113/jphysiol.1940.sp003834.

Maina, J. N. and West, J. B. (2005). Thin and strong! The bioengineering dilemma in the structural and functional design of the blood-gas barrier. *Physiol Rev 85*, 811–844. https://doi.org/10.1152/physrev.00022.2004.

Majeed, S., Frentzel, S., Wagner, S. et al. (2014). Characterization of the Vitrocell® 24/48 in vitro aerosol exposure system using mainstream cigarette smoke. *Chem Cent J 8*, 62. https://doi.org/10.1186/s13065-014-0062-3.

Majewska, M., Khan, F., Pieta, I. S. et al. (2021). Toxicity of selected airborne nitrophenols on eukaryotic cell membrane models. *Chemosphere 266*, 128996. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128996.

Mao, C., Wang, M., Zhuang, L. et al. (2024). Metabolic cell death in cancer: ferroptosis, cuproptosis, disulfidptosis, and beyond. *Protein Cell 15*, 642–660. https://doi.org/10.1093/procel/pwae003.

Martin, T. R., Hagimoto, N., Nakamura, M. et al. (2005). Apoptosis and Epithelial Injury in the Lungs. *Proc Am Thorac Soc 2*, 214–220. https://doi.org/10.1513/pats.200504-031AC.

Mason, R. J. (2006). Biology of alveolar type II cells. *Respirology 11 Suppl*, S12-15. https://doi.org/10.1111/j.1440-1843.2006.00800.x.

Mason, R. J. and Crystal, R. G. (1998). Pulmonary Cell Biology. *Am J Respir Crit Care Med 157*, S72–S81. https://doi.org/10.1164/ajrccm.157.4.nhlbi-3.

Matsuda, S., Kawamoto, K., Miyamoto, K. et al. (2017). PCTK3/CDK18 regulates cell migration and adhesion by negatively modulating FAK activity. *Sci Rep 7*, 45545. https://doi.org/10.1038/srep45545.

Matsuno, H., Yudoh, K., Watanabe, Y. et al. (2001). Stromelysin-1 (MMP-3) in synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis has potential to cleave membrane bound Fas ligand. *The Journal of Rheumatology 28*, 22–28

Mayorga, R. J., Zhao, Z. and Zhang, H. (2021). Formation of secondary organic aerosol from nitrate radical oxidation of phenolic VOCs: Implications for nitration mechanisms and brown carbon formation. *Atmospheric Environment 244*, 117910. https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2020.117910.

Mazzoli-Rocha, F., Fernandes, S., Einicker-Lamas, M. et al. (2010). Roles of oxidative stress in signaling and inflammation induced by particulate matter. *Cell Biol Toxicol 26*, 481–498. https://doi.org/10.1007/s10565-010-9158-2.

McDonald, J. D., Zielinska, B., Fujita, E. M. et al. (2000). Fine Particle and Gaseous Emission Rates from Residential Wood Combustion. *Environmental Science & Technology 34*, 2080–2091. https://doi.org/10.1021/es9909632.

McGillen, M. R., Carter, W. P. L., Mellouki, A. et al. (2020). Database for the kinetics of the gas-phase atmospheric reactions of organic compounds. *Earth System Science Data 12*, 1203–1216. https://doi.org/10.5194/essd-12-1203-2020.

McMahon, K.-A., Stroud, D. A., Gambin, Y. et al. (2021). Cavin3 released from caveolae interacts with BRCA1 to regulate the cellular stress response. *Elife 10*, e61407. https://doi.org/10.7554/eLife.61407.

Meindl, C., Stranzinger, S., Dzidic, N. et al. (2015). Permeation of Therapeutic Drugs in Different Formulations across the Airway Epithelium In Vitro. *PLOS ONE 10*, e0135690. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135690.

Méndez-Lucas, A., Hyroššová, P., Novellasdemunt, L. et al. (2014). Mitochondrial phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK-M) is a pro-survival, endoplasmic reticulum (ER) stress response gene involved in tumor cell adaptation to nutrient availability. *J Biol Chem 289*, 22090–22102. https://doi.org/10.1074/jbc.M114.566927.

Meng, Y., Chen, Q., Zhou, Z. et al. (2025). Regulated cell death in cancer: Mechanisms, crosstalk, and opportunities for therapy. *Cancer Lett 635*, 218077. https://doi.org/10.1016/j.canlet.2025.218077.

Mercier, J., Calmel, C., Mésinèle, J. et al. (2022). SLC6A14 Impacts Cystic Fibrosis Lung Disease Severity via mTOR and Epithelial Repair Modulation. *Front Mol Biosci 9*, 850261. https://doi.org/10.3389/fmolb.2022.850261.

Metz, J. K., Wiegand, B., Schnur, S. et al. (2020). Modulating the Barrier Function of Human Alveolar Epithelial (hAELVi) Cell Monolayers as a Model of Inflammation. *Altern Lab Anim 48*, 252–267. https://doi.org/10.1177/0261192920983015.

Miersch, T., Czech, H., Hartikainen, A. et al. (2019). Impact of photochemical ageing on Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH) and oxygenated PAH (Oxy-PAH/OH-PAH) in logwood stove emissions. *Sci Total Environ 686*, 382–392. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.05.412.

Mills-Goodlet, R., Schenck, M., Chary, A. et al. (2020). Biological effects of allergen–nanoparticle conjugates: uptake and immune effects determined on hAELVi cells under submerged vs. air–liquid interface conditions. *Environmental Science: Nano 7*, 2073–2086. https://doi.org/10.1039/C9EN01353A.

Milovanova, T., Chatterjee, S., Hawkins, B. J. et al. (2008). Caveolae are an essential component of the pathway for endothelial cell signaling associated with abrupt reduction of shear stress. *Biochim Biophys Acta 1783*, 1866–1875. https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2008.05.010.

de Miranda Ramos, V., Gasparotto, J., Figueiró, F. et al. (2019). Retinoic acid downregulates thiol antioxidant defences and homologous recombination while promotes A549 cells sensitization to cisplatin. *Cellular Signalling 62*, 109356. https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2019.109356.

Misaki, K., Takamura-Enya, T., Ogawa, H. et al. (2016). Tumour-promoting activity of polycyclic aromatic hydrocarbons and their oxygenated or nitrated derivatives. *Mutagenesis 31*, 205–213. https://doi.org/10.1093/mutage/gev076.

Mitchell, S. M., Meldrum, K., Bateman, J. W. P. et al. (2024). Development and characterisation of a novel complex triple cell culture model of the human alveolar epithelial barrier. *In Vitro Model 3*, 125–137. https://doi.org/10.1007/s44164-024-00075-2.

Mo, X., Shen, X., Mo, X. et al. (2023). CEMIP promotes small cell lung cancer proliferation by activation of glutamine metabolism via FBXW7/c-Myc-dependent axis. *Biochem Pharmacol 209*, 115446. https://doi.org/10.1016/j.bcp.2023.115446.

Mohammadi, M. J., Zarea, K., Hatamzadeh, N. et al. (2022). Toxic Air Pollutants and Their Effect on Multiple Sclerosis: A Review Study. *Front Public Health 10*, 898043. https://doi.org/10.3389/fpubh.2022.898043.

Mohan, J., Morén, B., Larsson, E. et al. (2015). Cavin3 interacts with cavin1 and caveolin1 to increase surface dynamics of caveolae. *J Cell Sci 128*, 979–991. https://doi.org/10.1242/jcs.161463.

Møller, P., Danielsen, P. H., Jantzen, K. et al. (2013). Oxidatively damaged DNA in animals exposed to particles. *Critical Reviews in Toxicology 43*, 96–118. https://doi.org/10.3109/10408444.2012.756456.

Mondejar-Parreño, G., Perez-Vizcaino, F. and Cogolludo, A. (2020). Kv7 Channels in Lung Diseases. *Front Physiol 11*, 634. https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00634.

Monks, P. S., Granier, C., Fuzzi, S. et al. (2009). Atmospheric composition change – global and regional air quality. *Atmospheric Environment 43*, 5268–5350. https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2009.08.021.

Montal, E. D., Dewi, R., Bhalla, K. et al. (2015). PEPCK Coordinates the Regulation of Central Carbon Metabolism to Promote Cancer Cell Growth. *Mol Cell 60*, 571–583. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.09.025.

Moratin, H., Thöle, A., Lang, J. et al. (2023). Ag- but Not ZnO-Nanoparticles Disturb the Airway Epithelial Barrier at Subtoxic Concentrations. *Pharmaceutics 15*, 2506. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15102506.

Mousseau, F. (2019). *Le surfactant pulmonaire, une barrière déterminante de la réponse des cellules à l'exposition aux nanoparticules*.

Mudway, I. S., Kelly, F. J. and Holgate, S. T. (2020). Oxidative stress in air pollution research. *Free Radic Biol Med 151*, 2–6. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.04.031.

Mülhopt, S., Dilger, M., Diabaté, S. et al. (2016). Toxicity testing of combustion aerosols at the air–liquid interface with a self-contained and easy-to-use exposure system. *Journal of Aerosol Science 96*, 38–55. https://doi.org/10.1016/j.jaerosci.2016.02.005.

Mülhopt, S., Schlager, C., Berger, M. et al. (2020). A novel TEM grid sampler for airborne particles to measure the cell culture surface dose. *Sci Rep 10*, 8401. https://doi.org/10.1038/s41598-020-65427-w.

Münzel, T., Sørensen, M., Lelieveld, J. et al. (2025). A comprehensive review/expert statement on environmental risk factors of cardiovascular disease. *Cardiovasc Res 121*, 1653–1678. https://doi.org/10.1093/cvr/cvaf119.

Murray, J. F. (2010). The structure and function of the lung. *Int J Tuberc Lung Dis 14*, 391–396

Naeher, L. P., Brauer, M., Lipsett, M. et al. (2007). Woodsmoke Health Effects: A Review. *Inhalation Toxicology 19*, 67–106. https://doi.org/10.1080/08958370600985875.

Nagayama, S., Ogawara, K., Minato, K. et al. (2007). Fetuin mediates hepatic uptake of negatively charged nanoparticles via scavenger receptor. *International Journal of Pharmaceutics 329*, 192–198. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.08.025.

Nagpal, S. (2004). Retinoids: Inducers of Tumor/Growth Suppressors. *Journal of Investigative Dermatology 123*, xx–xxi. https://doi.org/10.1111/j.0022-202X.2004.23533.x.

Nakao, S., Clark, C., Tang, P. et al. (2011). Secondary organic aerosol formation from phenolic compounds in the absence of NO_x. *Atmospheric Chemistry and Physics 11*, 10649–10660. https://doi.org/10.5194/acp-11-10649-2011.

Nannu Shankar, S., Mital, K., Le, E. et al. (2023). Assessment of Scanning Mobility Particle Sizer (SMPS) for online monitoring of delivered dose in an in vitro aerosol exposure system. *Toxicology in Vitro 92*, 105650. https://doi.org/10.1016/j.tiv.2023.105650.

do Nascimento, R. de K. S., Carvalho, J. S., Miranda, R. R. et al. (2023). *In vitro* toxicity and lung cancer risk: Atmospheric particulate matter from a city in southeastern Brazil impacted by biomass burning. *Chemosphere 338*, 139484. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.139484.

Nault, B. A., Jo, D. S., McDonald, B. C. et al. (2021). Secondary organic aerosols from anthropogenic volatile organic compounds contribute substantially to air pollution mortality. *Atmospheric Chemistry and Physics 21*, 11201–11224. https://doi.org/10.5194/acp-21-11201-2021.

Navarrete-Aliaga, Ó., Muriach, M. and Delgado-Saborit, J. M. (2025). Toxicological Effects of Air Pollutants on Human Airway Cell Models Using Air–liquid Interface Systems: A Systematic Review. *Curr Environ Health Rep 12*, 26. https://doi.org/10.1007/s40572-025-00491-w.

Neuhaus, W., Samwer, F., Kunzmann, S. et al. (2012). Lung endothelial cells strengthen, but brain endothelial cells weaken barrier properties of a human alveolar epithelium cell culture model. *Differentiation 84*, 294–304. https://doi.org/10.1016/j.diff.2012.08.006.

Newman, S. P., Agnew, J. E., Pavia, D. et al. (1982). Inhaled aerosols: lung deposition and clinical applications. *Clin Phys Physiol Meas 3*, 1–20. https://doi.org/10.1088/0143-0815/3/1/001.

NF EN 12341 (2023). NF EN 12341 - Air ambiant - Méthode normalisée de mesurage gravimétrique pour la détermination de la concentration massique MP10 ou MP2,5 de matière particulaire en suspension. *Afnor EDITIONS*. Available at: https://www.boutique.afnor.org/fr-fr/norme/nf-en-12341/air-ambiant-methode-normalisee-de-mesurage-gravimetrique-pour-la-determinat/fa186364/351830 [Accessed April 27, 2026].

NF EN 14211 (2024). NF EN 14211 - Air ambiant - Méthode normalisée pour le mesurage de la concentration en dioxyde d'azote et monoxyde d'azote par chimiluminescence.

Afnor EDITIONS. Available at: https://www.boutique.afnor.org/fr-fr/norme/nf-en-14211/air-ambiant-methode-normalisee-pour-le-mesurage-de-la-concentration-en-diox/fa194819/429899 [Accessed April 27, 2026].

NF EN 15549 (2008). NF EN 15549 - Qualité de l'air - Méthode normalisée pour le mesurage de la concentration du benzo[a]pyrene dans l'air ambiant. *Afnor EDITIONS*. Available at: https://www.boutique.afnor.org/fr-fr/norme/nf-en-15549/qualite-de-lair-methode-normalisee-pour-le-mesurage-de-la-concentration-du-/fa144412/31473 [Accessed April 27, 2026].

NF EN 16976 (2024). NF EN 16976 - Air ambiant - Détermination de la concentration en nombre de particules de l'aérosol atmosphérique. *Afnor EDITIONS*. Available at: https://www.boutique.afnor.org/fr-fr/norme/nf-en-16976/air-ambiant-determination-de-la-concentration-en-nombre-de-particules-de-la/fa198145/421651 [Accessed February 25, 2026].

Ng, N. L., Herndon, S. C., Trimborn, A. et al. (2011). An Aerosol Chemical Speciation Monitor (ACSM) for Routine Monitoring of the Composition and Mass Concentrations of Ambient Aerosol. *Aerosol Science and Technology 45*, 780–794. https://doi.org/10.1080/02786826.2011.560211.

Nhung, N. T. T., Amini, H., Schindler, C. et al. (2017). Short-term association between ambient air pollution and pneumonia in children: A systematic review and meta-analysis of time-series and case-crossover studies. *Environmental Pollution 230*, 1000–1008. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.07.063.

Niikura, K., Matsunaga, T., Suzuki, T. et al. (2013). Gold nanoparticles as a vaccine platform: influence of size and shape on immunological responses in vitro and in vivo. *ACS Nano 7*, 3926–3938. https://doi.org/10.1021/nn3057005.

Niu, X., Ho, S. S. H., Ho, K. F. et al. (2017). Indoor secondary organic aerosols formation from ozonolysis of monoterpene: An example of d-limonene with ammonia and potential impacts on pulmonary inflammations. *Science of The Total Environment 579*, 212–220. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.11.018.

Noorimotlagh, Z., Azizi, M., Pan, H.-F. et al. (2021). Association between air pollution and Multiple Sclerosis: A systematic review. *Environ Res 196*, 110386. https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.110386.

Nordin, E. Z., Uski, O., Nyström, R. et al. (2015). Influence of ozone initiated processing on the toxicity of aerosol particles from small scale wood combustion. *Atmospheric Environment 102*, 282–289. https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2014.11.068.

Nozière, B., Kalberer, M., Claeys, M. et al. (2015). The Molecular Identification of Organic Compounds in the Atmosphere: State of the Art and Challenges. *Chem Rev 115*, 3919–3983. https://doi.org/10.1021/cr5003485.

Nozima, B. H., Mendes, T. B., Pereira, G. J. da S. et al. (2019). FAM129A regulates autophagy in thyroid carcinomas in an oncogene-dependent manner. *Endocr Relat Cancer 26*, 227–238. https://doi.org/10.1530/ERC-17-0530.

Obeidat, M., Zhou, G., Li, X. et al. (2018). The genetics of smoking in individuals with chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Res 19*, 59. https://doi.org/10.1186/s12931-018-0762-7.

Oberdörster, G. (2000). Pulmonary effects of inhaled ultrafine particles. *Int Arch Occup Environ Health 74*, 1–8. https://doi.org/10.1007/s004200000185.

Oberdörster, G. (2001). Pulmonary effects of inhaled ultrafine particles. *Int Arch Occup Environ Health 74*, 1–8. https://doi.org/10.1007/s004200000185.

Oberdörster, G., Sharp, Z., Atudorei, V. et al. (2004). Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain. *Inhal Toxicol 16*, 437–445. https://doi.org/10.1080/08958370490439597.

Offer, S., Di Bucchianico, S., Czech, H. et al. (2024). The chemical composition of secondary organic aerosols regulates transcriptomic and metabolomic signaling in an epithelial-endothelial in vitro coculture. *Particle and Fibre Toxicology 21*, 38. https://doi.org/10.1186/s12989-024-00600-x.

Offer, S., Hartner, E., Di, B. S. et al. (2022). Effect of Atmospheric Aging on Soot Particle Toxicity in Lung Cell Models at the Air–Liquid Interface: Differential Toxicological Impacts of Biogenic and Anthropogenic Secondary Organic Aerosols (SOAs). *Environmental Health Perspectives 130*, 027003. https://doi.org/10.1289/EHP9413.

Offer, S., Hartner, E., Di Bucchianico, S. et al. (2022). Effect of Atmospheric Aging on Soot Particle Toxicity in Lung Cell Models at the Air-Liquid Interface: Differential Toxicological Impacts of Biogenic and Anthropogenic Secondary Organic Aerosols (SOAs). *Environ Health Perspect 130*, 27003. https://doi.org/10.1289/EHP9413.

Öhlinger, K., Kolesnik, T., Meindl, C. et al. (2019). Air-liquid interface culture changes surface properties of A549 cells. *Toxicology in Vitro 60*, 369–382. https://doi.org/10.1016/j.tiv.2019.06.014.

Okuda, I., Wada, Y., Fujihara, M. et al. (2025). Development of a Novel Air–Liquid Interface Culture System to Investigate the Effects of Nanoplastics on Alveolar Epithelium. *Atmosphere 16*, 1343. https://doi.org/10.3390/atmos16121343.

Oldenburger, M. M., Duistermaat, E., Hiemstra, P. S. et al. (2026). A Novel Air-Liquid Interface Exposure System for Continuous Gas Exposure of Airway Epithelial Cells: Exposure of NO2 With Viral Co-Challenge. *Journal of Applied Toxicology n/a*. https://doi.org/10.1002/jat.70107.

Olesiejuk, K. and Chałubiński, M. (2023). How does particulate air pollution affect barrier functions and inflammatory activity of lung vascular endothelium? *Allergy 78*, 629–638. https://doi.org/10.1111/all.15630.

de Oliveira Alves, N., Martins Pereira, G., Di Domenico, M. et al. (2020). Inflammation response, oxidative stress and DNA damage caused by urban air pollution exposure increase in the lack of DNA repair XPC protein. *Environment International 145*, 106150. https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.106150.

Olloquequi, J., Díaz-Peña, R., Verdaguer, E. et al. (2024). From Inhalation to Neurodegeneration: Air Pollution as a Modifiable Risk Factor for Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci 25*, 6928. https://doi.org/10.3390/ijms25136928.

Olmeda, B., Martínez-Calle, M. and Pérez-Gil, J. (2017). Pulmonary surfactant metabolism in the alveolar airspace: Biogenesis, extracellular conversions, recycling. *Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger 209*, 78–92. https://doi.org/10.1016/j.aanat.2016.09.008.

Olsen, Y., Nøjgaard, J. K., Olesen, H. R. et al. (2020). Emissions and source allocation of carbonaceous air pollutants from wood stoves in developed countries: A review. *Atmospheric Pollution Research 11*, 234–251. https://doi.org/10.1016/j.apr.2019.10.007.

OMS (2024). Qualité de l'air ambiant et santé. Available at: https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/ambient-(outdoor)-air-quality-and-health [Accessed April 13, 2026].

Oostingh, G. J., Papaioannou, E., Chasapidis, L. et al. (2013). Development of an on-line exposure system to determine freshly produced diesel engine emission-induced cellular effects. *Toxicology in Vitro 27*, 1746–1752. https://doi.org/10.1016/j.tiv.2013.04.016.

Orozco-Levi, M., Garcia-Aymerich, J., Villar, J. et al. (2006). Wood smoke exposure and risk of chronic obstructive pulmonary disease. *European Respiratory Journal 27*, 542–546. https://doi.org/10.1183/09031936.06.00052705.

Øvrevik, J., Refsnes, M., Låg, M. et al. (2017). Triggering Mechanisms and Inflammatory Effects of Combustion Exhaust Particles with Implication for Carcinogenesis. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology 121*, 55–62. https://doi.org/10.1111/bcpt.12746.

Paengnakorn, P., Ngoyteja, N., Chuntama, M. et al. (2025). Development of a dual PM2.5 sampling and direct exposure system incorporated an *in vitro* air–liquid interface culture method: Application to the northern Thailand haze season. *Environmental Pollution 367*, 125606. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2024.125606.

Panas, A., Comouth, A., Saathoff, H. et al. (2014). Silica nanoparticles are less toxic to human lung cells when deposited at the air–liquid interface compared to conventional submerged exposure. *Beilstein J Nanotechnol 5*, 1590–1602. https://doi.org/10.3762/bjnano.5.171.

Pardo, M., Czech, H., Offer, S. et al. (2023). Atmospheric aging increases the cytotoxicity of bare soot particles in BEAS-2B lung cells. *Aerosol Science and Technology*, 1–17. https://doi.org/10.1080/02786826.2023.2178878.

Pardo, M., Li, C., He, Q. et al. (2020). Mechanisms of lung toxicity induced by biomass burning aerosols. *Part Fibre Toxicol 17*, 4. https://doi.org/10.1186/s12989-020-0337-x.

Pardo, M., Li, C., Jabali, A. et al. (2023). Toxicity mechanisms of biomass burning aerosols in in vitro hepatic steatosis models. *Science of The Total Environment 905*, 166988. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.166988.

Pardo, M., Li, C., Zimmermann, R. et al. (2024). Health impacts of biomass burning aerosols: Relation to oxidative stress and inflammation. *Aerosol Science and Technology 0*, 1–21. https://doi.org/10.1080/02786826.2024.2379551.

Pardo, M., Offer, S., Hartner, E. et al. (2022). Exposure to naphthalene and β-pinene-derived secondary organic aerosol induced divergent changes in transcript levels of BEAS-2B cells. *Environ Int 166*, 107366. https://doi.org/10.1016/j.envint.2022.107366.

Pardo, M., Qiu, X., Zimmermann, R. et al. (2020). Particulate Matter Toxicity Is Nrf2 and Mitochondria Dependent: The Roles of Metals and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Chem Res Toxicol 33*, 1110–1120. https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.0c00007.

Pardo, M., Xu, F., Shemesh, M. et al. (2019). Nrf2 protects against diverse PM2.5 components-induced mitochondrial oxidative damage in lung cells. *Science of The Total Environment 669*, 303–313. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.01.436.

Park, E. K., Jung, H. S., Yang, H. I. et al. (2007). Optimized THP-1 differentiation is required for the detection of responses to weak stimuli. *Inflamm res 56*, 45–50. https://doi.org/10.1007/s00011-007-6115-5.

Park, M., Joo, H. S., Lee, K. et al. (2018). Differential toxicities of fine particulate matters from various sources. *Sci Rep 8*, 17007. https://doi.org/10.1038/s41598-018-35398-0.

Park, S.-W., Verhaeghe, C., Nguyenvu, L. T. et al. (2009). Distinct roles of FOXA2 and FOXA3 in allergic airway disease and asthma. *Am J Respir Crit Care Med 180*, 603–610. https://doi.org/10.1164/rccm.200811-1768OC.

Parra, E. and Pérez-Gil, J. (2015). Composition, structure and mechanical properties define performance of pulmonary surfactant membranes and films. *Chemistry and Physics of Lipids 185*, 153–175. https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2014.09.002.

Paul Flecknell (2002). Replacement, Reduction and Refinement. Available at: https://vpresearch.louisiana.edu/sites/research/files/Altex_2002_2_073_078_Flecknell.pdf.

Paur, H.-R., Cassee, F. R., Teeguarden, J. et al. (2011). In-vitro cell exposure studies for the assessment of nanoparticle toxicity in the lung—A dialog between aerosol science and biology. *Journal of Aerosol Science 42*, 668–692. https://doi.org/10.1016/j.jaerosci.2011.06.005.

Pedersen, D. U., Durant, J. L., Taghizadeh, K. et al. (2005). Human Cell Mutagens in Respirable Airborne Particles from the Northeastern United States. 2. Quantification of Mutagens and Other Organic Compounds. *Environ Sci Technol 39*, 9547–9560. https://doi.org/10.1021/es050886c.

Pederson, T. C. and Siak, J.-S. (1981). The role of nitroaromatic compounds in the direct-acting mutagenicity of diesel particle extracts. *Journal of Applied Toxicology 1*, 54–60. https://doi.org/10.1002/jat.2550010203.

Peixoto, M. S., de Oliveira Galvão, M. F. and Batistuzzo de Medeiros, S. R. (2017). Cell death pathways of particulate matter toxicity. *Chemosphere 188*, 32–48. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.08.076.

Peng, D., Xu, R., Hales, S. et al. (2026). Decomposition of cross-country socioeconomic inequality in mortality by 288 causes of death and 84 risk factors from 1990 to 2021. *Nat Commun 17*, 2586. https://doi.org/10.1038/s41467-026-70877-3.

Peng, F., Liao, M., Qin, R. et al. (2022). Regulated cell death (RCD) in cancer: key pathways and targeted therapies. *Signal Transduct Target Ther 7*, 286. https://doi.org/10.1038/s41392-022-01110-y.

Peng, X., Yang, R., Wang, C. et al. (2025). The YTHDF3-DT/miR-301a-3p /INHBA axis attenuates autophagy-dependent ferroptosis in lung adenocarcinoma. *Cancer Lett 613*, 217503. https://doi.org/10.1016/j.canlet.2025.217503.

Peng, Y., Wang, Y., Zhou, C. et al. (2022). PI3K/Akt/mTOR Pathway and Its Role in Cancer Therapeutics: Are We Making Headway? *Front Oncol 12*, 819128. https://doi.org/10.3389/fonc.2022.819128.

Peng, Z. and Jimenez, J. L. (2019). KinSim: A Research-Grade, User-Friendly, Visual Kinetics Simulator for Chemical-Kinetics and Environmental-Chemistry Teaching. *J Chem Educ 96*, 806–811. https://doi.org/10.1021/acs.jchemed.9b00033.

Pepino, R. de O., Coelho, F., Janku, T. A. B. et al. (2021). Overview of PCTK3/CDK18: A Cyclin-Dependent Kinase Involved in Specific Functions in Post-Mitotic Cells. *Current Medicinal Chemistry 28*, 6846–6865. https://doi.org/10.2174/0929867328666210329122147.

Perraudin, E., Budzinski, H. and Villenave, E. (2007). Kinetic Study of the Reactions of Ozone with Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Adsorbed on Atmospheric Model Particles. *J Atmos Chem 56*, 57–82. https://doi.org/10.1007/s10874-006-9042-x.

Perumpully, S. J. and Gautam, S. (2025). Impact of aerosols on atmospheric processes and climate variability: A synthesis of recent research findings. *Geosystems and Geoenvironment 4*, 100317. https://doi.org/10.1016/j.geogeo.2024.100317.

Petpiroon, N., Netkueakul, W., Sukrak, K. et al. (2023). Development of lung tissue models and their applications. *Life Sciences 334*, 122208. https://doi.org/10.1016/j.lfs.2023.122208.

Pettersson, E., Boman, C., Westerholm, R. et al. (2011). Stove Performance and Emission Characteristics in Residential Wood Log and Pellet Combustion, Part 2: Wood Stove. *Energy Fuels 25*, 315–323. https://doi.org/10.1021/ef1007787.

Pierzyńska-Mach, A., Janowski, P. A. and Dobrucki, J. W. (2014). Evaluation of acridine orange, LysoTracker Red, and quinacrine as fluorescent probes for long-term tracking of acidic vesicles. *Cytometry A 85*, 729–737. https://doi.org/10.1002/cyto.a.22495.

Pinault, L., Tjepkema, M., Crouse, D. L. et al. (2016). Risk estimates of mortality attributed to low concentrations of ambient fine particulate matter in the Canadian community health survey cohort. *Environ Health 15*, 18. https://doi.org/10.1186/s12940-016-0111-6.

Plötz, F. B., Slutsky, A. S., van Vught, A. J. et al. (2004). Ventilator-induced lung injury and multiple system organ failure: a critical review of facts and hypotheses. *Intensive Care Med 30*, 1865–1872. https://doi.org/10.1007/s00134-004-2363-9.

Pope, C. A., Burnett, R. T., Thun, M. J. et al. (2002). Lung Cancer, Cardiopulmonary Mortality, and Long-term Exposure to Fine Particulate Air Pollution. *JAMA 287*, 1132–1141

Portugal, J., Bedia, C., Amato, F. et al. (2024). Toxicity of airborne nanoparticles: Facts and challenges. *Environment International 190*, 108889. https://doi.org/10.1016/j.envint.2024.108889.

Pöschl, U. (2005). Atmospheric Aerosols: Composition, Transformation, Climate and Health Effects. *Angewandte Chemie International Edition 44*, 7520–7540. https://doi.org/10.1002/anie.200501122.

Pospisilova, V., Lopez-Hilfiker, F. D., Bell, D. M. et al. (2020). On the fate of oxygenated organic molecules in atmospheric aerosol particles. *Science Advances 6*, eaax8922. https://doi.org/10.1126/sciadv.aax8922.

Powell, W. C., Fingleton, B., Wilson, C. L. et al. (1999). The metalloproteinase matrilysin proteolytically generates active soluble Fas ligand and potentiates epithelial cell apoptosis. *Current Biology 9*, 1441–1447. https://doi.org/10.1016/S0960-9822(00)80113-X.

Pozzer, A., Anenberg, S. C., Dey, S. et al. (2023). Mortality Attributable to Ambient Air Pollution: A Review of Global Estimates. *GeoHealth 7*, e2022GH000711. https://doi.org/10.1029/2022GH000711.

Pre, J., Bladier, D. and Battesti, J. P. (1979). [Outline of the structural biology of the alveolo-capillary barrier]. *Poumon Coeur 35*, 277–286

Prior, N., Inacio, P. and Huch, M. (2019). Liver organoids: from basic research to therapeutic applications. *Gut 68*, 2228–2237. https://doi.org/10.1136/gutjnl-2019-319256.

P.R.I.T.® (HRH - CES1332). ExpoCub P.R.I.T.®. *Advance your research using SCIREQ precision laboratory instruments At the forefront of preclinical respiratory research*. Available at: https://www.scireq.com/ [Accessed February 10, 2026].

Purkayastha, A., Sen, C., Garcia, G. et al. (2020). Direct Exposure to SARS-CoV-2 and Cigarette Smoke Increases Infection Severity and Alters the Stem Cell-Derived Airway Repair Response. *Cell Stem Cell 27*, 869-875.e4. https://doi.org/10.1016/j.stem.2020.11.010.

Putaud, J.-P., Raes, F., Van Dingenen, R. et al. (2004). A European aerosol phenomenology—2: chemical characteristics of particulate matter at kerbside, urban, rural and background sites in Europe. *Atmospheric Environment 38*, 2579–2595. https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2004.01.041.

Putaud, J.-P., Van Dingenen, R., Alastuey, A. et al. (2010). A European aerosol phenomenology – 3: Physical and chemical characteristics of particulate matter from 60 rural, urban, and kerbside sites across Europe. *Atmospheric Environment 44*, 1308–1320. https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2009.12.011.

Puthussery, J. V., Singh, A., Rai, P. et al. (2020). Real-Time Measurements of PM2.5 Oxidative Potential Using a Dithiothreitol Assay in Delhi, India. *Environ Sci Technol Lett 7*, 504–510. https://doi.org/10.1021/acs.estlett.0c00342.

Pye, H. O. T., Ward-Caviness, C. K., Murphy, B. N. et al. (2021). Secondary organic aerosol association with cardiorespiratory disease mortality in the United States. *Nat Commun 12*, 7215. https://doi.org/10.1038/s41467-021-27484-1.

Pye, H. O. T., Xu, L., Henderson, B. H. et al. (2024). Evolution of Reactive Organic Compounds and Their Potential Health Risk in Wildfire Smoke. *Environ Sci Technol 58*, 19785–19796. https://doi.org/10.1021/acs.est.4c06187.

Pyo, J.-S., Kim, N. Y. and Kang, D.-W. (2022). Impacts of Outdoor Particulate Matter Exposure on the Incidence of Lung Cancer and Mortality. *Medicina (Kaunas) 58*, 1159. https://doi.org/10.3390/medicina58091159.

Qi, Z., Song, Y., Ding, Q. et al. (2019). Water soluble and insoluble components of PM2.5 and their functional cardiotoxicities on neonatal rat cardiomyocytes in vitro. *Ecotoxicology and Environmental Safety 168*, 378–387. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.10.107.

Qian, X., Song, H. and Ming, G.-L. (2019). Brain organoids: advances, applications and challenges. *Development 146*, dev166074. https://doi.org/10.1242/dev.166074.

Rabolli, V., Lison, D. and Huaux, F. (2016). The complex cascade of cellular events governing inflammasome activation and IL-1β processing in response to inhaled particles. *Part Fibre Toxicol 13*, 40. https://doi.org/10.1186/s12989-016-0150-8.

Raby, K. L., Michaeloudes, C., Tonkin, J. et al. (2023). Mechanisms of airway epithelial injury and abnormal repair in asthma and COPD. *Front Immunol 14*, 1201658. https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1201658.

Raemy, D. O., Limbach, L. K., Rothen-Rutishauser, B. et al. (2011). Cerium oxide nanoparticle uptake kinetics from the gas-phase into lung cells *in vitro* is transport limited. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 77*, 368–375. https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2010.11.017.

Raes, F., Dingenen, R. V., Vignati, E. et al. (2000). Formation and cycling of aerosols in the global troposphere. *Atmospheric Environment 34*, 4215–4240. https://doi.org/10.1016/S1352-2310(00)00239-9.

Rafiee, A., Faridi, S., Sly, P. D. et al. (2024). Asthma and decreased lung function in children exposed to perfluoroalkyl and polyfluoroalkyl substances (PFAS): An updated meta-analysis unveiling research gaps. *Environ Res 262*, 119827. https://doi.org/10.1016/j.envres.2024.119827.

Rajagopalan, S., Al-Kindi, S. G. and Brook, R. D. (2018). Air Pollution and Cardiovascular Disease: JACC State-of-the-Art Review. *Journal of the American College of Cardiology 72*, 2054–2070. https://doi.org/10.1016/j.jacc.2018.07.099.

Rao, G. and Vejerano, E. P. (2018). Partitioning of volatile organic compounds to aerosols: A review. *Chemosphere 212*, 282–296. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.08.073.

Rattanavaraha, W., Chu, K., Budisulistiorini, S. H. et al. (2016). Assessing the impact of anthropogenic pollution on isoprene-derived secondary organic aerosol formation in $PM_{2.5}$ collected from the Birmingham, Alabama, ground site during the 2013 Southern Oxidant and Aerosol Study. *Atmospheric Chemistry and Physics 16*, 4897–4914. https://doi.org/10.5194/acp-16-4897-2016.

Rawlins, E. L. and Hogan, B. L. M. (2006). Epithelial stem cells of the lung: privileged few or opportunities for many? *Development 133*, 2455–2465. https://doi.org/10.1242/dev.02407.

Ray, A., Gulati, K., Joshi, J. et al. (2016). Cytokines and their Role in Health and Disease: A Brief Overview. *MOJ Immunology Volume 4*. https://doi.org/10.15406/moji.2016.04.00121.

Reddy, S. P. M. and Mossman, B. T. (2002). Role and regulation of activator protein-1 in toxicant-induced responses of the lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 283*, L1161-1178. https://doi.org/10.1152/ajplung.00140.2002.

Reid, J. P., Bertram, A. K., Topping, D. O. et al. (2018). The viscosity of atmospherically relevant organic particles. *Nat Commun 9*, 956. https://doi.org/10.1038/s41467-018-03027-z.

Ren, H., Birch, N. P. and Suresh, V. (2016). An Optimised Human Cell Culture Model for Alveolar Epithelial Transport D. Alvarez de la Rosa (ed.),. *PLoS ONE 11*, e0165225. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165225.

Ren, Y. Q., Wang, G. H., Li, J. J. et al. (2019). Evolution of aerosol chemistry in Xi'an during the spring dust storm periods: Implications for heterogeneous formation of secondary organic aerosols on the dust surface. *Chemosphere 215*, 413–421. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.10.064.

Richards, D. J., Coyle, R. C., Tan, Y. et al. (2017). Inspiration from heart development: Biomimetic development of functional human cardiac organoids. *Biomaterials 142*, 112–123. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.07.021.

Richards, D. J., Li, Y., Kerr, C. M. et al. (2020). Human cardiac organoids for the modelling of myocardial infarction and drug cardiotoxicity. *Nat Biomed Eng 4*, 446–462. https://doi.org/10.1038/s41551-020-0539-4.

Risom, L., Møller, P. and Loft, S. (2005). Oxidative stress-induced DNA damage by particulate air pollution. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis 592*, 119–137. https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2005.06.012.

Ritter, D., Bitsch, A., Elend, M. et al. (2018). Development and Evaluation of an In Vitro Test System for Toxicity Screening of Aerosols Released from Consumer Products and First Application to Aerosols from a Hair Straightening Process. *Applied In Vitro Toxicology 4*, 180–192. https://doi.org/10.1089/aivt.2017.0036.

Riva, M., Healy, R. M., Flaud, P.-M. et al. (2017). Gas- and particle-phase products from the photooxidation of acenaphthene and acenaphthylene by OH radicals. *Atmospheric Environment 151*, 34–44. https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2016.11.063.

R'mili, B., Le Bihan, O. L. C., Dutouquet, C. et al. (2013). Particle Sampling by TEM Grid Filtration. *Aerosol Science and Technology 47*, 767–775. https://doi.org/10.1080/02786826.2013.789478.

Rogers, D. F. (2001). Mucus hypersecretion in chronic obstructive pulmonary disease. *Novartis Found Symp 234*, 65–77; discussion 77-83. https://doi.org/10.1002/0470868678.ch5.

Roser, M., Fischer, D. and Kissel, T. (1998). Surface-modified biodegradable albumin nano- and microspheres. II: effect of surface charges on in vitro phagocytosis and biodistribution in rats. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 46*, 255–263. https://doi.org/10.1016/S0939-6411(98)00038-1.

Rossner, P., Cervena, T., Vojtisek-Lom, M. et al. (2021). Markers of lipid oxidation and inflammation in bronchial cells exposed to complete gasoline emissions and their

organic extracts. *Chemosphere 281*, 130833. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.130833.

Rothen-Rutishauser, B., Gibb, M., He, R. et al. (2023). Human lung cell models to study aerosol delivery – considerations for model design and development. *European Journal of Pharmaceutical Sciences 180*, 106337. https://doi.org/10.1016/j.ejps.2022.106337.

Rothen-Rutishauser, B., Grass, R. N., Blank, F. et al. (2009). Direct Combination of Nanoparticle Fabrication and Exposure to Lung Cell Cultures in a Closed Setup as a Method To Simulate Accidental Nanoparticle Exposure of Humans. *Environ Sci Technol 43*, 2634–2640. https://doi.org/10.1021/es8029347.

Rovira, J., Savadkoohi, M., Chen, G. I. et al. (2025). A European aerosol phenomenology – 9: Light absorption properties of carbonaceous aerosol particles across surface Europe. *Environment International 195*, 109185. https://doi.org/10.1016/j.envint.2024.109185.

Rowe, J. P., Lambe, A. T. and Brune, W. H. (2020). Technical Note: Effect of varying the λ = 185 and 254 nm photon flux ratio on radical generation in oxidation flow reactors. *Atmospheric Chemistry and Physics 20*, 13417–13424. https://doi.org/10.5194/acp-20-13417-2020.

Ruenraroengsak, P. and Tetley, T. D. (2015). Differential bioreactivity of neutral, cationic and anionic polystyrene nanoparticles with cells from the human alveolar compartment: robust response of alveolar type 1 epithelial cells. *Part Fibre Toxicol 12*, 19. https://doi.org/10.1186/s12989-015-0091-7.

Rüttermann, M., Koci, M., Lill, P. et al. (2023). Structure of the peroxisomal Pex1/Pex6 ATPase complex bound to a substrate. *Nat Commun 14*, 5942. https://doi.org/10.1038/s41467-023-41640-9.

Růžičková, J., Raclavská, H., Juchelková, D. et al. (2022). The origin of potential precursors of secondary organic aerosols during combustion of biochar and softwood in residential heating. *Process Safety and Environmental Protection 161*, 147–161. https://doi.org/10.1016/j.psep.2022.03.036.

Sakagami, M. (2020). *In vitro*, *ex vivo* and *in vivo* methods of lung absorption for inhaled drugs. *Advanced Drug Delivery Reviews 161–162*, 63–74. https://doi.org/10.1016/j.addr.2020.07.025.

Sakamoto, A., Matsumaru, T., Yamamura, N. et al. (2015). Drug Transporter Protein Quantification of Immortalized Human Lung Cell Lines Derived from Tracheobronchial Epithelial Cells (Calu-3 and BEAS2-B), Bronchiolar–Alveolar Cells (NCI-H292 and NCI-H441), and Alveolar Type II-like Cells (A549) by Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Pharmaceutical Sciences 104*, 3029–3038. https://doi.org/10.1002/jps.24381.

Saks, M., Upreti, S., Sv, R. et al. (2017). Genotoxicity: Mechanisms, Testing Guidelines and Methods. *Global Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences 1*, 133–138. https://doi.org/10.19080/GJPPS.2017.01.555575.

Salana, S. and Verma, V. (2024). Review of in vitro studies evaluating respiratory toxicity of aerosols: impact of cell types, chemical composition, and atmospheric processing. *Environ Sci: Processes Impacts 26*, 1922–1954. https://doi.org/10.1039/D4EM00475B.

Salo, L., Hyvärinen, A., Jalava, P. et al. (2021). The characteristics and size of lung-depositing particles vary significantly between high and low pollution traffic environments. *Atmospheric Environment 255*, 118421. https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2021.118421.

Salomon, J. J., Muchitsch, V. E., Gausterer, J. C. et al. (2014). The Cell Line NCl-H441 Is a Useful in Vitro Model for Transport Studies of Human Distal Lung Epithelial Barrier. *Mol Pharmaceutics 11*, 995–1006. https://doi.org/10.1021/mp4006535.

Samaké, A., Jaffrezo, J.-L., Favez, O. et al. (2019). Arabitol, mannitol, and glucose as tracers of primary biogenic organic aerosol: the influence of environmental factors on ambient air concentrations and spatial distribution over France. *Atmospheric Chemistry and Physics 19*, 11013–11030. https://doi.org/10.5194/acp-19-11013-2019.

Samaké, A., Jaffrezo, J.-L., Favez, O. et al. (2019). Polyols and glucose particulate species as tracers of primary biogenic organic aerosols at 28 French sites. *Atmospheric Chemistry and Physics 19*, 3357–3374. https://doi.org/10.5194/acp-19-3357-2019.

Samet, J. M., Chen, H., Pennington, E. R. et al. (2020). Non-redox cycling mechanisms of oxidative stress induced by PM metals. *Free Radic Biol Med 151*, 26–37. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.12.027.

Sancini, G., Farina, F., Battaglia, C. et al. (2014). Health Risk Assessment for Air Pollutants: Alterations in Lung and Cardiac Gene Expression in Mice Exposed to Milano Winter Fine Particulate Matter (PM2.5). *PLOS ONE 9*, e109685. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109685.

Sandberg, W. J., Låg, M., Holme, J. A. et al. (2012). Comparison of non-crystalline silica nanoparticles in IL-1β release from macrophages. *Part Fibre Toxicol 9*, 32. https://doi.org/10.1186/1743-8977-9-32.

Sands, M., Sachdeva, A., Bukavina, L. et al. (2025). Synergistic toxicity of PFAS and microplastic mixtures across five human cell lines. *Environ Pollut 386*, 127256. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2025.127256.

Sangkham, S., Phairuang, W., Sherchan, S. P. et al. (2024). An update on adverse health effects from exposure to PM2.5. *Environmental Advances 18*, 100603. https://doi.org/10.1016/j.envadv.2024.100603.

Sato, K., Hatakeyama, S. and Imamura, T. (2007). Secondary Organic Aerosol Formation during the Photooxidation of Toluene: NOx Dependence of Chemical Composition. *J Phys Chem A 111*, 9796–9808. https://doi.org/10.1021/jp071419f.

Sato, K., Takami, A., Kato, Y. et al. (2012). AMS and LC/MS analyses of SOA from the photooxidation of benzene and 1,3,5-trimethylbenzene in the presence of NO_x: effects of chemical structure on SOA aging. *Atmospheric Chemistry and Physics 12*, 4667–4682. https://doi.org/10.5194/acp-12-4667-2012.

Saukko, E., Lambe, A. T., Massoli, P. et al. (2012). Humidity-dependent phase state of SOA particles from biogenic and anthropogenic precursors. *Atmospheric Chemistry and Physics 12*, 7517–7529. https://doi.org/10.5194/acp-12-7517-2012.

Schauer, J. J., Kleeman, M. J., Cass, G. R. et al. (2001). Measurement of Emissions from Air Pollution Sources. 3. C1−C29 Organic Compounds from Fireplace Combustion of Wood. *Environ Sci Technol 35*, 1716–1728. https://doi.org/10.1021/es001331e.

Schins, R. P. F. and Knaapen, A. M. (2007). Genotoxicity of Poorly Soluble Particles. *Inhalation Toxicology 19*, 189–198. https://doi.org/10.1080/08958370701496202.

Schlingmann, B., Molina, S. A. and Koval, M. (2015). Claudins: gatekeepers of lung epithelial function. *Semin Cell Dev Biol 42*, 47–57. https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2015.04.009.

Schmittgen, T. D. and Livak, K. J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc 3*, 1101–1108. https://doi.org/10.1038/nprot.2008.73.

Schraufnagel, D. E. (2020). The health effects of ultrafine particles. *Exp Mol Med 52*, 311–317. https://doi.org/10.1038/s12276-020-0403-3.

Schueneman, M. K., Day, D. A., Jenks, O. J. et al. (2025). Secondary Organic Aerosol Yields from NO3 Oxidation of Phenolic, Aromatic, and Heterocyclic VOCs: Implications for Biomass Burning Plumes. *ACS EST Air 2*, 2342–2352. https://doi.org/10.1021/acsestair.4c00332.

Schueneman, M. K., Day, D. A., Peng, Z. et al. (2024). Secondary Organic Aerosol Formation from the OH Oxidation of Phenol, Catechol, Styrene, Furfural, and Methyl Furfural. *ACS Earth Space Chem 8*, 1179–1192. https://doi.org/10.1021/acsearthspacechem.3c00361.

Schwartz, C., Bølling, A. K. and Carlsten, C. (2020). Controlled human exposures to wood smoke: a synthesis of the evidence. *Part Fibre Toxicol 17*, 49. https://doi.org/10.1186/s12989-020-00375-x.

Schwarze, P. E., Øvrevik, J., Låg, M. et al. (2006). Particulate matter properties and health effects: consistency of epidemiological and toxicological studies. *Hum Exp Toxicol 25*, 559–579. https://doi.org/10.1177/096032706072520.

Secondo, L. (2018). Toxicological Inhalation Effects of Metal-Based Nanoparticle Aerosols as Studied by a Portable In Vitro Exposure Cassette. *Theses and Dissertations*. https://doi.org/https://doi.org/10.25772/12NY-3M68.

Secondo, L. E., Wygal, N. J. and Lewinski, N. A. (2019). A New Portable In Vitro Exposure Cassette for Aerosol Sampling. *Journal of Visualized Experiments (JoVE)*, e58916. https://doi.org/10.3791/58916.

Seinfeld, J. H. and Pandis, S. N. (2016). *Atmospheric chemistry and physics: from air pollution to climate change*. Third edition. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.

Seki, T., Kumagai, T., Kwansa-Bentum, B. et al. (2012). Interleukin-4 (IL-4) and IL-13 Suppress Excessive Neutrophil Infiltration and Hepatocyte Damage during Acute Murine Schistosomiasis Japonica. *Infection and Immunity 80*, 159–168. https://doi.org/10.1128/iai.05581-11.

Selo, M. A., Sake, J. A., Kim, K.-J. et al. (2021). In vitro and ex vivo models in inhalation biopharmaceutical research - advances, challenges and future perspectives. *Adv Drug Deliv Rev 177*, 113862. https://doi.org/10.1016/j.addr.2021.113862.

Serna-García, M., Formaggio, A., Carceller, M.-C. et al. (2025). Identification of actin cytoskeleton organization genes in oral cancer and oral potentially malignant disorders using oral tissue RNA-seq database. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal 30*, e857–e865. https://doi.org/10.4317/medoral.27364.

Shah, B. K., Singh, B., Wang, Y. et al. (2023). Mucus Hypersecretion in Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Its Treatment. *Mediators Inflamm 2023*, 8840594. https://doi.org/10.1155/2023/8840594.

Shao, W., Xu, H., Zeng, K. et al. (2025). Advances in liver organoids: replicating hepatic complexity for toxicity assessment and disease modeling. *Stem Cell Res Ther 16*, 27. https://doi.org/10.1186/s13287-025-04139-2.

Sharma, S., Chandra, M. and Kota, S. H. (2020). Health Effects Associated with PM2.5: a Systematic Review. *Curr Pollution Rep 6*, 345–367. https://doi.org/10.1007/s40726-020-00155-3.

Shimada, A., Kawamura, N., Okajima, M. et al. (2006). Translocation Pathway of the Intratracheally Instilled Ultrafine Particles from the Lung into the Blood Circulation in the Mouse. *Toxicol Pathol 34*, 949–957. https://doi.org/10.1080/01926230601080502.

Shrivastava, M., Andreae, M. O., Artaxo, P. et al. (2019). Urban pollution greatly enhances formation of natural aerosols over the Amazon rainforest. *Nat Commun 10*, 1046. https://doi.org/10.1038/s41467-019-08909-4.

Siebert, T. A. and Rugonyi, S. (2008). Influence of liquid-layer thickness on pulmonary surfactant spreading and collapse. *Biophys J 95*, 4549–4559. https://doi.org/10.1529/biophysj.107.127654.

Sierra-Vargas, M. P., Montero-Vargas, J. M., Debray-García, Y. et al. (2023). Oxidative Stress and Air Pollution: Its Impact on Chronic Respiratory Diseases. *Int J Mol Sci 24*, 853. https://doi.org/10.3390/ijms24010853.

Sigsgaard, T., Forsberg, B., Annesi-Maesano, I. et al. (2015). Health impacts of anthropogenic biomass burning in the developed world. *European Respiratory Journal 46*, 1577–1588. https://doi.org/10.1183/13993003.01865-2014.

Silva, S., Bicker, J., Falcão, A. et al. (2023). Air-liquid interface (ALI) impact on different respiratory cell cultures. *Eur J Pharm Biopharm 184*, 62–82. https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2023.01.013.

Sim, I., Choe, W., Ri, J. et al. (2023). Chitosan oligosaccharide suppresses osteosarcoma malignancy by inhibiting CEMIP via the PI3K/AKT/mTOR pathway. *Med Oncol 40*, 294. https://doi.org/10.1007/s12032-023-02165-9.

Simon, S., Shanmugalingam, T., Neu, T. et al. (2025). Mapping the ABC transporter landscape in the human lung: A comprehensive characterisation of P-gp, MRP1 and BCRP expression and functional activity in human lung epithelial cells. *European Journal of Pharmaceutical Sciences 215*, 107333. https://doi.org/10.1016/j.ejps.2025.107333.

Song, C., Li, Q., Zhang, J. et al. (2025). Uridine Phosphorylase 1 as a Biomarker Associated with Glycolysis in Acute Lung Injury. *Inflammation 48*, 3353–3365. https://doi.org/10.1007/s10753-025-02270-z.

Song, W., Zhang, Y.-L., Zhang, Y. et al. (2022). Is biomass burning always a dominant contributor of fine aerosols in upper northern Thailand? *Environ Int 168*, 107466. https://doi.org/10.1016/j.envint.2022.107466.

Sorensen, G. L. (2018). Surfactant Protein D in Respiratory and Non-Respiratory Diseases. *Front Med (Lausanne) 5*, 18. https://doi.org/10.3389/fmed.2018.00018.

Srinivasan, B., Kolli, A. R., Esch, M. B. et al. (2015). TEER measurement techniques for in vitro barrier model systems. *J Lab Autom 20*, 107–126. https://doi.org/10.1177/2211068214561025.

Srivastava, D., Favez, O., Perraudin, E. et al. (2018). Comparison of Measurement-Based Methodologies to Apportion Secondary Organic Carbon (SOC) in PM2.5: A Review of Recent Studies. *Atmosphere 9*. https://doi.org/10.3390/atmos9110452.

Srivastava, D., Vu, T. V., Tong, S. et al. (2022). Formation of secondary organic aerosols from anthropogenic precursors in laboratory studies. *npj Clim Atmos Sci 5*, 22. https://doi.org/10.1038/s41612-022-00238-6.

Steiner, S., Majeed, S., Kratzer, G. et al. (2017). Characterization of the Vitrocell® 24/48 aerosol exposure system for its use in exposures to liquid aerosols. *Toxicol In Vitro 42*, 263–272. https://doi.org/10.1016/j.tiv.2017.04.021.

Stoehr, L. C., Endes, C., Radauer-Preiml, I. et al. (2015). Assessment of a panel of interleukin-8 reporter lung epithelial cell lines to monitor the pro-inflammatory response following zinc oxide nanoparticle exposure under different cell culture conditions. *Part Fibre Toxicol 12*, 29. https://doi.org/10.1186/s12989-015-0104-6.

Stoleriu, M. G., Ansari, M., Strunz, M. et al. (2024). COPD basal cells are primed towards secretory to multiciliated cell imbalance driving increased resilience to environmental stressors. *Thorax 79*, 524–537. https://doi.org/10.1136/thorax-2022-219958.

Stone, K. C., Mercer, R. R., Gehr, P. et al. (1992). Allometric relationships of cell numbers and size in the mammalian lung. *Am J Respir Cell Mol Biol 6*, 235–243. https://doi.org/10.1165/ajrcmb/6.2.235.

Strak, M., Weinmayr, G., Rodopoulou, S. et al. (2021). Long term exposure to low level air pollution and mortality in eight European cohorts within the ELAPSE project: pooled analysis. *BMJ 374*, n1904. https://doi.org/10.1136/bmj.n1904.

Stuetz, H., Reihs, E. I., Neuhaus, W. et al. (2023). The Cultivation Modality and Barrier Maturity Modulate the Toxicity of Industrial Zinc Oxide and Titanium Dioxide Nanoparticles on Nasal, Buccal, Bronchial, and Alveolar Mucosa Cell-Derived Barrier Models. *Int J Mol Sci 24*, 5634. https://doi.org/10.3390/ijms24065634.

Su, G., Ma, X. and Wei, H. (2020). Multiple Biological Roles of Extracellular Vesicles in Lung Injury and Inflammation Microenvironment. *Biomed Res Int 2020*, 5608382. https://doi.org/10.1155/2020/5608382.

Su, R., Jin, X., Li, H. et al. (2020). The mechanisms of PM2.5 and its main components penetrate into HUVEC cells and effects on cell organelles. *Chemosphere 241*, 125127. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125127.

Su, R., Jin, X., Zhang, W. et al. (2017). Particulate matter exposure induces the autophagy of macrophages via oxidative stress-mediated PI3K/AKT/mTOR pathway. *Chemosphere 167*, 444–453. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.10.024.

Subsomwong, P., Kranrod, C., Sakai, Y. et al. (2025). Impact of intermittent high-dose radon exposures on lung epithelial cells: proteomic analysis and biomarker identification. *J Radiat Res 66*, 107–114. https://doi.org/10.1093/jrr/rraf010.

Sun, Y. L., Zhang, Q., Anastasio, C. et al. (2010). Insights into secondary organic aerosol formed via aqueous-phase reactions of phenolic compounds based on high resolution mass spectrometry. *Atmospheric Chemistry and Physics 10*, 4809–4822. https://doi.org/10.5194/acp-10-4809-2010.

Sunil, V. R., Laumbach, R. J., Patel, K. J. et al. (2007). Pulmonary effects of inhaled limonene ozone reaction products in elderly rats. *Toxicology and Applied Pharmacology 222*, 211–220. https://doi.org/10.1016/j.taap.2007.05.003.

Surdu, M., Pospisilova, V., Xiao, M. et al. (2021). Molecular characterization of ultrafine particles using extractive electrospray time-of-flight mass spectrometry. *Environ Sci: Atmos 1*, 434–448. https://doi.org/10.1039/D1EA00050K.

Surratt, J. D., Lin, Y.-H., Arashiro, M. et al. (2019). Understanding the Early Biological Effects of Isoprene-Derived Particulate Matter Enhanced by Anthropogenic Pollutants. *Res Rep Health Eff Inst 2019*, 198

Sznitman, J., Heimsch, T., Wildhaber, J. H. et al. (2009). Respiratory Flow Phenomena and Gravitational Deposition in a Three-Dimensional Space-Filling Model of the Pulmonary Acinar Tree. *J Biomech Eng 131*. https://doi.org/10.1115/1.3049481.

Takahashi, K., Podyma-Inoue, K. A., Saito, M. et al. (2022). TGF-β generates a population of cancer cells residing in G1 phase with high motility and metastatic potential via KRTAP2-3. *Cell Rep 40*, 111411. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.111411.

Tannenbaum, J. and Bennett, B. T. (2015). Russell and Burch's 3Rs Then and Now: The Need for Clarity in Definition and Purpose. *J Am Assoc Lab Anim Sci 54*, 120–132

Tarín-Carrasco, P., Im, U., Geels, C. et al. (2021). Contribution of fine particulate matter to present and future premature mortality over Europe: A non-linear response. *Environ Int 153*, 106517. https://doi.org/10.1016/j.envint.2021.106517.

Tessum, M. W., Anenberg, S. C., Chafe, Z. A. et al. (2022). Sources of ambient PM2.5 exposure in 96 global cities. *Atmospheric Environment 286*, 119234. https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2022.119234.

Thangavel, P., Park, D. and Lee, Y.-C. (2022). Recent Insights into Particulate Matter (PM2.5)-Mediated Toxicity in Humans: An Overview. *Int J Environ Res Public Health 19*, 7511. https://doi.org/10.3390/ijerph19127511.

Thanki, K., van Eetvelde, D., Geyer, A. et al. (2019). Mechanistic profiling of the release kinetics of siRNA from lipidoid-polymer hybrid nanoparticles *in vitro* and *in vivo* after pulmonary administration. *Journal of Controlled Release 310*, 82–93. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.08.004.

Thiagarajan, V., Nah, T. and Xin, X. (2024). Impacts of atmospheric particulate matter deposition on phytoplankton: A review. *Sci Total Environ 950*, 175280. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.175280.

Thiebaut, A. M., Buendia, I., Ginet, V. et al. (2022). Thrombolysis by PLAT/tPA increases serum free IGF1 leading to a decrease of deleterious autophagy following brain ischemia. *Autophagy 18*, 1297–1317. https://doi.org/10.1080/15548627.2021.1973339.

Thimmulappa, R. K., Chattopadhyay, I. and Rajasekaran, S. (2020). Oxidative Stress Mechanisms in the Pathogenesis of Environmental Lung Diseases. In *Oxidative Stress in Lung Diseases* (103–137). Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-32-9366-3_5.

Thome, M. and Tschopp, J. (2001). Regulation of lymphocyte proliferation and death by FLIP. *Nat Rev Immunol 1*, 50–58. https://doi.org/10.1038/35095508.

Thornton, D. J., Rousseau, K. and McGuckin, M. A. (2008). Structure and Function of the Polymeric Mucins in Airways Mucus. *Annual Review of Physiology 70*, 459–486. https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.70.113006.100702.

Tian, X., Tao, H., Brisolara, J. et al. (2008). Acute lung injury induced by chlorine inhalation in C57BL/6 and FVB/N mice. *Inhal Toxicol 20*, 783–793. https://doi.org/10.1080/08958370802007841.

Tiitta, P., Leskinen, A., Hao, L. et al. (2016). Transformation of logwood combustion emissions in a smog chamber: formation of secondary organic aerosol and changes in the primary organic aerosol upon daytime and nighttime aging. *Atmospheric Chemistry and Physics 16*, 13251–13269. https://doi.org/10.5194/acp-16-13251-2016.

Tilly, T. B., Nelson, M. T., Chakravarthy, K. B. et al. (2020). In Vitro Aerosol Exposure to Nanomaterials: From Laboratory to Environmental Field Toxicity Testing. *Chem Res Toxicol 33*, 1179–1194. https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.9b00237.

Tilly, T. B., Ward, R. X., Luthra, J. K. et al. (2019). Condensational particle growth device for reliable cell exposure at the air-liquid interface to nanoparticles. *Aerosol Sci Technol 53*, 1415–1428. https://doi.org/10.1080/02786826.2019.1659938.

Tilly, T. B., Ward, R. X., Morea, A. F. et al. (2023). Toxicity assessment of CeO_2 and CuO nanoparticles at the air-liquid interface using bioinspired condensational particle growth. *Hygiene and Environmental Health Advances 7*, 100074. https://doi.org/10.1016/j.heha.2023.100074.

Tippe, A., Heinzmann, U. and Roth, C. (2002). Deposition of fine and ultrafine aerosol particles during exposure at the air/cell interface. *Journal of Aerosol Science 33*, 207–218. https://doi.org/10.1016/S0021-8502(01)00158-6.

Togami, K., Yamaguchi, K., Chono, S. et al. (2017). Evaluation of permeability alteration and epithelial–mesenchymal transition induced by transforming growth factor-β1 in A549, NCI-H441, and Calu-3 cells: Development of an *in vitro* model of respiratory epithelial cells in idiopathic pulmonary fibrosis. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods 86*, 19–27. https://doi.org/10.1016/j.vascn.2017.02.023.

Tong, H., Lakey, P. S. J., Arangio, A. M. et al. (2018). Reactive Oxygen Species Formed by Secondary Organic Aerosols in Water and Surrogate Lung Fluid. *Environ Sci Technol 52*, 11642–11651. https://doi.org/10.1021/acs.est.8b03695.

Tong, W., Qin, N., Lu, T. et al. (2025). Integrating bulk and single-cell RNA sequencing reveals SH3D21 promotes hepatocellular carcinoma progression by activating the PI3K/AKT/mTOR pathway. *PLoS One 20*, e0302766. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0302766.

Traboulsi, H., Guerrina, N., Iu, M. et al. (2017). Inhaled Pollutants: The Molecular Scene behind Respiratory and Systemic Diseases Associated with Ultrafine Particulate Matter. *International Journal of Molecular Sciences 18*, 243. https://doi.org/10.3390/ijms18020243.

Tran, H. M., Tsai, F.-J., Lee, Y.-L. et al. (2023). The impact of air pollution on respiratory diseases in an era of climate change: A review of the current evidence. *Science of The Total Environment 898*, 166340. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.166340.

Tsai, D.-H., Amyai, N., Marques-Vidal, P. et al. (2012). Effects of particulate matter on inflammatory markers in the general adult population. *Part Fibre Toxicol 9*, 24. https://doi.org/10.1186/1743-8977-9-24.

Tsai, T.-L., Lin, Y.-T., Hwang, B.-F. et al. (2019). Fine particulate matter is a potential determinant of Alzheimer's disease: A systemic review and meta-analysis. *Environ Res 177*, 108638. https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.108638.

Tsoutsoulopoulos, A., Gohlsch, K., Möhle, N. et al. (2019). Validation of the CULTEX® Radial Flow System for the assessment of the acute inhalation toxicity of airborne particles. *Toxicology in Vitro 58*, 245–255. https://doi.org/10.1016/j.tiv.2019.03.020.

Tsoutsoulopoulos, A., Möhle, N., Aufderheide, M. et al. (2016). Optimization of the CULTEX® radial flow system for *in vitro* investigation of lung damaging agents. *Toxicology Letters 244*, 28–34. https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2015.09.003.

Tsuchiya, S., Yamabe, M., Yamaguchi, Y. et al. (1980). Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *International Journal of Cancer 26*, 171–176. https://doi.org/10.1002/ijc.2910260208.

Tsuda, A., Butler, J. P. and Fredberg, J. J. (1994). Effects of alveolated duct structure on aerosol kinetics. II. Gravitational sedimentation and inertial impaction. *J Appl Physiol (1985) 76*, 2510–2516. https://doi.org/10.1152/jappl.1994.76.6.2510.

Tsyupa, B., Campiglio, C. E., Carrara, E. et al. (2026). On-site ALI versus submerged culture: Chemical and toxicological investigation of brake wear sub-micrometric particles. *Environmental Toxicology and Pharmacology 121*, 104915. https://doi.org/10.1016/j.etap.2025.104915.

Tuet, W. Y., Chen, Y., Fok, S. et al. (2017). Inflammatory responses to secondary organic aerosols (SOA) generated from biogenic and anthropogenic precursors. *Atmospheric Chemistry and Physics 17*, 11423–11440. https://doi.org/10.5194/acp-17-11423-2017.

Tuet, W. Y., Chen, Y., Xu, L. et al. (2017). Chemical oxidative potential of secondary organic aerosol (SOA) generated from the photooxidation of biogenic and anthropogenic volatile organic compounds. *Atmospheric Chemistry and Physics 17*, 839–853. https://doi.org/10.5194/acp-17-839-2017.

Turner, M. C., Andersen, Z. J., Baccarelli, A. et al. (2020). Outdoor air pollution and cancer: An overview of the current evidence and public health recommendations. *CA Cancer J Clin*. https://doi.org/10.3322/caac.21632.

Turner, M. D., Nedjai, B., Hurst, T. et al. (2014). Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research 1843*, 2563–2582. https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.05.014.

UNECE (2021). Wood energy on the rise in Europe | UNECE. Available at: https://unece.org/climate-change/press/wood-energy-rise-europe [Accessed April 15, 2026].

Upadhyay, S. and Palmberg, L. (2018). Air-Liquid Interface: Relevant In Vitro Models for Investigating Air Pollutant-Induced Pulmonary Toxicity. *Toxicological Sciences 164*, 21–30. https://doi.org/10.1093/toxsci/kfy053.

Ustache, A. (2021). Guide : Guide méthodologique pour la mesure de la concentration en nombre des particules dans l'air ambiant par un compteur à noyaux de condensation | LCSQA. Available at: https://www.lcsqa.org/fr/rapport/guide-guide-methodologique-pour-la-mesure-de-la-concentration-en-nombre-des-particules-dans [Accessed February 25, 2026].

Valavanidis, A., Fiotakis, K. and Vlachogianni, T. (2008). Airborne Particulate Matter and Human Health: Toxicological Assessment and Importance of Size and Composition of Particles for Oxidative Damage and Carcinogenic Mechanisms. *Journal of Environmental Science and Health, Part C 26*, 339–362. https://doi.org/10.1080/10590500802494538.

Vargas Becerra, M. H. (2009). [Physiopathology of asthma]. *Rev Alerg Mex 56 Suppl 1*, S24-28

van den Velde, S., Quirynen, M., van Hee, P. et al. (2007). Differences between Alveolar Air and Mouth Air. *Anal Chem 79*, 3425–3429. https://doi.org/10.1021/ac062009a.

Velden, V. H. and Versnel, H. F. (1998). Bronchial epithelium: morphology, function and pathophysiology in asthma. *Eur Cytokine Netw 9*, 585–597

Veldhuizen, R. A., McCaig, L. A., Akino, T. et al. (1995). Pulmonary surfactant subfractions in patients with the acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med 152*, 1867–1871. https://doi.org/10.1164/ajrccm.152.6.8520748.

Verma, N., Hochhegger, B., Mukhopadhyay, S. et al. (2025). Acute Lung Injury. *J Thorac Imaging 40*, e0820. https://doi.org/10.1097/RTI.0000000000000820.

Verma, V., Fang, T., Xu, L. et al. (2015). Organic Aerosols Associated with the Generation of Reactive Oxygen Species (ROS) by Water-Soluble PM2.5. *Environ Sci Technol 49*, 4646–4656. https://doi.org/10.1021/es505577w.

Verstraelen, S., Jacobs, A., Laer, J. V. et al. (2021). An in vitro air-liquid interface inhalation platform for petroleum substances and constituents. *ALTEX - Alternatives to Animal Experimentation 38*, 550–564. https://doi.org/10.14573/altex.2010211.

Viana, M., Pey, J., Querol, X. et al. (2014). Natural sources of atmospheric aerosols influencing air quality across Europe. *Science of The Total Environment 472*, 825–833. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.11.140.

Vicente, E. D. and Alves, C. A. (2018). An overview of particulate emissions from residential biomass combustion. *Atmospheric Research 199*, 159–185. https://doi.org/10.1016/j.atmosres.2017.08.027.

Virtanen, A., Joutsensaari, J., Koop, T. et al. (2010). An amorphous solid state of biogenic secondary organic aerosol particles. *Nature 467*, 824–827. https://doi.org/10.1038/nature09455.

Visigalli, R., Rotoli, B. M., Ferrari, F. et al. (2022). Expression and Function of ABC Transporters in Human Alveolar Epithelial Cells. *Biomolecules 12*, 1260. https://doi.org/10.3390/biom12091260.

Vitrocell® VITROCELL® Exposure Systems for Inhalation Toxicology. *VITROCELL*. Available at: https://www.vitrocell.com/inhalation-toxicology/exposure-systems/ [Accessed February 6, 2026].

Voisin, C., Aerts, C., Jakubczak, E. et al. (1977). [Effects of nitrogen dioxide on alveolar macrophages surviving in the gas phase. A new experimental model for the study of in vitro cytotoxicity of toxic gases (author's transl)]. *Bull Eur Physiopathol Respir 13*, 137–144

Vojtisek-Lom, M., Dittrich, L., Pechout, M. et al. (2025). Portable emissions toxicity system: Evaluating the toxicity of emissions or polluted air by exposure of cell cultures at air-liquid interface in a compact field-deployable setup. *Science of The Total Environment 959*, 178010. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.178010.

Vojtisek-Lom, M., Pechout, M., Macoun, D. et al. (2019). Assessing Exhaust Toxicity with Biological Detector: Configuration of Portable Air-Liquid Interface Human Lung Cell Model Exposure System, Sampling Train and Test Conditions. *SAE Int J Adv & Curr Prac in Mobility 2*, 520–534. https://doi.org/10.4271/2019-24-0050.

Volckens, J., Dailey, L., Walters, G. et al. (2009). Direct Particle-to-Cell Deposition of Coarse Ambient Particulate Matter Increases the Production of Inflammatory Mediators from Cultured Human Airway Epithelial Cells. *Environ Sci Technol 43*, 4595–4599. https://doi.org/10.1021/es900698a.

Volkamer, R., Platt, U. and Wirtz, K. (2001). Primary and Secondary Glyoxal Formation from Aromatics: Experimental Evidence for the Bicycloalkyl−Radical Pathway from Benzene, Toluene, and p-Xylene. *J Phys Chem A 105*, 7865–7874. https://doi.org/10.1021/jp010152w.

W. M. S. Russell, R. L. Burch (1960). *The principles of humane experimental technique.* Available at: https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/19601401516.

Wallace, J., McElroy, M. C., Klausner, M. et al. (2025). Two- and Three-Dimensional Culture Systems: Respiratory In Vitro Tissue Models for Chemical Screening and Risk-Based Decision Making. *Pharmaceuticals 18*. https://doi.org/10.3390/ph18010113.

Wang, B., Wang, Y., Zhang, J. et al. (2023). ROS-induced lipid peroxidation modulates cell death outcome: mechanisms behind apoptosis, autophagy, and ferroptosis. *Arch Toxicol 97*, 1439–1451. https://doi.org/10.1007/s00204-023-03476-6.

Wang, F., Liu, J. and Zeng, H. (2020). Interactions of particulate matter and pulmonary surfactant: Implications for human health. *Adv Colloid Interface Sci 284*, 102244. https://doi.org/10.1016/j.cis.2020.102244.

Wang, G., Zhang, X., Liu, X. et al. (2020). Co-culture of human alveolar epithelial (A549) and macrophage (THP-1) cells to study the potential toxicity of ambient PM2.5: a comparison of growth under ALI and submerged conditions. *Toxicology Research 9*, 636. https://doi.org/10.1093/toxres/tfaa072.

Wang, H., Zhang, W., Liu, J. et al. (2021). NF-κB and FosB mediate inflammation and oxidative stress in the blast lung injury of rats exposed to shock waves. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai) 53*, 283–293. https://doi.org/10.1093/abbs/gmaa179.

Wang, J., Huang, J., Wang, L. et al. (2017). Urban particulate matter triggers lung inflammation via the ROS-MAPK-NF-κB signaling pathway. *J Thorac Dis 9*, 4398–4412. https://doi.org/10.21037/jtd.2017.09.135.

Wang, J., Li, R., Peng, Z. et al. (2020). [Corrigendum] HMGB1 participates in LPS-induced acute lung injury by activating the AIM2 inflammasome in macrophages and inducing polarization of M1 macrophages via TLR2, TLR4, and RAGE/NF-κB signaling pathways. *International Journal of Molecular Medicine 45*, 1628–1628. https://doi.org/10.3892/ijmm.2020.4530.

Wang, K., Wen, F. and Xu, D. (2008). Mucus hypersecretion in the airway. *Chin Med J (Engl) 121*, 649–652

Wang, M., Kim, R. Y., Kohonen-Corish, M. R. J. et al. (2025). Particulate matter air pollution as a cause of lung cancer: epidemiological and experimental evidence. *Br J Cancer 132*, 986–996. https://doi.org/10.1038/s41416-025-02999-2.

Wang, P., Yang, Y., Xue, D. et al. (2023). Aerosols overtake greenhouse gases causing a warmer climate and more weather extremes toward carbon neutrality. *Nat Commun 14*, 7257. https://doi.org/10.1038/s41467-023-42891-2.

Wang, S., Gallimore, P. J., Liu-Kang, C. et al. (2023). Dynamic Wood Smoke Aerosol Toxicity during Oxidative Atmospheric Aging. *Environ Sci Technol 57*, 1246–1256. https://doi.org/10.1021/acs.est.2c05929.

Wang, S., Ye, J., Soong, R. et al. (2018). Relationship between chemical composition and oxidative potential of secondary organic aerosol from polycyclic aromatic hydrocarbons. *Atmospheric Chemistry and Physics 18*, 3987–4003. https://doi.org/10.5194/acp-18-3987-2018.

Wang, Y. and Tang, M. (2020). PM2.5 induces autophagy and apoptosis through endoplasmic reticulum stress in human endothelial cells. *Science of The Total Environment 710*, 136397. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.136397.

Wang, Y., Wang, L., Ma, S. et al. (2024). Repair and regeneration of the alveolar epithelium in lung injury. *FASEB J 38*, e23612. https://doi.org/10.1096/fj.202400088R.

Ward, R. X., Tilly, T. B., Mazhar, S. I. et al. (2020). Mimicking the human respiratory system: Online *in vitro* cell exposure for toxicity assessment of welding fume aerosol. *Journal of Hazardous Materials 395*, 122687. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122687.

Wardoyo, A. Y. P. (2019). Biomass burning; ultrafine particles, concentration, and organ effect. *J Phys: Conf Ser 1321*, 032134. https://doi.org/10.1088/1742-6596/1321/3/032134.

Weber, S., Salameh, D., Albinet, A. et al. (2019). Comparison of PM10 Sources Profiles at 15 French Sites Using a Harmonized Constrained Positive Matrix Factorization Approach. *Atmosphere 10*, 310. https://doi.org/10.3390/atmos10060310.

Wei, H., Yuan, W., Yu, H. et al. (2021). Cytotoxicity induced by fine particulate matter (PM2.5) via mitochondria-mediated apoptosis pathway in rat alveolar macrophages. *Environ Sci Pollut Res Int 28*, 25819–25829. https://doi.org/10.1007/s11356-021-12431-w.

Wei, X., Li, X., Hu, S. et al. (2023). Regulation of Ferroptosis in Lung Adenocarcinoma. *Int J Mol Sci 24*, 14614. https://doi.org/10.3390/ijms241914614.

Weibel, E. R. (2015). On the Tricks Alveolar Epithelial Cells Play to Make a Good Lung. *Am J Respir Crit Care Med 191*, 504–513. https://doi.org/10.1164/rccm.201409-1663OE.

Weichenthal, S., Pinault, L., Christidis, T. et al. (2022). How low can you go? Air pollution affects mortality at very low levels. *Science Advances 8*, eabo3381. https://doi.org/10.1126/sciadv.abo3381.

Weiss, A.-V., Schorr, D., Metz, J. K. et al. (2022). Gelatin nanoparticles with tunable mechanical properties: effect of crosslinking time and loading. *Beilstein J Nanotechnol 13*, 778–787. https://doi.org/10.3762/bjnano.13.68.

Weitekamp, C. A., Stevens, T., Stewart, M. J. et al. (2020). Health effects from freshly emitted versus oxidatively or photochemically aged air pollutants. *Science of The Total Environment 704*, 135772. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135772.

Wertheimer, S. J., Myers, C. L., Wallace, R. W. et al. (1992). Intercellular adhesion molecule-1 gene expression in human endothelial cells. Differential regulation by tumor necrosis factor-alpha and phorbol myristate acetate. *Journal of Biological Chemistry 267*, 12030–12035. https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)49801-3.

Whitsett, J. A. (2018). Airway Epithelial Differentiation and Mucociliary Clearance. *Ann Am Thorac Soc 15*, S143–S148. https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.201802-128AW.

Williams, M. C. (2003). Alveolar Type I Cells: Molecular Phenotype and Development. *Annual Review of Physiology 65*, 669–695. https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.65.092101.142446.

Win-Shwe, T.-T., Kyi-Tha-Thu, C., Moe, Y. et al. (2015). Nano-Sized Secondary Organic Aerosol of Diesel Engine Exhaust Origin Impairs Olfactory-Based Spatial Learning Performance in Preweaning Mice. *Nanomaterials 5*, 1147–1162. https://doi.org/10.3390/nano5031147.

Wittekindt, O. H. (2017). Tight junctions in pulmonary epithelia during lung inflammation. *Pflugers Arch 469*, 135–147. https://doi.org/10.1007/s00424-016-1917-3.

World Health Organization (2024). *Ambient (outdoor) air pollution*. Available at: https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/ambient-(outdoor)-air-quality-and-health [Accessed March 19, 2025].

World Health Organization (2013). *Review of evidence on health aspects of air pollution: REVIHAAP project: technical report*. Available at: https://www.who.int/europe/publications/i/item/WHO-EURO-2013-4101-43860-61757 [Accessed September 29, 2023].

World Health Organization (2023). *WHO Ambient Air Quality Database, 2022 Update: Status Report*. 1st ed. Geneva: World Health Organization.

Wu, J., Wang, Y., Liu, G. et al. (2018). Characterization of air-liquid interface culture of A549 alveolar epithelial cells. *Braz J Med Biol Res 51*, e6950. https://doi.org/10.1590/1414-431x20176950.

Wu, X.-M., Jin, C., Gu, Y.-L. et al. (2020). Gluconokinase IDNK Promotes Cell Proliferation and Inhibits Apoptosis in Hepatocellular Carcinoma. *Onco Targets Ther 13*, 1767–1776. https://doi.org/10.2147/OTT.S234055.

Xiao, Y., Jia, Y. and Chen, L. (2026). Bronchial epithelial-derived exosomal SLC6A14 promotes airway inflammation and mucus hypersecretion via the ZFP36L1/IL-8 axis. *Funct Integr Genomics 26*, 51. https://doi.org/10.1007/s10142-026-01835-x.

Xie, L., Lu, S., Guo, F. et al. (2025). [Integration of multisource transcriptomics data to identify potential biomarkers of asthmatic epithelial cells]. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi 41*, 695–705

Xie, N., Bai, J., Hou, Y. et al. (2025). hPSCs-derived brain organoids for disease modeling, toxicity testing and drug evaluation. *Exp Neurol 385*, 115110. https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2024.115110.

Xie, Y., Williams, N. G., Tolic, A. et al. (2012). Aerosolized ZnO Nanoparticles Induce Toxicity in Alveolar Type II Epithelial Cells at the Air-Liquid Interface. *Toxicol Sci 125*, 450–461. https://doi.org/10.1093/toxsci/kfr251.

XP CEN/TS 17434 (2020). Air ambiant - Détermination de la distribution granulométrique de particules d'un aérosol atmosphérique à l'aide d'un spectromètre de granulométrie à mobilité électrique (MPSS). *Afnor EDITIONS*. Available at: https://www.boutique.afnor.org/fr-fr/norme/xp-cen-ts-17434/air-ambiant-determination-de-la-distribution-granulometrique-de-particules-/fa198663/85820 [Accessed February 25, 2026].

Xu, C., Zhang, Q., Huang, G. et al. (2023). The impact of PM2.5 on kidney. *Journal of Applied Toxicology 43*, 107–121. https://doi.org/10.1002/jat.4356.

Xu, J., Su, Z., Liu, C. et al. (2025). Climate change, air pollution and chronic respiratory diseases: understanding risk factors and the need for adaptive strategies. *Environmental Health and Preventive Medicine 30*, 7–7. https://doi.org/10.1265/ehpm.24-00243.

Xu, W., Croteau, P., Williams, L. et al. (2017). Laboratory characterization of an aerosol chemical speciation monitor with PM2.5 measurement capability. *Aerosol Science and Technology 51*, 69–83. https://doi.org/10.1080/02786826.2016.1241859.

Xue, J., Jiang, C., Chen, X. et al. (2024). Trim31 deficiency exacerbates airway inflammation in asthma by enhancing the activation of the NLRP3 inflammasome. *Int Immunopharmacol 138*, 112591. https://doi.org/10.1016/j.intimp.2024.112591.

Yadav, B. and Yadav, J. S. (2024). Carbon Nanotube Immunotoxicity in Alveolar Epithelial Type II Cells Is Mediated by Physical Contact-Independent Cell-Cell Interaction with Macrophages as Demonstrated in an Optimized Air-Liquid Interface (ALI) Coculture Model. *Nanomaterials (Basel) 14*, 1273. https://doi.org/10.3390/nano14151273.

Yan, C., Nie, W., Vogel, A. L. et al. (2020). Size-dependent influence of NOx on the growth rates of organic aerosol particles. *Science Advances 6*, eaay4945. https://doi.org/10.1126/sciadv.aay4945.

Yang, J., Kalhan, S. C. and Hanson, R. W. (2009). What is the metabolic role of phosphoenolpyruvate carboxykinase? *J Biol Chem 284*, 27025–27029. https://doi.org/10.1074/jbc.R109.040543.

Yang, L., Zhang, Y., Qi, W. et al. (2022). Adverse effects of PM2.5 on cardiovascular diseases. *Rev Environ Health 37*, 71–80. https://doi.org/10.1515/reveh-2020-0155.

Yang, Y. and Tan, X. (2026). Multi-Omics and Network Pharmacology Reveal Calycosin as a Candidate Metabolic Modulator in COPD. *Comb Chem High Throughput Screen*. https://doi.org/10.2174/0113862073403083251019173458.

Yang, Y.-L., Sun, L.-F., Yu, Y. et al. (2018). Deficiency of Gpr1 improves steroid hormone abnormality in hyperandrogenized mice. *Reprod Biol Endocrinol 16*, 50. https://doi.org/10.1186/s12958-018-0363-9.

Ye, J., Salehi, S., North, M. L. et al. (2017). Development of a Novel Simulation Reactor for Chronic Exposure to Atmospheric Particulate Matter. *Sci Rep 7*, 42317. https://doi.org/10.1038/srep42317.

Yee, L. D., Kautzman, K. E., Loza, C. L. et al. (2013). Secondary organic aerosol formation from biomass burning intermediates: phenol and methoxyphenols. *Atmospheric Chemistry and Physics 13*, 8019–8043. https://doi.org/10.5194/acp-13-8019-2013.

Yegen, C.-H., Marchant, D., Bernaudin, J.-F. et al. (2023). Chronic pulmonary fibrosis alters the functioning of the respiratory neural network. *Front Physiol 14*, 1205924. https://doi.org/10.3389/fphys.2023.1205924.

Yi, X., Wang, Z., Ren, J. et al. (2019). Overexpression of chaperonin containing T-complex polypeptide subunit zeta 2 (CCT6b) suppresses the functions of active fibroblasts in a rat model of joint contracture. *J Orthop Surg Res 14*, 125. https://doi.org/10.1186/s13018-019-1161-6.

Yin, J., Wu, D., Chen, X. et al. (2025). Organoid for Air Pollution Toxicity Assessment: Advances and Environmental Applicability. *Environ Health 3*, 1456–1474. https://doi.org/10.1021/envhealth.5c00141.

Yu, L., Smith, J., Laskin, A. et al. (2014). Chemical characterization of SOA formed from aqueous-phase reactions of phenols with the triplet excited state of carbonyl and hydroxyl radical. *Atmospheric Chemistry and Physics 14*, 13801–13816. https://doi.org/10.5194/acp-14-13801-2014.

Yu, L., Smith, J., Laskin, A. et al. (2016). Molecular transformations of phenolic SOA during photochemical aging in the aqueous phase: competition among oligomerization, functionalization, and fragmentation. *Atmospheric Chemistry and Physics 16*, 4511–4527. https://doi.org/10.5194/acp-16-4511-2016.

Yu, T. and Sun, S. (2023). Role and mechanism of ferroptosis in acute lung injury. *Cell Cycle 22*, 2119–2129. https://doi.org/10.1080/15384101.2023.2278328.

Yu, T., Zhang, X., Zhong, L. et al. (2017). The use of a 0.20 µm particulate matter filter decreases cytotoxicity in lung epithelial cells following air-liquid interface exposure to motorcycle exhaust. *Environmental Pollution 227*, 287–295. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.04.080.

Yu, W., Xu, R., Ye, T. et al. (2024). Estimates of global mortality burden associated with short-term exposure to fine particulate matter (PM2·5). *The Lancet Planetary Health 8*, e146–e155. https://doi.org/10.1016/S2542-5196(24)00003-2.

Yu, Z., Jang, M., Sabo-Attwood, T. et al. (2017). Prediction of delivery of organic aerosols onto air-liquid interface cells in vitro using an electrostatic precipitator. *Toxicol In Vitro 42*, 319–328. https://doi.org/10.1016/j.tiv.2017.05.011.

Yue, D., Zhang, Q., Zhang, J. et al. (2023). Diesel exhaust PM2.5 greatly deteriorates fibrosis process in pre-existing pulmonary fibrosis via ferroptosis. *Environ Int 171*, 107706. https://doi.org/10.1016/j.envint.2022.107706.

Yuki, R., Aoyama, K., Kubota, S. et al. (2015). Overexpression of zinc-finger protein 777 (ZNF777) inhibits proliferation at low cell density through down-regulation of FAM129A. *J Cell Biochem 116*, 954–968. https://doi.org/10.1002/jcb.25046.

Zagryazhskaya, A., Gyuraszova, K. and Zhivotovsky, B. (2015). Cell death in cancer therapy of lung adenocarcinoma. *Int J Dev Biol 59*, 119–129. https://doi.org/10.1387/ijdb.150044bz.

Zammit, C., Torzhenskaya, N., Ozarkar, P. D. et al. (2021). Neurological disorders vis-à-vis climate change. *Early Hum Dev 155*, 105217. https://doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2020.105217.

Zanatta, M., Gysel, M., Bukowiecki, N. et al. (2016). A European aerosol phenomenology-5: Climatology of black carbon optical properties at 9 regional background sites across Europe. *Atmospheric Environment 145*, 346–364. https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2016.09.035.

Zavala, J., Greenan, R., Krantz, Q. T. et al. (2017). Regulating temperature and relative humidity in air–liquid interface in vitro systems eliminates cytotoxicity resulting from control air exposures. *Toxicology Research 6*, 448–459. https://doi.org/10.1039/c7tx00109f.

Zavala, J., Lichtveld, K., Ebersviller, S. et al. (2014). The Gillings Sampler--an electrostatic air sampler as an alternative method for aerosol in vitro exposure studies. *Chem Biol Interact 220*, 158–168. https://doi.org/10.1016/j.cbi.2014.06.026.

Zelikoff, J. T., Chen, L. C., Cohen, M. D. et al. (2002). The Toxicology of Inhaled Woodsmoke. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B 5*, 269–282. https://doi.org/10.1080/10937400290070062.

Zhai, X., Wang, J., Sun, J. et al. (2022). PM2.5 induces inflammatory responses via oxidative stress-mediated mitophagy in human bronchial epithelial cells. *Toxicol Res (Camb) 11*, 195–205. https://doi.org/10.1093/toxres/tfac001.

Zhang, G., David, A. and Wiedmann, T. S. (2007). Performance of the Vibrating Membrane Aerosol Generation Device: Aeroneb Micropump Nebulizer™. *Journal of Aerosol Medicine 20*, 408–416. https://doi.org/10.1089/jam.2007.0622.

Zhang, Q., Jimenez, J. L., Canagaratna, M. R. et al. (2007). Ubiquity and dominance of oxygenated species in organic aerosols in anthropogenically-influenced Northern Hemisphere midlatitudes. *Geophysical Research Letters 34*. https://doi.org/10.1029/2007GL029979.

Zhang, Q., Jimenez, J. L., Canagaratna, M. R. et al. (2011). Understanding atmospheric organic aerosols via factor analysis of aerosol mass spectrometry: a review. *Anal Bioanal Chem 401*, 3045–3067. https://doi.org/10.1007/s00216-011-5355-y.

Zhang, Q., Worsnop, D. R., Canagaratna, M. R. et al. (2005). Hydrocarbon-like and oxygenated organic aerosols in Pittsburgh: insights into sources and processes of organic aerosols. *Atmospheric Chemistry and Physics 5*, 3289–3311. https://doi.org/10.5194/acp-5-3289-2005.

Zhang, X., Liu, H., Cheng, J. et al. (2025). Gas-Phase Oxidation of Guaiacol by NO3 Radicals: Kinetic Measurements and Implications. *ACS EST Air 2*, 903–910. https://doi.org/10.1021/acsestair.4c00353.

Zhang, Y., Albinet, A., Petit, J.-E. et al. (2020). Substantial brown carbon emissions from wintertime residential wood burning over France. *Science of The Total Environment 743*, 140752. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140752.

Zhang, Y., Luo, N., Li, G. et al. (2026). People with respiratory inflammation may be at higher health risk of bioaerosols: A comparative study of air-liquid interface and submerged exposure models. *Ecotoxicology and Environmental Safety 309*, 119672. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2026.119672.

Zhang, Y., Zhang, Q., Li, Q. et al. (2025). Mechanical stress facilitates calcium influx and growth of alveolar epithelial cells via activation of the BDKRB1/Ca2+/CaMKII/MEK1/ERK axis. *Respir Res 26*, 168. https://doi.org/10.1186/s12931-025-03240-7.

Zhang, Y.-Q., Chen, D.-H., Ding, X. et al. (2019). Impact of anthropogenic emissions on biogenic secondary organic aerosol: observation in the Pearl River Delta, southern China. *Atmospheric Chemistry and Physics 19*, 14403–14415. https://doi.org/10.5194/acp-19-14403-2019.

Zhao, J., Dong, Q.-Z., Zhong, F. et al. (2017). NMI promotes hepatocellular carcinoma progression via BDKRB2 and MAPK/ERK pathway. *Oncotarget 8*, 12174–12185. https://doi.org/10.18632/oncotarget.14556.

Zhao, J., Zheng, B., Ciais, P. et al. (2025). Global warming amplifies wildfire health burden and reshapes inequality. *Nature 647*, 928–934. https://doi.org/10.1038/s41586-025-09612-9.

Zhao, Y., Hennigan, C. J., May, A. A. et al. (2014). Intermediate-Volatility Organic Compounds: A Large Source of Secondary Organic Aerosol. *Environ Sci Technol 48*, 13743–13750. https://doi.org/10.1021/es5035188.

Zhou, J., Elser, M., Huang, R.-J. et al. (2019). Predominance of secondary organic aerosol to particle-bound reactive oxygen species activity in fine ambient aerosol. *Atmospheric Chemistry and Physics 19*, 14703–14720. https://doi.org/10.5194/acp-19-14703-2019.

Zhou, S. and Wenger, J. C. (2013). Kinetics and products of the gas-phase reactions of acenaphthene with hydroxyl radicals, nitrate radicals and ozone. *Atmospheric Environment 72*, 97–104. https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2013.02.044.

Zhou, Y., Wu, Q., Li, Y. et al. (2023). Low-dose of polystyrene microplastics induce cardiotoxicity in mice and human-originated cardiac organoids. *Environ Int 179*, 108171. https://doi.org/10.1016/j.envint.2023.108171.

Zhu, X.-R., Peng, S.-Q., Wang, L. et al. (2021). Identification of phosphoenolpyruvate carboxykinase 1 as a potential therapeutic target for pancreatic cancer. *Cell Death Dis 12*, 918. https://doi.org/10.1038/s41419-021-04201-w.

Zielinska, B. (2008). Analysis of Semi-Volatile Organic Compound by GC/MS, DRI Standard Operating Procedure. *Desert Research Institute, Reno (NV)*. Available at: https://www.epa.gov/ttnamti1/files/ambient/pm25/spec/DRISOPSVOC92408.pdf [Accessed April 19, 2019].

Ziemann, P. J. and Atkinson, R. (2012). Kinetics, products, and mechanisms of secondary organic aerosol formation. *Chem Soc Rev 41*, 6582–6605. https://doi.org/10.1039/C2CS35122F.

Zigler, J. S., Lepe-Zuniga, J. L., Vistica, B. et al. (1985). Analysis of the cytotoxic effects of light-exposed hepes-containing culture medium. *In Vitro Cell Dev Biol 21*, 282–287. https://doi.org/10.1007/BF02620943.

Zimmermann, E. J., Das, A., Huber, A. et al. (2025). Toxicological effects of long-term continuous exposure to ambient air on human bronchial epithelial Calu-3 cells exposed at the air-liquid interface. *Environmental Research 269*, 120759. https://doi.org/10.1016/j.envres.2025.120759.

Zimmermann-Klemd, A., Wende Wolf, L., Emser, FS. et al. (2025). Next-generation high-throughput in vitro exposure system for early hazard ranking and comparative assessment of cigarette smoke and heated tobacco aerosols. *Environ Sci Eur 37*, s12302-025-01258–8. https://doi.org/10.1186/s12302-025-01258-8.

Zoroddu, M. A., Medici, S., Ledda, A. et al. (2014). Toxicity of nanoparticles. *Curr Med Chem 21*, 3837–3853. https://doi.org/10.2174/09298673216661406011623l4.

Annexe 1 – Données complémentaires « A549 and CI-hAELVi Cell Lines Coculture as a New Human Alveolar Epithelium Model for Air-Liquid Interface Exposure »

Annexe 1 – Données complémentaires « A549 and CI-hAELVi Cell Lines Coculture as a New Human Alveolar Epithelium Model for Air-Liquid Interface Exposure »

Supplementary data

A549 and CI-hAELVi Cell Lines Coculture as a New Human Alveolar Epithelium Model for Air-Liquid Interface Exposure

Aurelia Alunni[a], Ophélie Simonin[b], Guillaume Barbier[a], Maxime Floreani[a], Alexandre Albinet[a], Guillaume Garçon[c], Bénédicte Trouiller[a]**

[a]Ineris, Parc technologique Alata BP2, 60550 Verneuil en Halatte, France

[b]IMPECS, ULR 4483, Pôle Recherche, 1 Place de Verdun, 59045 Lille, France

[c]Lille Neuroscience & Cognition, INSERM UMRS-1172, Pôle Recherche, 1 Place de Verdun, 59045 Lille, France.

*Corresponding authors at: INERIS, Parc technologique Alata BP2, 60550 Verneuil en Halatte, France. Email address: aureliaalunni@gmail.com (A. Alunni), benedicte.trouiller@ineris.fr (B. Trouiller).

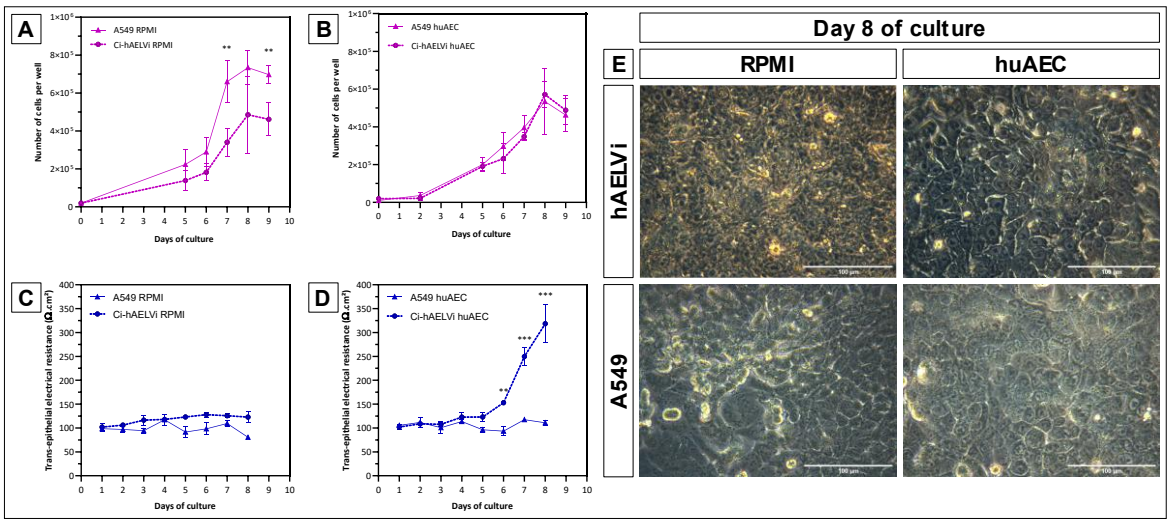


Fig. S1. A549 and Ci-hAELVi growth on RPMI and huAEC culture medium. A549 and Ci-hAELVi cell lines were seeded in monoculture at low confluence (2×104 cells/insert) with RPMI 1640 or huAEC culture medium on coated 12-well inserts. Every day, from the 5th day of culture, cells were trypsinized and then counted with Cellometer® to produce time-dependent growth curves: (A) cell growth on RPMI 1640 culture medium, (B) cell growth on huAEC medium. Every day, from the 2nd day of culture, measure of TEER was performed according to the protocol of 2.5.3.1. of the manuscript: (C) cell growth on RPMI 1640 culture medium, (D) cell growth on huAEC medium. Plain line represents A549 cell line and dotted line represents Ci-hAELVi cell line. Data shown here are mean values ± SD (n = 9) from three independent experiments (**p < 0.01, ***p < 0.001). (E) On the 8th day of culture, micrographs of monocultures were performed at ×200 magnification.

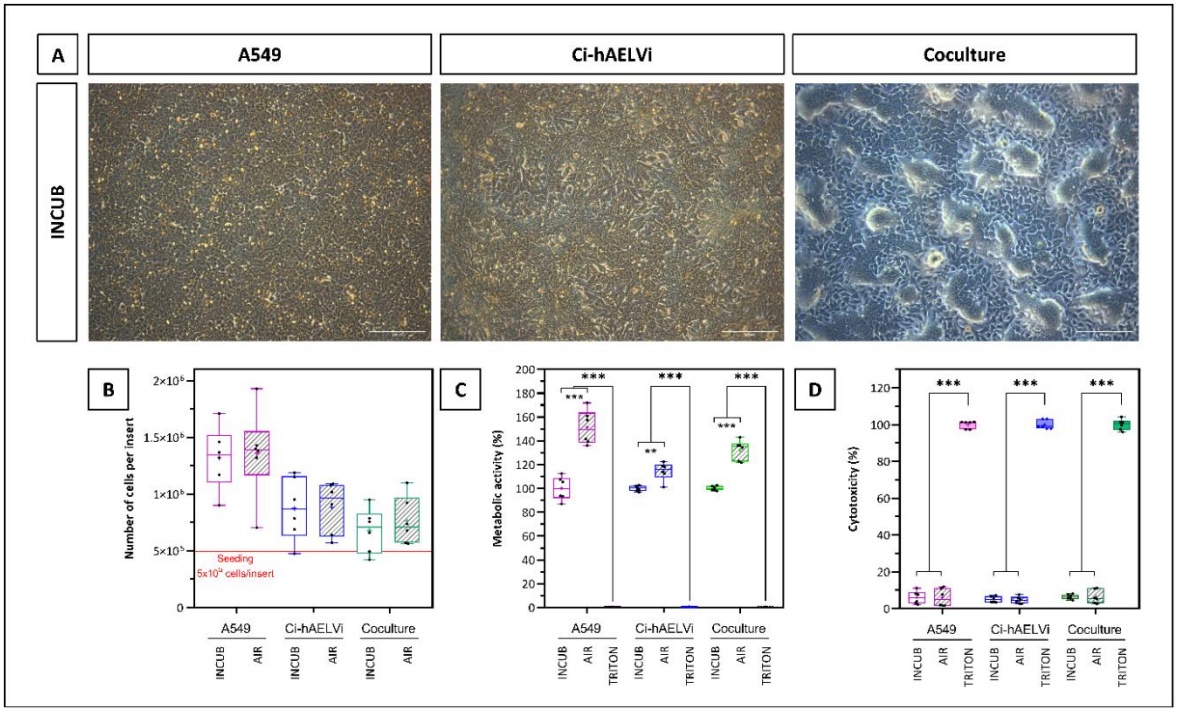


Fig. S2. Morphology, growth, metabolic activity and cytotoxicity of A549, Ci-hAELVi and cocultures after 24 h of ALI habituation and 24 h VitroCell® exposure (n = 2). (A) The appearance of A549, Ci-hAELVi and coculture at ALI after 24 h of incubator (INCUB) or air control exposure (CT AIR) was visualized using an inverse optic microscope. Pink boxplots represent A549, blue boxplots CI-hAELVi and green boxplots coculture. Cells kept at incubator (INCUB) are represented with empty boxplots, cells exposed by hatched boxplots and positive control (TRITON) by colored boxplots. (B) A549, Ci-hAELVi and coculture were trypsinized and counted using a Cellometer® after 24 h of incubator (INCUB) or air exposure (CT AIR), red line represents base number of cells seeding. (C) Cell metabolic activity was measured using the PRESTOBLUE kit. Each sample is reported as a percentage of the INCUB negative control, where 100% of cells should have an optimal viability. (D) Cell membrane alteration was assessed by LDH dosage in the apical medium via the Cytotox-One kit. Each sample is reported as a percentage of TRITON positive control where 100% of the cell membranes were perforated. (A) Images are representative of two individual experiments; (B), (C), (D): The boxes represent the 25th and 75th percentiles of the data. The horizontal lines in the boxes and cross symbols represent the median and the mean values, respectively. All the data points are shown individually (black dots), the vertical lines represent ± SD (n = 6) from two independent experiments (**p < 0.01, ***p < 0.001).

Table S1. Gene expression in RQ (Relative Quantification) following A549 and Ci-hAELVi exposed to air with VitroCell® system (A549 – AIR and Ci-hAELVi – AIR) compared to coculture exposed to air (AIR) – Model of coculture with 6 days of ALI acclimatation. SD: Standard deviation, SEM: standard error mean, CI: confidence interval. After 24 h exposure to air, RQ of monocultures (A549 and hAELVi – AIR) were compared to coculture (Coculture – AIR). ND corresponds to non-detected and was set at CT > 36, and NA corresponds to not applicable. Data results are shown as a table (n = 3) from one experiment. Chosen markers represent key AT1 markers (*AQP5; PDPN; CAV1; KRT14*) and functions in cell adhesion (*CDH1; I-CAM1; TJP1*), secretum (*SP-A; B; C;* and *D*).

Genes		Condition	RQ	SD	SEM	CI
Aquaporin 5	*AQP5*	A549 - AIR	ND	NA	NA	NA
		hAELVi - AIR	ND	NA	NA	NA
Podoplanin	*PDPN*	A549 - AIR	ND	NA	NA	NA
		hAELVi - AIR	ND	NA	NA	NA
Caveolin 1	*CAV1*	A549 - AIR	1.79	0.33	0.19	0.37
		hAELVi - AIR	1.27	0.45	0.26	0.51
Keratin 14	*KRT14*	A549 - AIR	ND	NA	NA	NA
		hAELVi - AIR	0.81	0.11	0.06	1.125
Cadherin 1	*CDH1*	A549 - AIR	0.78	0.03	0.01	0.03
		hAELVi - AIR	2.31	0.90	0.52	0.94
Intercellular adhesion molecule 1	*I-CAM1*	A549 - AIR	0.06	0.04	0.02	0.04
		hAELVi - AIR	3.49	0.83	0.48	1.01
Tigh junction protein 1	*TJP1*	A549 - AIR	0.61	0.23	0.13	0.26
		hAELVi - AIR	0.74	0.18	0.10	0.20
Mucin 2	*MUC2*	A549 - AIR	5.13	2.57	1.49	2.91
		hAELVi - AIR	ND	NA	NA	NA
Mucin 5AC	*MUC5AC*	A549 - AIR	2.93	0.73	0.42	0.82
		hAELVi - AIR	ND	NA	NA	NA
Mucin 5B	*MUC5B*	A549 - AIR	2.49	1.43	0.82	1.62

		hAELVi - AIR	ND	NA	NA	NA
Surfactant protein A1	*SP-A1*	A549 - AIR	ND	NA	NA	NA
		hAELVi - AIR	0.25	0.03	0.02	0.03
Surfactant protein B	*SP-B*	A549 - AIR	0.22	0.12	0.07	0.14
		hAELVi - AIR	NA	NA	NA	NA
Surfactant protein C	*SP-C*	A549 - AIR	1.60	0.40	0.23	1.15
		hAELVi - AIR	0.63	0.31	0.18	0.35
Surfactant protein D	*SP-D*	A549 - AIR	0.65	0.34	0.19	0.38
		hAELVi - AIR	1.06	0.78	0.46	0.90

Table S2. Gene expression in RQ (Relative Quantification) following coculture exposed to air with VitroCell® system (Coculture – AIR) compared to coculture keep at incubator (INCUB) – Model of coculture with 6 days of ALI acclimatation. SD: standard deviation, SEM: standard error mean, CI: confidence interval. After 24 h exposure to air, RQ of coculture (Coculture – AIR) were compared to RQ of coculture remain at incubator (Coculture – INCUB). ND corresponds to non-detected and was set at CT > 36, and NA corresponds to not applicable. Data results are shown as a table (n = 3) from one experiment. Chosen markers represent key AT1 markers (*AQP5; PDPN; CAV1; KRT14*) and functions in cell adhesion (*CDH1; I-CAM1; TJP1*), secretum (*SP-A; B; C; and D*).

Genes		Condition	RQ	SD	SEM	CI
Aquaporin 5	*AQP5*	Coculture - AIR	ND	NA	NA	NA
Podoplanin	*PDPN*	Coculture - AIR	ND	NA	NA	NA
Caveolin 1	*CAV1*	Coculture - AIR	0.39	0.09	0.05	0.10
Keratin 14	*KRT14*	Coculture - AIR	5.69	1.15	0.84	1.64
Cadherin 1	*CDH1*	Coculture - AIR	1.22	0.43	0.25	0.48
Intercellular adhesion molecule 1	*I-CAM1*	Coculture - AIR	1.12	0.56	0.33	0.64
Tigh junction protein 1	*TJP1*	Coculture - AIR	1.27	0.73	0.42	0.82
Mucin 2	*MUC2*	Coculture - AIR	0.06	0.02	0.02	0.03
Mucin 5AC	*MUC5AC*	Coculture - AIR	0.54	0.50	0.29	0.56
Mucin 5B	*MUC5B*	Coculture - AIR	0.40	0.37	0.21	0.41
Surfactant protein A1	*SP-A1*	Coculture - AIR	8.52	12.36	7.14	13.98
Surfactant protein B	*SP-B*	Coculture - AIR	0.20	0.18	0.10	0.21
Surfactant protein C	*SP-C*	Coculture - AIR	1.84	0.82	0.48	0.93
Surfactant protein D	*SP-D*	Coculture - AIR	0.36	0.13	0.08	0.15

		AT1-like				*Cell Adhesion*			*Mucins (MUC)*			*Surfactant Proteins (SP)*			
		AQP5	*PDPN*	*CAV1*	*KRT14*	*CDH1*	*ICAM1*	*TJP1*	*2*	*5AB*	*5B*	*A1*	*B*	*C*	*D*
Reference: Coculture – AIR															
AIR	**A549**	ND	ND	-3.0	ND	-3.2	-6.9	-3.0	-0.3	0.9	1.1	-2.4	-2.9	0.8	-2.5
	Ci-hAELVi	ND	ND	0.4	0.5	0.3	1.3	-0.3	ND	ND	ND	-1.0	ND	ND	-3.1
Reference: Coculture – INCUB															
AIR	**Co-culture**	ND	ND	1.1	4.0	0.1	1.0	0.2	-0.4	-1.9	-1.5	1.1	2.3	-0.1	0.3

Fig. S3. Gene expression in A549 and Ci-hAELVi cells, in mono- and coculture, after 24 h of ALI acclimatation and 24 h of air exposure with VitroCell® system. 1st comparison: log(2) of RQ of monocultures (A549 and hAELVi – AIR) and coculture (Coculture – AIR) were compared. 2nd comparison: Log(2) RQ of coculture exposed to air (Coculture – AIR) were compared to log(2) of RQ of coculture remained at incubator (Coculture – INCUB). Comparison was expressed in fold change represented by log(2) of RQ calculated (Tab. S3 and S4). ND corresponds to non-detected and was set at CT > 36. Data results are shown as a heat map (n = 3) from one experiment. Chosen markers represent key AT1 markers (*Aquaporin 5, AQP5; Podoplanin, PDPN; Caveolin 1, CAV1; Keratin 14, KRT14*) and functions in cell adhesion (*Cadherin 1, CDH1; Intercellular adhesion molecule1, I-CAM 1; Tigh junction protein 1, TJP 1*), secretum (*Surfactant protein, SP-A; B; C;* and *D; Mucin 2; 5AC* and *5B, MUC2; MUC5AC; MUC5B*).

Table S3. Gene expression in RQ (Relative Quantification) following A549 and Ci-hAELVi exposed to air with VitroCell® system (A549 – AIR and Ci-hAELVi – AIR) compared to coculture exposed to air (AIR) – Model of coculture with 24 h of ALI acclimatation. SD: Standard deviation, SEM: standard error mean, CI: confidence interval. After 24 h exposure to air, RQ of monocultures (A549 and hAELVi – AIR) were compared to coculture (Coculture – AIR). ND corresponds to non-detected and was set at CT > 36, and NA corresponds to not applicable. Data results are shown as a table (n = 3) from one experiment. Chosen markers represent key AT1 markers (*AQP5; PDPN; CAV1; KRT14*) and functions in cell adhesion (*CDH1; I-CAM1; TJP1*), secretum (*SP-A; B; C;* and *D, MUC2, 5AC* and *5B*).

Genes		Condition	RQ	SD	SEM	CI
Aquaporin 5	*AhR*	A549 - AIR	ND	NA	NA	NA
		hAELVi - AIR	ND	NA	NA	NA
Podoplanin	*AhRR*	A549 - AIR	ND	NA	NA	NA
		hAELVi - AIR	ND	NA	NA	NA
Caveolin 1	*CYP1A1*	A549 - AIR	0.12	0.03	0.02	0.03
		hAELVi - AIR	1.38	0.55	0.32	0.62
Keratin 14	*CYP*	A549 - AIR	ND	NA	NA	NA
		hAELVi - AIR	1,40	0.35	0.20	0.40
Cadherin 1	*CDH1*	A549 - AIR	0.11	0.02	0.01	0.02
		hAELVi - AIR	1.27	0.57	0.33	0.65
Intercellular adhesion molecule 1	*I-CAM1*	A549 - AIR	0.01	0.01	0.00	0.01
		hAELVi - AIR	2.57	0.67	0.39	0.76
Tigh junction protein 1	*TJP1*	A549 - AIR	0.13	0.01	0.01	0.01
		hAELVi - AIR	0.82	0.30	0.17	0.34
Mucin 2	*MUC2*	A549 - AIR	1.01	0.71	0.41	0.80
		hAELVi - AIR	ND	NA	NA	NA
Mucin 5AC	*MUC5AC*	A549 - AIR	1.90	0.23	0.13	0.26
		hAELVi - AIR	ND	NA	NA	NA

Mucin 5B	*MUC5B*	A549 - AIR	2.16	0.18	0.11	0.21
		hAELVi - AIR	ND	NA	NA	NA
Surfactant protein A1	*SP-A1*	A549 - AIR	0.19	0.04	0.02	0.04
		hAELVi - AIR	0.51	0.21	0.12	0.23
Surfactant protein B	*SP-B*	A549 - AIR	0.15	0.09	0.05	0.11
		hAELVi - AIR	ND	NA	NA	NA
Surfactant protein C	*SP-C*	A549 - AIR	1.82	0.75	0.43	0.85
		hAELVi - AIR	ND	NA	NA	NA
Surfactant protein D	*SP-D*	A549 - AIR	0.18	0.06	0.03	0.06
		hAELVi - AIR	0.13	0.09	0.05	0.10

Table S4. Gene expression in RQ (Relative Quantification) following coculture exposed to air and with VitroCell® system (AIR) compared to Coculture keep at incubator (INCUB) – Model of coculture with 24 h of ALI acclimatation. SD: Standard deviation, SEM: standard error mean, CI: confidence interval. After 24 h exposure to air, RQ of monocultures (A549 and hAELVi – AIR) were compared to coculture (Coculture – AIR). ND corresponds to non-detected and was set at CT > 36, and NA corresponds to not applicable. Data results are shown as a table (n = 3) from one experiment. Chosen markers represent key AT1 markers (*AQP5; PDPN; CAV1; KRT14*) and functions in cell adhesion (*CDH1; I-CAM1; TJP1*), secretum (*SP-A; B; C;* and *D, MUC2, 5AC* and *5B*).

Genes		Condition	RQ	SD	SEM	CI
Aquaporin 5	*AQP5*	Coculture - AIR	ND	NA	NA	NA
Podoplanin	*PDPN*	Coculture - AIR	ND	NA	NA	NA
Caveolin 1	*CAV1*	Coculture - AIR	2.48	1.33	0.77	1.51
Keratin 14	*KRT14*	Coculture - AIR	16.13	1.67	0.96	1.89
Cadherin 1	*CDH1*	Coculture - AIR	1.21	0.59	0.34	0.67
Intercellular adhesion molecule 1	*I-CAM1*	Coculture - AIR	2.38	1.39	0.80	1.57
Tigh junction protein 1	*TJP1*	Coculture - AIR	1.3	0.87	0.50	0.98
Mucin 2	*MUC2*	Coculture - AIR	0.78	0.20	0.11	0.22
Mucin 5AC	*MUC5AC*	Coculture - AIR	0.27	0.01	0.01	0.02
Mucin 5B	*MUC5B*	Coculture - AIR	0.35	0.05	0.03	0.06
Surfactant protein A1	*SP-A1*	Coculture - AIR	3.00	2.13	1.23	2.41
Surfactant protein B	*SP-B*	Coculture - AIR	6.22	4.47	2.58	5.06
Surfactant protein C	*SP-C*	Coculture - AIR	0.93	0.18	0.10	0.20
Surfactant protein D	*SP-D*	Coculture - AIR	1.57	1.4	0.81	1.59

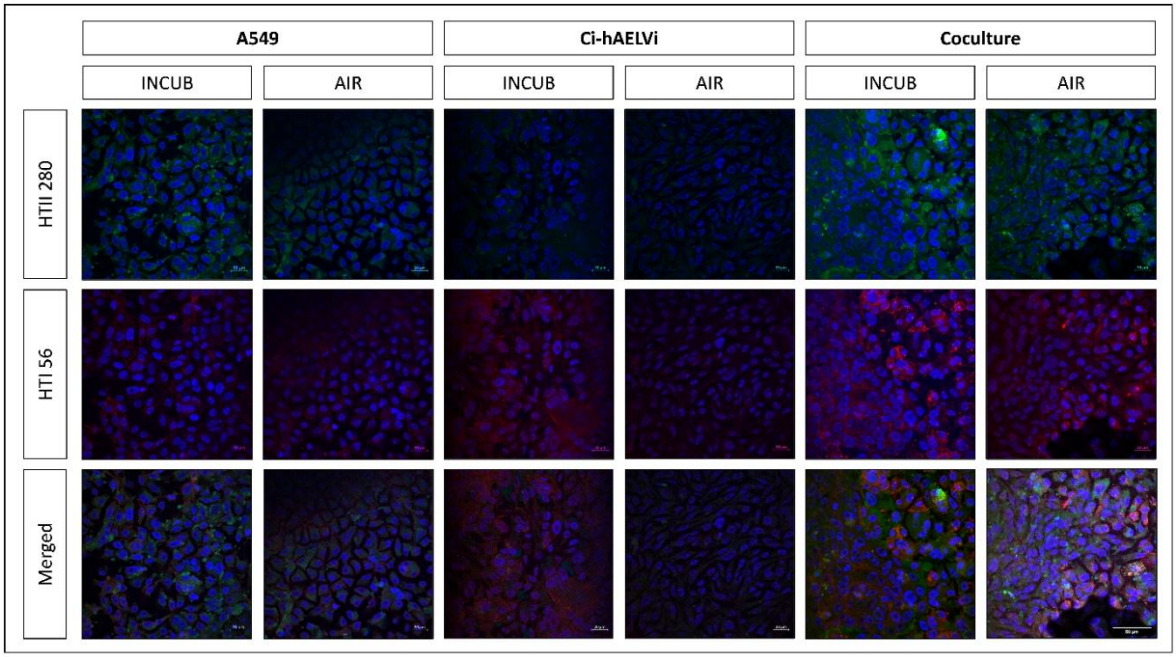


Fig. S4. Localization of HTI56 and HTII280 specific AT1 and AT2 markers on mono- and cocultures after 6 days of ALI acclimatation and 24 h of air exposure with VitroCell® system. A549, CI-hAELVi and coculture were stained by immunostaining after 24 h of air exposure (AIR) or kept at incubator (INCUB). HTI56, a marker for AT1, was stained in red, HTII280, a marker for AT2, was stained in green and the nuclei were stained in blue. Scale bar (right bottom): 50 µM. Magnitude: × 200.

		AhR pathway				*Oxidative stress*				*Cellular Cycle*
		AhR	*AhRR*	*CYP1A1*	*CYP2E2*	*KEAP1*	*NRF2*	*HMOX1*	*SOD1*	*TP53*
Reference: Coculture – AIR										
AIR	**A549**	0.9	2.1	2.3	-0.5	0.4	-0.9	-0.4	-0.3	-0.1
AIR	**Ci-hAELVi**	0.2	-0.9	-2.9	0.9	0.0	-0.5	-2.3	-1.3	-0.8
Reference: Coculture – INCUB										
AIR	**Coculture**	0.0	-0.5	3.6	0.3	-0.1	0.9	1.6	0.7	0.5
Reference: A549 – INCUB										
AIR	**A549**	0.0	0.8	5.1	0.3	-0.2	0.0	0.7	0.6	-0.1
Reference: Ci-hAELVi – INCUB										
AIR	**Ci-hAELVi**	-0.3	1.2	0.7	0.2	-0.1	0.3	1.4	-0.4	-1.1

Fig. S6. Influence of air flow exposure on the expression of some specific genes of the AhR and oxidative stress signaling pathways and cell cycle control, in A549 and Ci-hAELVi cells, in mono- and cocultures, after 24 h of air exposure with Cultex® system by comparison of mRNA expression with RTqPCR – Model of coculture with 6 days of ALI acclimatation. 1st comparison: after 24 h exposure to air, log(2) RQ of monocultures (A549 and hAELVi – AIR) and coculture (Coculture – AIR) were compared. 2nd comparison: after 24 h exposure to air, RQ of coculture (Coculture – AIR) were compared to RQ of coculture remain at incubator (Coculture – INCUB). 3rd comparison: after 24 h exposure to air, RQ of A549 (A549 – AIR) were compared to RQ of A549 remain at incubator (A549 – INCUB). 4th comparison: after 24 h exposure to air, RQ of CI-hAELVi (hAELVi – AIR) were compared to RQ of CI-hAELVi remained at incubator (hAELVi – INCUB). Comparison was express in fold change represented by log(2) of RQ calculated (Tab. S5 and S6). ND corresponds to non-detected and was set at CT > 36. Data results are shown as a heat map (n = 3) from one experiment. Chosen markers represent AhR pathway (*Aryl hydrocarbon Receptor, AhR; Aryl hydrocarbon receptor Repressor, AhRR; Cytochrome P450 family 1 subfamily A member 1, CYP1A1; Cytochrome P450 family 2 subfamily E member 1, CYP2E1*), oxidative stress pathway (*Heme Oxygenase 1, HMOX1; Superoxide Dismutase 1, SOD1; Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (NFE2F2), NRF2; Kelch like ECH associated protein 1, KEAP1*) and cellular cycle markers (*Tumor protein p53, TP53*).

		AhR pathway				*Oxidative stress*				*Cellular Cycle*
		AhR	*AhRR*	*CYP1A1*	*CYP2E2*	*KEAP1*	*NRF2*	*HMOX1*	*SOD1*	*TP53*
Reference: Coculture – AIR										
AIR	**A549**	0.3	0.8	0.9	-0.6	0.3	0.4	0.4	0.5	0.3
AIR	**Ci-hAELVi**	-0.2	-2.2	-0.6	0.6	-0.2	0.0	-0.5	0.0	-0.3
Reference: Coculture – INCUB										
AIR	**Coculture**	-0.4	-1.1	1.7	-0.6	0.6	-0.2	0.3	0.6	-0.9
Reference: A549 – INCUB										
AIR	**A549**	-0.6	-1.5	4.6	-1.6	0.8	0.0	-0.1	1.1	-1.1
Reference: Ci-hAELVi – INCUB										
AIR	**Ci-hAELVi**	-0.3	-0.7	2.1	-0.1	-0.3	-0.2	1.8	0.5	-0.9

Fig. S7. Influence of air flow exposure on the expression of some specific genes of the AhR and oxidative stress signaling pathways and cell cycle control, in A549 and Ci-hAELVi cells, in mono- and cocultures, after 24 h of exposure with Cultex® system by comparison of mRNA expression with RTqPCR – Model of coculture with 24 h of ALI acclimatation. 1st comparison: after 24 h exposure to air, log(2) RQ of monocultures (A549 and hAELVi – AIR) and coculture (Coculture – AIR) were compared. 2nd comparison: after 24 h exposure to air, RQ of coculture (Coculture – AIR) were compared to RQ of coculture remain at incubator (Coculture – INCUB). 3rd comparison: after 24 h exposure to air, RQ of A549 (A549 – AIR) were compared to RQ of A549 remain at incubator (A549 – INCUB). 4th comparison: after 24 h exposure to air, RQ of CI-hAELVi (hAELVi – AIR) were compared to RQ of CI-hAELVi remained at incubator (hAELVi – INCUB). Comparison was express in fold change represented by log(2) of RQ calculated (Tab. S7 and S8). ND corresponds to non-detected and was set at CT > 36. Data results are shown as a heat map (n = 3) from one experiment. Chosen markers represent AhR pathway (*Aryl hydrocarbon Receptor, AhR; Aryl hydrocarbon receptor Repressor, AhRR; Cytochrome P450 family 1 subfamily A member 1, CYP1A1; Cytochrome P450 family 2 subfamily E member 1, CYP2E1*), oxidative stress pathway (*Heme Oxygenase 1, HMOX1; Superoxide Dismutase 1, SOD1; Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (NFE2F2), NRF2; Kelch like ECH associated protein 1, KEAP1*) and cellular cycle markers (*Tumor protein p53, TP53*).

Table S5. Gene expression in RQ (Relative Quantification) following A549 and Ci-hAELVi exposed to air with Cultex® system (A549 – AIR, hAELVi – AIR) compared to coculture exposed to air (Coculture – AIR) – Model of coculture with 6 days of ALI acclimatation. SD: Standard deviation, SEM: standard error mean, CI: confidence interval. After 24 h exposure to air, RQ of monocultures (A549 and hAELVi – AIR) were compared to coculture (Coculture – AIR). ND corresponds to non-detected and was set at CT > 36, and NA corresponds to not applicable. Data results are shown as a table (n = 3) from one experiment. Chosen markers represent the AhR pathway (*AhR; AhRR, CYP1A1, CYP2E1*), oxidative stress pathway (*KEAP1; NRF2; HMOX1; SOD1*) and cellular cycle (*TP53*).

Genes		Condition	RQ	SD	SEM	CI
Aryl hydrocarbon receptor	*AhR*	A549 - AIR	1.83	0.37	0.21	0.41
		hAELVi - AIR	1.15	0.04	0.02	0.05
Aryl hydrocarbon receptor repressor	*AhRR*	A549 - AIR	4.46	1.02	0.59	1.16
		hAELVi - AIR	0.53	0.10	0.6	0.11
Cytochrome P450 family 1 subfamily A member 1	*CYP1A1*	A549 - AIR	5.23	1.40	0.81	1.58
		hAELVi - AIR	0.14	0.05	0.03	0.06
Cytochrome P450 family 2 subfamily E member 1	*CYP2E1*	A549 - AIR	0.72	0.18	0.10	0.20
		hAELVi - AIR	1.98	0.85	0.49	0.96
Kelch-like ECH-associated protein 1	*KEAP1*	A549 - AIR	1.33	0.26	0.15	0.30
		hAELVi - AIR	1.07	0.42	0.24	0.47
Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2	*NRF2*	A549 - AIR	0.56	0.07	0.04	0.08
		hAELVi - AIR	0.74	0.15	0.09	0.17
Heme oxygenase 1	*HMOX1*	A549 - AIR	0.76	0.04	0.02	0.04
		hAELVi - AIR	0.23	0.13	0.07	0.15
Superoxide dismutase 1	*SOD1*	A549 - AIR	0.82	0.12	0.07	0.14
		hAELVi - AIR	0.43	0.13	0.07	0.14
Tumor protein p53	*TP53*	A549 - AIR	0.96	0.13	0.07	0.14
		hAELVi - AIR	0.62	0.23	0.13	0.26

Table S6. Gene expression in RQ (Relative Quantification) following A549, Ci-hAELVi mono- and cocultures exposed to air with Cultex® system (A549 – AIR, hAELVi – AIR, Coculture – AIR) compared to A549, Ci-hAELVi and coculture remained at the incubator (INCUB) respectively – Model of coculture with 6 days of ALI acclimatation. SD: standard deviation, SEM: standard error mean, CI: confidence interval. After 24 h exposure to air, RQ of coculture (Coculture – AIR) were compared to RQ of coculture remain at incubator (Coculture – INCUB) (1st line), RQ of A549 (A549 – AIR) were compared to RQ of A549 remain at incubator (A549 – INCUB) (2nd line), RQ of CI-hAELVi (hAELVi – AIR) were compared to RQ of CI-hAELVi remain at incubator (hAELVi – INCUB) (3rd line). Comparison was express in RQ ($2^{-\Delta\Delta CT}$). ND corresponds to non-detected and was set at CT > 36, and NA corresponds to not applicable. Data results are shown as a table (n = 3) from one experiment. Chosen markers represent the AhR pathway (*AhR; AhRR; CYP1A1; CYP2E1*), oxidative stress pathway (*KEAP1; NRF2; HMOX1; SOD1*) and cellular cycle (*TP53*).

Genes		Condition	RQ	SD	SEM	CI
Aryl hydrocarbon receptor	*AhR*	Coculture - AIR	1.23	0.99	0.57	1.12
		A549 - AIR	1.03	0.21	0.12	0.23
		hAELVi - AIR	0.81	0.03	0.02	0.03
Aryl hydrocarbon receptor repressor	*AhRR*	Coculture - AIR	0.84	0.53	0.31	0.60
		A549 - AIR	1.74	0.40	0.23	0.45
		hAELVi - AIR	2.37	0.44	0.25	0.50
Cytochrome P450 family 1 subfamily A member 1	*CYP1A1*	Coculture - AIR	19.54	19.54	11.38	22.31
		A549 - AIR	36.35	9.69	5.59	10.96
		hAELVi - AIR	1.64	0.62	0.36	0.70
Cytochrome P450 family 2 subfamily E member 1	*CYP2E1*	Coculture - AIR	1.69	1.71	0.99	1.94
		A549 - AIR	1.22	0.31	0.18	0.35
		hAELVi - AIR	1.20	0.51	0.30	0.58
Kelch-like ECH-associated protein 1	*KEAP1*	Coculture - AIR	0.96	0.25	0.14	0.28
		A549 - AIR	0.91	0.18	0.10	0.20
		hAELVi - AIR	0.96	0.38	0.22	0.43

		Coculture - AIR	2.46	2.36	1.36	2.67
Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2	*NRF2*	A549 - AIR	1.00	0.12	0.07	0.13
		hAELVi - AIR	1.21	0.25	0.14	0.28
		Coculture - AIR	4.06	3.86	2.23	4.36
Heme oxygenase 1	*HMOX1*	A549 - AIR	1.60	0.07	0.04	0.08
		hAELVi - AIR	2.83	1.56	0.90	1.77
		Coculture - AIR	2.17	1.97	1.14	2.23
Superoxide dismutase 1	*SOD1*	A549 - AIR	1.55	0.23	0.13	0.26
		hAELVi - AIR	0.76	0.23	0.13	0.26
		Coculture - AIR	1.85	1.65	0.95	1.87
Tumor protein p53	*TP53*	A549 - AIR	0.92	0.12	0.07	0.14
		hAELVi - AIR	0.49	0.18	0.10	0.20

Table S7. Gene expression in RQ (Relative Quantification) following A549 and Ci-hAELVi monocultures exposed to air with Cultex® system (A549 – AIR, hAELVi – AIR) compared to coculture exposed to air (AIR) – Model of coculture with 24 h of ALI acclimatation. SD: standard deviation, SEM: standard error mean, CI: confidence interval. After 24 h exposure to air, RQ of monocultures (A549 – AIR, hAELVi – AIR) were compared to coculture (Coculture – AIR). ND corresponds to non-detected and was set at CT > 36, and NA corresponds to not applicable. Data results are shown as a table (n = 3) from one experiment. Chosen markers represent the AhR pathway (*AhR; AhRR; CYP1A1; CYP2E1*), oxidative stress (*KEAP1; NRF2*; *HMOX1; SOD1*) and cellular cycle (*TP53*).

Genes		Condition	RQ	SD	SEM	CI
Aryl hydrocarbon receptor	*AhR*	A549 - AIR	1.27	0.20	0.12	0.23
		hAELVi - AIR	0.89	0.05	0.03	0.06
Aryl hydrocarbon receptor repressor	*AhRR*	A549 - AIR	1.77	0.19	0.11	0.21
		hAELVi - AIR	0.22	0.03	0.02	0.04
Cytochrome P450 family 1 subfamily A member 1	*CYP1A1*	A549 - AIR	1.90	0.54	0.31	0.61
		hAELVi - AIR	0.66	0.19	0.11	0.21
Cytochrome P450 family 2 subfamily E member 1	*CYP2E1*	A549 - AIR	0.68	0.18	0.11	0.21
		hAELVi - AIR	0.48	0.21	0.12	0.24
Kelch-like ECH-associated protein 1	*KEAP1*	A549 - AIR	1.24	0.13	0.8	0.15
		hAELVi - AIR	0.84	0.04	0.2	0.04
Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2	*NRF2*	A549 - AIR	1.29	0.14	0.08	0.16
		hAELVi - AIR	0.97	0.02	0.01	0.02
Heme oxygenase 1	*HMOX1*	A549 - AIR	1.32	0.23	0.14	0.26
		hAELVi - AIR	0.73	0.18	0.10	0.20
Superoxide dismutase 1	*SOD1*	A549 - AIR	1.18	0.34	0.19	0.38
		hAELVi - AIR	1.02	0.04	0.02	0.05
Tumor protein p53	*TP53*	A549 - AIR	1.25	0.30	0.17	0.34
		hAELVi - AIR	0.84	0.05	0.03	0.06

Table S8. Gene expression in RQ (Relative Quantification) following A549 and CI-hAELVi monocultures exposed to air with Cultex® system (A549 – AIR, hAELVi – AIR) exposure compared to coculture exposed to air (Coculture – AIR) – Model of coculture with 24 h of ALI acclimatation. SD: standard deviation, SEM: standard error mean, CI: confidence interval. After 24 h exposure to air, RQ of coculture (Coculture – AIR) were compared to RQ of coculture remain at incubator (Coculture – INCUB) (1st line), RQ of A549 (A549 – AIR) were compared to RQ of A549 remain at incubator (A549 – INCUB) (2nd line), RQ of CI-hAELVi (hAELVi – AIR) were compared to RQ of CI-hAELVi remain at incubator (hAELVi – INCUB) (3rd line). Comparison was express in RQ ($2^{-\Delta\Delta CT}$). ND corresponds to non-detected and was set at CT > 36, and NA corresponds to not applicable. Data results are shown as a table (n = 3) from one experiment. Chosen markers represent the AhR pathway (*AhR; AhRR; CYP1A1; CYP2E1*), oxidative stress (*KEAP1; NRF2; HMOX1; SOD1*) and cellular cycle (*TP53*).

Genes		Condition	RQ	SD	SEM	CI
Aryl hydrocarbon receptor	*AhR*	Coculture - AIR	0.76	0.05	0.03	0.06
		A549 - AIR	0.66	0.11	0.06	0.12
		hAELVi - AIR	0.84	0.05	0.03	0.06
Aryl hydrocarbon receptor repressor	*AhRR*	Coculture - AIR	0.47	0.08	0.04	0.09
		A549 - AIR	0.37	0.04	0.02	0.04
		hAELVi - AIR	0.63	0.10	0.06	0.11
Cytochrome P450 family 1 subfamily A member 1	*CYP1A1*	Coculture - AIR	3.22	0.33	0.19	0.38
		A549 - AIR	24.16	6.86	3.96	7.76
		hAELVi - AIR	4.32	1.23	0.71	1.39
Cytochrome P450 family 2 subfamily E member 1	*CYP2E1*	Coculture - AIR	0.71	0.24	0.14	0.27
		A549 - AIR	0.35	0.09	0.05	0.11
		hAELVi - AIR	0.96	0.14	0.08	0.15
Kelch-like ECH-associated protein 1	*KEAP1*	Coculture - AIR	1.50	0.18	0.10	0.2
			1.77	0.19	0.11	0.22

		A549 - AIR	0.82	0.04	0.02	0.04
		hAELVi - AIR				
Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2	*NRF2*	Coculture - AIR	0.89	0.01	0.00	0.01
		A549 - AIR	1.01	0.11	0.06	0.13
		hAELVi - AIR	0.88	0.02	0.01	0.02
Heme oxygenase 1	*HMOX1*	Coculture - AIR	1.20	0.08	0.04	0.08
		A549 - AIR	0.97	0.17	0.10	0.19
		hAELVi - AIR	3.50	0.85	0.49	0.96
Superoxide dismutase 1	*SOD1*	Coculture - AIR	4.56	0.03	0.02	0.03
		A549 - AIR	2.18	0.50	0.29	0.56
		hAELVi - AIR	1.42	0.06	0.03	0.07
Tumor protein p53	*TP53*	Coculture - AIR	0.53	0.03	0.02	0.04
		A549 - AIR	0.59	0.12	0.07	0.13
		hAELVi - AIR	0.53	0.03	0.02	0.04

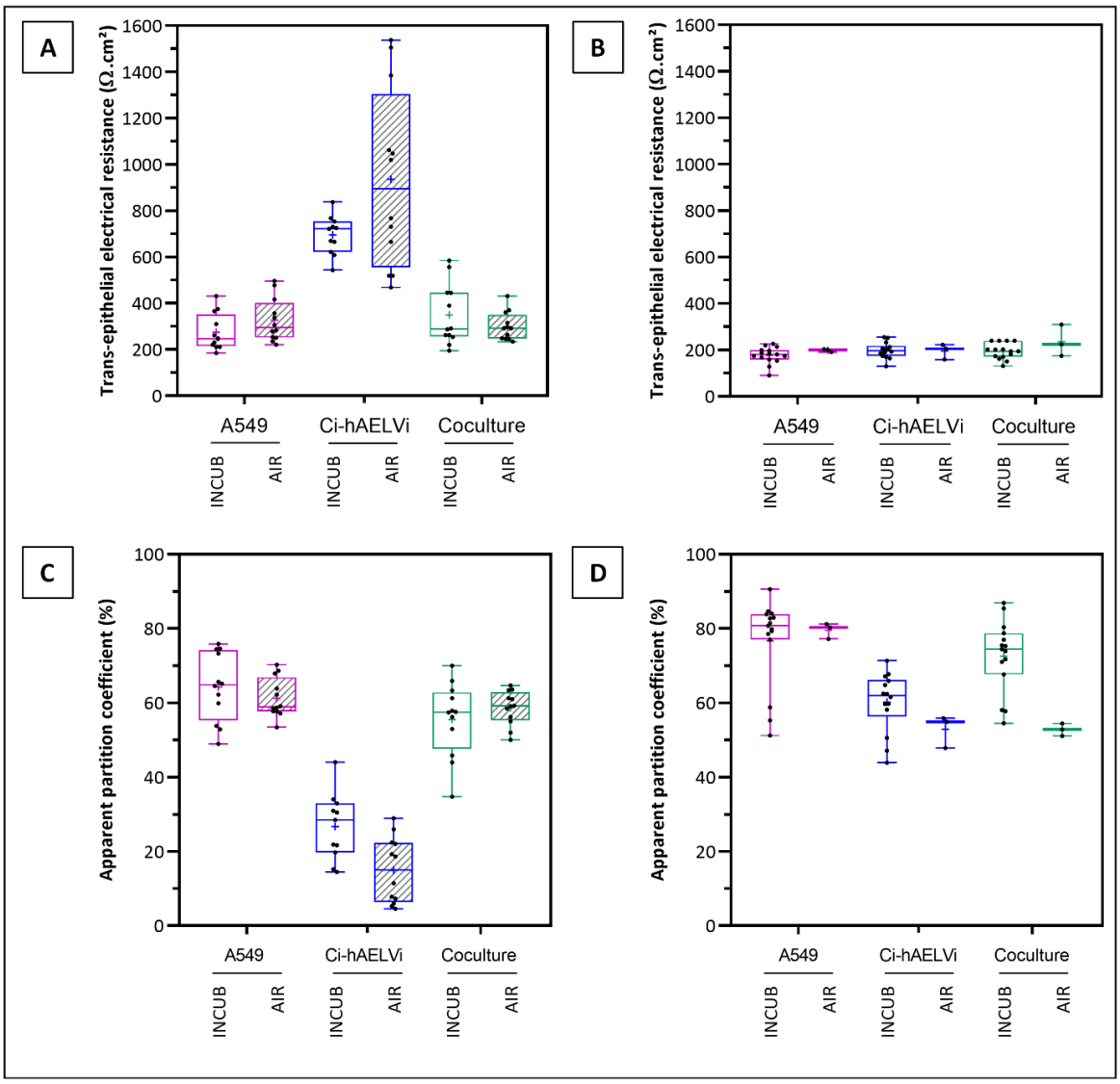
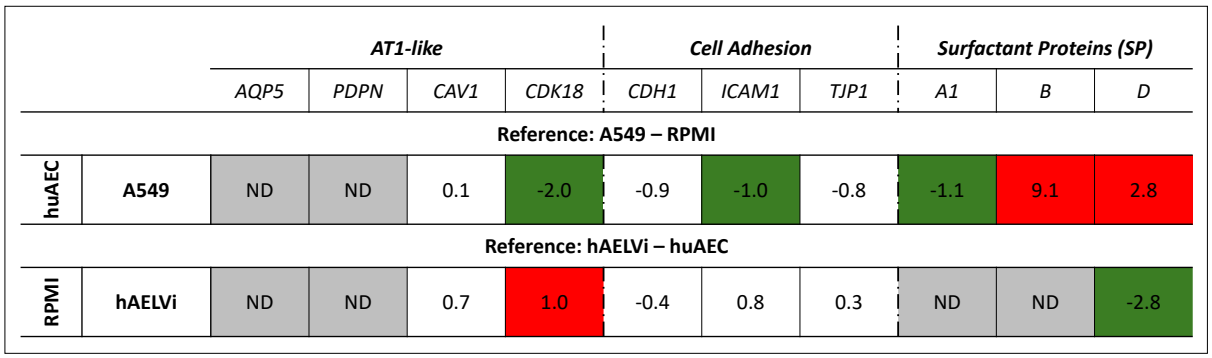


Fig. S8. Barrier formation capacity of mono- and cocultures after 6 days or 24 h of ALI acclimatation and 24 h of air exposure with VitroCell® system. A549, Ci-hAELVi in mono- and coculture were kept in the incubator (INCUB – empty boxplots) or exposed to air (AIR – hatched boxplots) for 24 h. Capacity of cells to form a barrier was assessed. (A) 6 days acclimation model, trans-epithelial resistance (TEER) of mono- and coculture was assessed using an ohmmeter. (B) 24 h acclimation model, Apparent partition coefficient represents membrane permeability of cell layer and was measured using Lucifer Yellow. (C) 6 days acclimation model, TEER of cells was assessed using a voltohmmeter. (D) 24 h acclimation model, apparent partition coefficient represents membrane permeability of cell layer and was measured using Lucifer Yellow molecule. (A), (C) The boxes represent the 25th and 75th percentiles of the data. The horizontal lines in the boxes and cross symbols represent the median and the mean values, respectively. All the data points are shown individually (black

dots), the vertical lines represent SD (n = 9) from three independent experiments; (B), (D) (n = 15) from five independent experiments for – INCUB condition and (n = 3) from one independent experiment for – AIR condition.



		AT1-like				*Cell Adhesion*			*Surfactant Proteins (SP)*		
		AQP5	*PDPN*	*CAV1*	*CDK18*	*CDH1*	*ICAM1*	*TJP1*	*A1*	*B*	*D*
Reference: A549 – RPMI											
huAEC	**A549**	ND	ND	0.1	-2.0	-0.9	-1.0	-0.8	-1.1	9.1	2.8
Reference: hAELVi – huAEC											
RPMI	**hAELVi**	ND	ND	0.7	1.0	-0.4	0.8	0.3	ND	ND	-2.8

Fig S9. Gene expression in RQ (Relative Quantification) following A549 in huAEC media and Ci-hAELVi in RPMI 1640 media compared to A549 in RPMI media and CI-hAELVi in huAEC media in ALI – Model of coculture with 24 h of ALI acclimatation. 1st comparison: log(2) RQ of A549 in huAEC media (A549 – huAEC) were compared to A549 in RPMI medium. 2nd comparison: log(2) RQ of CI-hAELVi in RPMI media (hAELVi – RPMI) were compared to CI-hAELVi in huAEC medium. Comparison was expressed in fold change represented by log(2) of RQ (Tab. S9) calculated. ND corresponds to non-detected and was set at CT > 36, and NA corresponds to not applicable. Data results are shown as a heat map (n = 3) from one experiment. Chosen markers represent key AT1 markers (*Aquaporin-5, AQP5; Podoplanin, PDPN; Caveolin-1, CAV1*) and function in cell adhesion (*Cadherin 1, CDH1; Intercellular adhesion molecule 1, I-CAM1; Tigh junction protein 1, TJP1*), secretum (*Surfactant protein, SP-A; B; D*).

Table S9. Gene expression in RQ (Relative Quantification) following A549 in huAEC media and CI-hAELVi in RPMI 1640 media compared to A549 in RPMI media and CI-hAELVi in huAEC media in ALI – with 24 h of ALI acclimatation. SD: standard deviation, SEM: standard error mean, CI: confidence interval. RQ of A549 in huAEC media (A549 – huAEC) were compared to A549 in RPMI medium (1st line). RQ of CI-hAELVi in RPMI media (hAELVi – RPMI) were compared to CI-hAELVi in huAEC medium (2nd line). ND corresponds to non-detected and was set at CT > 36, and NA corresponds to not applicable. Data results are shown as a table (n = 3) from one experiment. Chosen markers represent key AT1 markers (*AQP5; PDPN; CAV1*) and functions in cell adhesion (*CDH1; I-CAM1; TJP1*), secretum (*SP-A; B;* and *D*).

Genes		Condition	RQ	SD	SEM	CI
Aquaporin 5	*AQP5*	A549 - huAEC	ND	NA	NA	NA
		hAELVi - RPMI	ND	NA	NA	NA
Podoplanin	*PDPN*	A549 - huAEC	ND	NA	NA	NA
		hAELVi - RPMI	ND	NA	NA	NA
Caveolin 1	*CAV1*	A549 - huAEC	1.10	0.29	0.17	0.33
		hAELVi - RPMI	1.58	0.06	0.03	0.07
Cadherin 1	*CDH1*	A549 - huAEC	0.56	0.11	0.06	0.12
		hAELVi - RPMI	0.77	0.17	0.10	0.20
Intercellular adhesion molecule 1	*I-CAM1*	A549 - huAEC	0.50	0.11	0.06	0.12
		hAELVi - RPMI	1.70	0.13	0.08	0.15
Tigh junction protein 1	*TJP1*	A549 - huAEC	0.61	0.24	0.14	027
		hAELVi - RPMI	1.31	0.46	0.27	0.53
Surfactant protein A1	*SP-A1*	A549 - huAEC	0.50	0.223	0.13	0.26
		hAELVi - RPMI	ND	NA	NA	NA
Surfactant protein B	*SP-B*	A549 - huAEC	550,32	68.42	39.50	77.43
		hAELVi - RPMI	ND	NA	NA	NA
Surfactant protein D	*SP-D*	A549 - huAEC	6.95	1.95	1.13	2.21
		hAELVi - RPMI	2.09	0.73	0.42	0.82

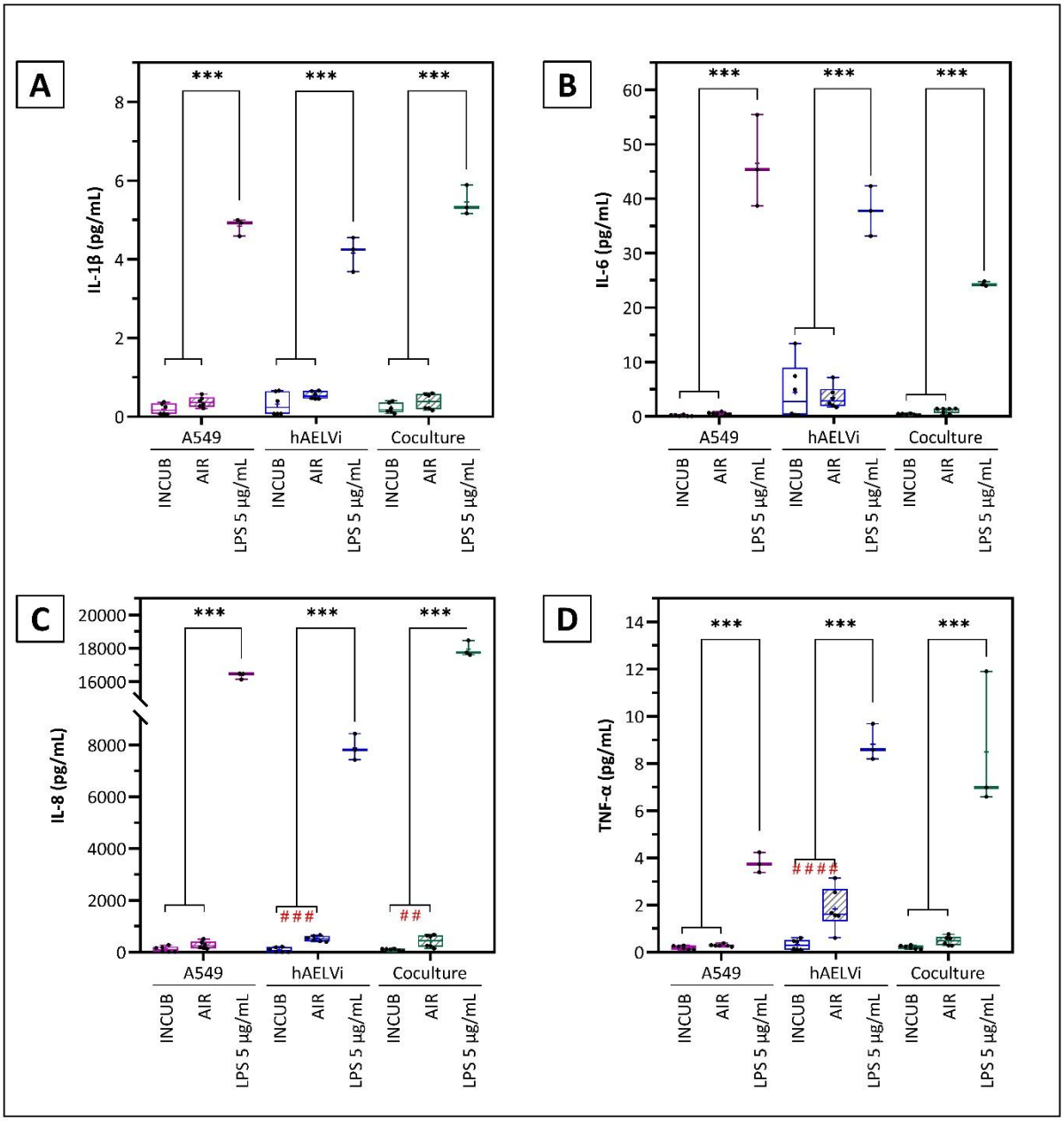


Fig. S10. (Pro)-inflammatory response of mono- and cocultures exposed to air flow with VitroCell® system for 24 h - Model of coculture with 6 days of ALI acclimatation. (Pro)-inflammatory cytokine levels of A549 (pink boxplots), Ci-hAELVi (blue boxplots) and coculture (green boxplots) after 24 h in incubator (INCUB – empty boxplots) or air exposure (AIR – hatched boxplot) were measured using MSD. (A) Interleukin 1β (IL-1β), (B) Interleukin 6 (IL-6), (C) Interleukin 8 (IL-8), (D) Tumor necrosis factor α (TNF-α). LPS condition (colored boxplot) corresponds to the positive inflammation control. The boxes represent the 25th and 75th percentiles of the data. The horizontal lines in the boxes and cross symbols represent the median and the mean values, respectively. All the data points are shown

individually (black dots), the vertical lines represent ± SD (n = 6) from two independent experiments. Two statistical tests have been performed, one including LPS positive control (*p <0.05, ***p < 0.001) and one excluding LPS positive control (##p < 0.01, ###p < 0.001, ####p < 0.0001).

Annexe 2 – Tableau non exhaustif des études d'exposition dynamique ALI

Annexe 2 – Tableau non exhaustif des études d'exposition dynamique ALI

Les tableaux présentes une revue non systématiques des études d'exposition dynamique de l'année 2018 à 2026. Le code couleur représente les différentes classes de tests toxicologiques, du plus conventionnel aux omiques :

- Gris : Tests conventionnels de toxicité, viabilité et activité métaboliques.
- Bleu : Dosage des cytokines sécrétées.
- Jaune : Tests conventionnels de génotoxicité.
- Vert : Transcriptomique par RTqPCR.
- Rouge pâle : Omiques.
- Rouge foncé : Données non reportées.

First author	Publication year	Exposure system	Cell model	ALI acclimatization	Confluence	Airflow	Aerosol conditioning	Particle deposition enhancement	Exposure duration	Tested contaminant
Alunni	**2026**	CULTEX	A549/hAELVi	24 h and 6 days	100 % - monolayer	10 mL/min	5 % CO_2	None	8 h + 24 h + 72 h	Clean air
Guo	**2026**	CULTEX RFS	SmallAir™	NA	NA	5 mL/min	5 % CO_2, 75 % RH, 21-22 °C	Electrostatic	5 min + 24 hpe	CeO_2
Juárez-Facio	**2026**	ELLIE	A549	Just before exposure	NA	NA	37 °C, 90 % RH	Electrostatic	2 h + 24 hpe	Brake wear
Pei	**2026**	HRH-CES1332	BEAS-2B	NA	NA	10 mL/min	None	Thermophoresis	1 h	Gasoline engine exhaust
Tsyupa	**2026**	ELLIE	A549	NA	170000 cells/6-weel insert	214 mL/min	37°C, RH > 90 %	Electrostatic	2 h + 24 hpe	Brake wear
Zhang	**2026**	CULTEX	BEAS-2B	24 h	NA	5 mL/min	None	None	3 h	*P. aeruginosa* bioaerosol

First author	Publication year	Endpoints	Controls		Comments	doi
			Air	Incubator		
Alunni	**2026**	IL-1β, IL-6, IL-8 and TNFα, AlamarBlue, LDH, counting, genes expression (*SP-, AT1 markers, cell adhesion, mucins, AhR pathway, KEAP1, NRF2, HMOX1, SOD1*), SP-B, D secretion	HEPA filter + Charcoal	Yes	Impact of airflow with increse of HMOX1 and CYP1A1 expression and secretory cytokines. Inflammatory, oxidative stress and AhR pathway ativation.	https://doi.org/10.1016/j.tiv.2026.106200
Guo	**2026**	LDH, gene expression *MUC5AC, LCN2, HMOX1, CXCL1, IL-8, TGFB3, FN1, SLC7A11, TXNRD1*	H_2O nebulization	Yes	(1) "it was previously found that cytotoxicity and gene expression increased with increasing exposure duration but limited biological effects were observed for system control exposures of less than 10 min [Buckley 2024]. All exposures were therefore limited to 5 min and different doses were achieved via aerosol dilution." (2) incubator control IS THE CONTROL for exposures conditions. -> system control, dried H_2O aerosol exposure	https://doi.org/10.1186/s12989-026-00658-9
Juárez-Facio	**2026**	Alamar Blue, IL-1β, IL-6, IL-8 and TNF-α	Filtered aerosol	**NR**	No incubator control	https://doi.org/10.1016/j.aeaoa.2026.100426
Pei	**2026**	CCK-8 dosage (viability), comet assay, γ-H2AX	Clean air	**NR**	No significative air flow impact	https://doi.org/10.1002/jat.4891
Tsyupa	**2026**	IL-1β, IL-6, and TNF-α, AlamarBlue	Particle-filtered air	Negative control (not define) + submerged exposure	No incubator control	https://doi.org/10.1016/j.etap.2025.104915
Zhang	**2026**	Mucines genes and proteins expression, apoptose, CCK-8 (viability), LDH,barriere permeability	Clean air filtered	**NR**	(1) No incubator control, (2) Results of clean air not always show	https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2026.119672

First author	Publication year	Exposure system	Cell model	ALI acclimatization	Confluence	Airflow	Aerosol conditioning	Particle deposition enhancement	Exposure duration	Tested contaminant
Ashrin	2025	Vitrocell	A549/THP-1 and hAELVi-THP-1	≈ 12 h	NA	5 mL/min	None	None	1 h	Smokes combustion pyrotechnic
Bredeck	2025	AES, Vitrocell	MucilAir + (primary cells) Macrophages	NA	NA	5 mL/min	85 % RH	None	6 h	Traffic-derived air pollution
Campbell	2025	NACIVT	HBE (primary cells)	4 week	Confluent	25 mL/min	85 % RH, 37 °C, 5 % CO2	Electrostatic	1h + 23 hpe	1R6F
Delaval	2025	AES, Vitrocell	A549, BEAS-2B	24 h (A549), 3 days (BEAS-2B)	sub-confluent	100 mL/min	37 °C, 85 % RH	none	4 h	Gasoline EURO 6d aerosol (gas or aerosol, fressh or aged)
Di Iulio	2025	CULTEX	BEAS-2B	NA	NA	NA	None	None	24 h	Ambient air
Dodero	2025	CellTox sampler	16HBE14-0	24 h	100%	not applicable	None	Electrostatic	3 h + 6 or 48 hpe	Unaged and aged microplastics
Duistermaat	2025	VITROCELL® Modular Exposure System	Calu-3	7 days	Confluent	5 ml/min			2 h repeat 3 days	Piperazine, TDI
Henriquez	2025	CelTox sampler	A549	NA	NA	NA	37 °C + 80 - 90 % RH	Electrostatic	60 min + 0 or 24 hpe	PM, O_3, PM + O_3
Introna	2025	ELLIE	A549	NA	NA	214 mL/min	90 % RH	Alternated electrostatic field	2 h	Road tunnel $PM_{2.5}$
Jaber	2025	Vitrocell module series (6/3)	BEAS-2B	Just before exposure	NA	NA	None	None	1 h	Ethylbenzene and m-xylene
Juárez-Facio	2025	ELLIE	A549	Just before exposure	NA	100 or 214 mL/min	37 °C, 85–90% RH	Electrostatic	2-8h + 24 hpe	Clean air
Lu	2025	CULTEX	Calu-3	6 days	Confluent	5 mL/min	None	None	1 h + 24 hpe	O_3 and DEP (diesel emission particles)
Okuda	2025	Home-made	Calu-3/U937	23 h	NA	NA	None	None	1 h + 23 hpe	Nanoplastics
Paengnakorn	2025	Home-made	A549 and BEAS-2B	Just before exposure	NA	NA	None	None	2 h	$PM_{2.5}$
Shankar	2025	DAVID	A549	7 days	Confluent	NA	NA	NA	5-15 min + 24 hpe	CuO
Tanios	2025	Vitrocell module series (6/3)	BEAS-2B	Just before exposure	NA	NA	NA	None	1 h + 5 hpe	Biogas
Tsakonas	2025	ELLIE	A549	NA	NA	214 mL/min	37 °C, 90 % RH	Electrostatic	2 h + 24 hpe	Diesel exhaust (Euro 6)
Vojtisek-Lom	2025	Portable emissions monitoring systems (PEMS)	MucilAir(3 differents types) + hOM (human olfactory mucosa cells),	NA	NA	NA	85 % RH, 37 °C, 5 % CO_2	None	2 h	Silver nanoparticles, Gasoline engine exhaust, metallic particles generated by spark ablation
Weiss	2025	NAVETTA	A549 IL8-LUC	72 h	NA	200 mL/min	37°C, 98 % RH	Electrostatic	5-25 min + 19 to 24 hpe	TiO_2
Zimmermann	2025	AES, Vitrocell	Calu-3	7 days	Confluent	50 mL/min	37 °C + 86,5 % RH	None	72 h	Ambient air
Zimmermann-Klemd	2025	high-throughput exposure system (HTES), Vitrocell	A549	24 h	Confluent	1,2 mL/min	37 °C, 90 ± 2 % RH	None	38 min and 1 h 24 min	Cigarette smoke (1R6F) + heated tabacco (IQOS)

First author	Publication year	Endpoints	Controls		Comments	doi
			Air	Incubator		
Ashrin	2025	Cytotoxicity (LDH), metabolic activity, oxidative stress (DCFDA), secretory cytokines IL-1β, IL-6, IL-8, TNF-α	Yes	Yes	No informations details on control air, no incubator control	https://doi.org/10.1007/s00204-025-03964-x
Bredeck	2025	Gene expression of *HMOX1, IL-8, IL-1ß, IL-1α, IL-6, TNF-α, APE1/REF1, C1QTNF6, GGCS, LTB, NQO1, RCN3,* epithelial integrity (TEER), cytotoxicity (LDH)	Yes	Yes	Effect of different flow rates on oxidative stress (HMOX1) and inflammatory response (IL-8 and TNF-α) (transcriptomic data)	https://doi.org/10.1016/j.envres.2025.122399
Campbell	2025	Cytotoxicity (LDH), genes expression of 20 genes, proteom profil for inflammatory response (secretion of 102 cytokines)	Clean air filtered	Yes	Impact of airflow on IL-13 (inflammation), PRDX2 (antioxidant system) Gene expression and proteins samples of exposure cell are compared to incubator control.	https://doi.org/10.1126/sciadv.adp8100
Delaval	2025	Cytotoxicity (LDH), metabolic activity, DNA breaks, lipid peroxidation (MDA), secretory cytokines IL-8 and -6	Yes	Yes	Incubator and clean air controls for all assays [are not always presented and statistically discuted (just for 1 figure metabolic activity)]	https://doi.org/10.1126/sciadv.adq2348
Di Iulio	2025	Genes expression of *HMOX1, CXCL8, NQO1, ATM, GADD45A*	Clean air filtered + charcoal	NR	No incubator control	https://doi.org/10.1016/j.envpol.2025.126874
Dodero	2025	Cytotoxicity (LDH), genes expression of *ACTB, HO-1, IL-8, TNF-α,* secretory cytokines IL-8, IL-6, TNF-α, and IL-1β	Clean air filtered	NR	No incubator control. Impact of clean air visible anyway cause unaged µplastics and clean air give same results	https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.chemrestox.5c00237
Duistermaat	2025	Cytotoxicity (LDH), epithelial integrity (TEER), viability (WST-1), secretory cytokines IL-6 and -8 and multiplex with 24 cyto- and chemokines	Yes	NR	No information on air control performing, no incubator control	https://doi.org/10.1007/s00204-025-04029-9
Henriquez	2025	Cytotoxicity (LDH), secretory cytokines Eotaxin-2/CCL24, IL-6, IL-8/CXCL8	Yes	NR	No information on air control performing, no incubator control	https://doi.org/10.1016/j.tiv.2025.106060
Introna	2025	Viability (Alamar Blue), secretory cytokines IL-1β, IL-6, IL-8, TNF-α	Clean air filtered	Yes	Incubator control not shown in the results.	https://doi.org/10.1016/j.envpol.2025.126486
Jaber	2025	Cytotoxicity (LDH), genes expression of *AhR, NRF2,* inflammation and apoptotic pathway, secretory cytokines IL-6	Yes	Yes	Incubator control not shown in the results.	https://doi.org/10.1002/jat.4806
Juárez-Facio	2025	Viability (Alamar Blue), secretory cytokines IL-8	Room air (filtered) and synthetic air with or without HEPES	Yes	Optimization of several parameters, such as aerosol flow, temperature, humidity, and incubation time	https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/02786826.2024.2426487
Lu	2025	Viability (CCK-8), Cytotoxicity (LDH), TEER, genes expression of *IL-25, IL-33, TSLP, ZO-1, occludin, claudin-1, GAPDH, B-actin* , immuno ZO-1, claudin-1, occludin, secretom analysis proteomic (LC-MS/MS)	No treatment = filtered air	NR	No incubator control, no information on air control (03 = gas, no particle, so why "filtered" ?)	https://doi.org/10.1007/s00408-025-00851-1
Okuda	2025	Epithelial integrity (TEER), Cytotoxicity (LDH), genes expression of *IL-1ß, IL-6, IL-8, IL-25, IL-33, TNF-α, CCL2, CLDN18.1 and GADPH* , hydrogen peroxide mesurement	Nebulized distilled water (miss air control)	NR	No incubator control [the control is call "untreated controls", it is not clear to me what kind of controls they have used in this study]	https://doi.org/10.3390/atmos16121343
Paengnakorn	2025	Cytotoxicity (MTT, LDH), secretory cytokines IL-1β	Clean air filtered (HEPA)	NR	No details for control performed, incubator	https://doi.org/10.1016/j.envpol.2024.125606
Shankar	2025	Viability (Alamar blue), Cytotoxicity (apoptosis/necrosis), gene expression of *HMOX1* and *IL-8*	Particles free air filtered (HEPA)	Yes	Incubator control data in Supplement	https://doi.org/10.1080/02786826.2024.2442524
Tanios	2025	Cytotoxicity (LDH), gene expression of *IL-8, MCP-1/CCL2, NRF2, HOMOX-1, CYP1A1, GPX2, C-FOS, C-JUN, TP53*	Pure air	NR	No systematic incubator control,	https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969725003225?via%3Dihub#s0010
Tsakonas	2025	Viability (Alamar blue), Cytotoxicity (LDH), Cell morphologie (inverse microscopy), Secretion of inflammatory mediator IL-1β, TNF-α	NR	Yes	No clean air control	https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2025.181099
Vojtisek-Lom	2025	Cytotoxicity (LDH)	NR	NR	No information on control and only LDH assay was performed	https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.178010
Weiss	2025	Viability (cytometry mesureament, Dye eFluor506), cytotoxicity (MTT), secretory cytokines IL-8	Yes	Yes	Incubator control and clean air control are represented graphically. No statistics, no positive control, visual low difference between air and incubator control but no statistic was performed.	https://doi.org/10.1016/j.csbj.2024.12.008
Zimmermann	2025	Viability (CellTiter-Blue®), cytotoxicity (LDH), epithelial integrity (Life/Dead stainning and ZO-1 stainning, mesure of TEER), staining of ZO-1, secretory cytokines IL-6 and IL-8, genes expression of *CXCL8, IL6, IL1ß, TLR2, HMOX1, CYP1A1, CYP1B1, CYP29* , lipid peroxidation (MDA)	Yes	Yes	Effect of different flow rates on IL-8 secretion and MDA lipid peroxidation in supplementary. No comparison between air and incub control for genes expression.	https://doi.org/10.1016/j.envres.2025.120759
Zimmermann-Klemd	2025	Secretory cytokines IL-8, MCP-1, GROα, ENA-78, LDH, WST-1, comet assay, γ-H2AX assay	Clean air filtered (HEPA)	Yes	Impact of clean air on inflammation with IL-8, MCP-1 and GRO-α cytokines secretion (doubt about statistics on cytotoxity between air and incubator control)	https://link.springer.com/article/10.1186/s12302-025-01258-8

First author	Publication year	Exposure system	Cell model	ALI acclimatization	Confluence	Airflow	Aerosol conditioning	Particle deposition enhancement	Exposure duration	Tested contaminant
Buckley	2024	Cultex	A549 + SAECs (primary cells)	10-14 days	Confluent	5 mL/min	5 % CO_2, 75 % RH, 21-22 °C	Electrostatic	10 at 60 min	Clean air
Daniel	2024	Vitrocell	A549	24 h	Monolayer	20 mL/min	38°C, 66 % RH	None	1 h + 24 h hpe	Ketone-Ester-Alcohol-Alkane
Gualtieri	2024	Cultex	BEAS-2B	4 h	NA	5 mL/min		None	24 h	PM_1 urban atmosphere
Küstner	2024	MALIES	A549	3-5 days	N.A	480 mL/min		None	1 h + 24 to 72 hpe	TiO_2
Santoro	2024	Cultex	BEAS-2B	24 h	Confluent	5 mL/min	None	None	24 h	PM_1 classroom atmosphere
Abzhanova	2024	Home made exposure system and imaging	pHBEC expressing Grx1-roGFP2	21 days	Confluent	200 mL/min	5 % CO_2, 37 °C, RH ≥ 90 %	None	110 min	Wood smoke
Das	2024	Vitrocell AES	A549	24 h	64,000 cells/cm2	100 mL/min	85 % RH, 37 °C	None	4 h	Generated ultra fine particle (UFP) aerosols

First author	Publication year	Endpoints	Controls		Comments	doi
			Air	Incubator		
Buckley	2024	Cytotoxicity (LDH), gene expression of *CXCL1, HMOX1, SPP1, MUC5AC, SLC26A4, IL-8, LCN2*	Clean air filtered (HEPA)	Yes	Impact of time exposure (10 at 60 min) and flow rate (0.05 at 30 mL/min) on cytotoxicity, inflammation (IL-8, CXL1, SPP1) and oxidative stress (HMOX1, LCN2).	https://doi.org/10.1016/j.tiv.2024.105889
Daniel	2024	Viability (Alamar blue), Cytotoxicity (LDH)	Yes	Yes	Impact of temperature and relative humidity of cell viability	https://doi.org/10.1371/journal.pone.0300772
Gualtieri	2024	Comet assay, secretory cytokines IL-8, gene expression of *HMOX1, NQO1, CxcL-8, ATM, GADD45a*	Yes	Yes	Incubator control not show in the results.	https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2024.143417
Küstner	2024	Viability (Alamar blue), Cytotoxicity (LDH), oxidative stress (GSSG)	Yes	Yes		https://doi.org/10.1007/s00204-023-03673-3
Santoro	2024	Cytotoxicity (LDH), gene expression of *HMOX-1, NAD(P)H, NQO1, SOD1, SOD2, AhR, CYP1A1, CYPAB1, NFE2L2, NLRP3, IL-1 ß, IL-6, IL-8/CXCL8, IL-18 , GAPDH* , DNA methylation analysis.	Clean air filtered	**NR**	No incubator control.	https://doi.org/10.1016/j.envpol.2024.124471
Abzhanova	2024	Fluorescence microscopy monitoring of Grx1-roGFP2 - Oxidative stress	**NR**	**NR**	No incubator and clean air control.	10.1186/s12989-024-00575-9
Das	2024	Cytotoxicity (LDH), viability (resazurin assay), Oxidative stress (MDA, GSSG, H2DCF-DA), CYP1-dependent ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) and 7-Benzyloxyresorufin-O-dealkylase (BROD) activity, DNA damage	Yes	Free CO2	Incubator control not show in the results.	https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.175727

First author	Publication year	Exposure system	Cell model	ALI acclimatization	Confluence	Airflow	Aerosol conditioning	Particle deposition enhancement	Exposure duration	Tested contaminant
Costabile	2023	CULTEX RFS	BEAS-2B	24 h	Confluent	10 mL/min	None	None	24 h	PM_1
Dilger	2023	Vitrocell CF 6/3	A549 and BEAS-2B	4 h	Confluent	5 mL/min (24-well), 10 mL/min (12-well)	85 % RH	None	4 h	Biomass burning
Hakkarainen	2023	Thermophoresis-based in vitro ALI system	A549/THP-1	48 h	NA	100 mL/min	NA	Thermophoresis	NA	Diesel engine exhaust
Juárez-Facio	2023	Vitrocell System	BEAS-2B	10 days	NA	NA	NA	Electrostatique field	35 min	PM_1 gasoline-fuels and biofuel surrogates combustion
Keyser	2023	VITROCELL Mammalian	CHO-WBL	Just before exposure	Semi-confluent	5 mL/min	NA	None	NA	Whole smoke
Pardo	2023	Vitrocell® AES	BEAS-2B	NA	NA	100 mL/min	5 % RH + 37 °C	None	4 h	Aged and fresh soot particles
Tilly	2023	DAVID	A549	24-48h	Confluent	4 L/min	37°C	None	4-10 min	CuO, CeO_2
Zimmermann	2023	Vitrocell® AES	BEAS-2B	48 h	NA	100 mL/min	None	None	2 h + 2 hpe	BPE or HDME + UFP

First author	Publication year	Endpoints	Controls		Comments	doi
			Air	Incubator		
Costabile	2023	Gene expression *HMOX-1, CXL-8* , secretory cytokines IL-8, Comet assay	Clean air filtered + charcoal	Yes	Incubator control not show in the results.	https://doi.org/10.1038/s41598-023-45230-z
Dilger	2023	Viability (AlamarBlue, WST-1, cell count), cytotoxicity (LDH), genotoxicity (Comet assay, Alkaline unwinding, DNA-Protein-Crosslinks, γ-H2AX, secretory cytokines IL-8, mRNA sequencing	Clean air filtered	Yes	Incubator control not show in the results.	https://doi.org/10.1016/j.envint.2023.108169
Hakkarainen	2023	Genotoxicity (comet assay), secretory cytokines CXCL1, IL-1B, IL-6, TNF-a, INF-γ, IL-10, GM-CFS, cell cycle (IP)	Clean air filtered (HEPA) + charcoal	Yes		https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.164215
Juárez-Facio	2023	Cytotoxicity (MTT), metabolic activity (ATP/ADP quantification), gene expression of *NQO1, HO-1, IL-8, IL-6, CYP1B1* , and *CYP1A1*	Clean air filtered (HEPA) + charcoal	Yes	All data are compare to ct air, control air just filter HEPA (no gas phase elimitation)	https://doi.org/10.3390/toxics11010021
Keyser	2023	Viability (neutral red)	ALI control	Yes	No comparaison between incubator and ALI control for exposure system validation	https://doi.org/10.1089/aivt.2023.0013
Pardo	2023	Cell viability (AlamardBlue), sequencing, gene expression, oxidative stress (MDA), cytokines secretion CXCL11/ITAC, INF-gamma, IL-12, IL-1b, IL-23, IL-6, IL-8, TNF-α, DNA damage	Purified compressed laboratory air	Yes	Viabilty compare to incubator control.	https://doi.org/10.1080/02786826.2023.2178878
Tilly	2023	Secretory cytokines IL-8	Yes	**NR**	"The effect of the new flow and temperature settings in DAVID was evaluated by exposing ALI cultured A549 cells to clean air. No significant differences were observed in the cell viability and IL-8 production from	https://doi.org/10.1016/j.heha.2023.100074
Zimmermann	2023	Cytotoxicity (LDH), comete assay, Oxidative stress (MDA), Transcriptomic (whole-genome)	Synthetic air	**NR**	Double exposure : first with Cloud system and second with Vitrocell AES. No incubator control described, no clean air control show in data	https://doi.org/10.1002/jat.4458

First author	Publication year	Exposure system	Cell model	ALI acclimatization	Confluence	Airflow	Aerosol conditioning	Particle deposition enhancement	Exposure duration	Tested contaminant
Binder	2022	Vitrocell + climate chamber with an external waterbath	A549	24 h	NA	100 ± 10 mL/min	37 ◦C, RH > 90 %	None	4 h +/- 20 hpe	SVOC dibutyl phthalate
Delaval&Jonsdottir	2022	NACIVT (Jeannet, 2014)	HBE (healthy and asthmatic/smoker donors)	4 weeks	Confluent	25 mL/min	85-95% RH, 5 % CO_2, 36-37°C	Electrostatic	1 h + 24 hpe	Non volatile PM aircraft emissions
Guénette	2022	CelTox Sampler	A549	Just before exposure	NA	2.2 L/min	37°C, 85 % RH	None	2 h	O_3
Juarez Facio	2022	Vitrocell + miniCAST	BEAS-2B	Just before exposure	NA	10 mL/min	95 % humidified air with 5 % CO_2 at 37°C	Electrostatic (+ 1000V)	35 min + 3 h or 24 h hpe	Ultra fine particles
Kaur	2022	CelTox sampler	A549/THP1	Just before exposure	Around 80 %	NA	Humidity	Electrostatic	30 to 60 min	PM surrogate of the jet-fuel was combusted
Kim	2022	HIVIS ALI exposure system	A549/THP1	Overnight	Confluent	10 mL/min	NA	None	2 h	AgNP 20–30 nm, 3D printer emissions
Leni	2022	NACIVT	HBE (primary)	21-28 days	NA	NA	85-95 % RH, 5 % CO_2	None	60 min	Secondary organic aerosol (SOA) of α-pinene and 1,3,5-trimethylbenzene (soot as particle vehicle)
Offer	2022	AES, Vitrocell	A549/EA.hy926 and A549	3 days	A549 : 3.8×10^4 cells/cm^2 growth area, EA.hy926 : 0.21×10^4 cells/cm^2 growth area. No confluence.	100 mL/min	85 % RH, 37 °C	None	4 h	β-pinene and naphthalene secondary organic aerosol (SOA), soot as particle vehicle
Speen	2022	Home-made CCES	BEAS-2B, pHBEC	5 days	Monolayer confluent	12.5 mL/min	85 % RH, 37 °C	None	2 h + 4 hpe	Acrolein, acetaldehyde, and 1,3-butadiene, 1-Bromopropane, dichloromethane, trichloroethylene, and carbon tetrachloride
Upadhyay	2022	XposeALI	human primary bronchial epithelial cells grown at ALI	2 weeks	Around 80 %	10 mL/min	37°C, 50-60 % RH	None	3 or 30 min 3 times repeated + 24 hpe	Single (DEP or gases NO_2/SO_2), combined, repeated multi-day exposures

First author	Publication year	Endpoints	Controls		Comments	doi
			Air	Incubator		
Binder	2022	Metabolic activity (resazurin assay), Comet assay	Filtered air exposure + independant cleair air	Without CO_2	distinguishing effects of the gas and particle phases of SVOCs	https://doi.org/10.3390/toxics10120730
Delaval&Jonsdottir	2022	Cytotoxicity (Adenylate Kinase), gene expression of *HMOX-1* , secretory cytokines IL-6, IL-8, MCP-1	Particles-free air exposed cells	Unexposed cells	Thermodenuder to remove volatile components from exhaust	https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.119521
Guénette	2022	Metabolic activity (resazurin assay)	Clean air	Yes		https://doi.org/10.1080/08958378.2022.2039332
Juarez Facio	2022	Cytotoxicity, Mitochondrial dysfunction, Gene expression of *NRF2, NQO1, HO-1, CuZnSOD, MnSOD, catalase, CYP1A1, CYP1B1, IL-6, IL-8*	Clean air filtered (HEPA)	NR	A slight but not significant reduction of viability was reported with clean air compared to incubator controls at 3 h and 24 h after exposure. Based on these results, control air was chosen as a control for particle exposure analysis.	10.1016/j.tiv.2021.105258
Kaur	2022	TEM, Viability (CCK-8), secretory cytokines (TNF-α), gene expression of *CYP1A1*	Clean air filtered	NR	No incubator control	https://doi.org/10.1080/10934529.2022.2083429
Kim	2022	Cytotoxicity (trypan blue), gene expression of *IL-1 β, IL-6, TNF-α, GAPDH*	Clean air filtered (HEPA)	Yes	Incubator control not show in the results.	https://www.frontiersin.org/journals/toxicology/articles/10.3389/ftox.2022.818942/full#s2
Leni	2022	Cytotoxicity (LDH), 102 cytokines and chemokines release	Clean air filtered (HEPA)	Yes	Incubator control not show in the results.	https://doi.org/10.1021/acs.est.2c0369
Offer	2022	Metabolic activity (Alamar Blue), cytotoxicity (LDH), lipid peroxidation (MDA), comet assay, secretory cytokines IL-8, angiogenic potential, Immunofluorescence (IP, DAPI, phalloidin)	Purified compressed laboratory air	Yes	No incubator control show, increased flow rate of 200 mL/min for 20 min before each exposure	https://doi.org/10.1289/EHP9413
Speen	2022	Viability (CellTiter-Glo), Cytotoxicity (LDH), sequencing	Yes	Yes	Caption and figure not according tpresults normalization (figure according to incubator control and caption according to air control)	https://doi.org/10.1093/toxsci/kfac040
Upadhyay	2022	Cytotoxicity (LDH), secretory proteins IL-8, MMP-9, gene expression *IL-8, IL-6, TNF-α, TIMP1, MMP-9, ACTB, GSTA1, HMOX-1, SOD3* .	Sham (clean air)	NR	No incubator control.	https://doi.org/10.3390/toxics10060277

First author	Publication year	Exposure system	Cell model	ALI acclimatization	Confluence	Airflow	Aerosol conditioning	Particle deposition enhancement	Exposure duration	Tested contaminant
Bessa	2021	Vitrocell, AES	A549	24 h	Monolayer (seeded at $5^{\times}10^{3}$ cells/cm² in 6- or 12-well plates)	25 mL/h	None	None	2 or 4 h + 24 hpe	CeO_2, ZrO_2, SnO_2, ATO
Bowers	2021	EPA Human Studies Facility in vitro exposure	pHBEC	24 days	NA	NA	5 % CO_2	None	2 h (1 at 4 times/days)	O_3
He	2021	Vitrocell AES	Calu-3	7 days	Confluent	5 mL/min	85 % RH, 37 °C	None	4 h + 24 hpe	Aircraft hydraulic fluid fumes, engine oil fumes.
Hufnagel	2021	Vitrocell module	A549, MucilAIr	Just before exposure	Confluent	100 mL/min	85 % RH	High voltage	4h + 20 hpe	TiO_2, CuO, MWCNT, PE (+ combined exposure)
Lovén	2021	NACIVT	A549	24 h	NA	25 mL/min	84 % RH, 37°C	Electrostatic	1h + 1-3-24 hpe	ZnO
Méausoone	2021	Vitrocell module series (6/3)	BEAS-2B	None	500 000 cells/insert at the exposure time 4.7 cm² insert	NA	None	None	1 h/day for 1, 3, or 5 days	Benzene, toluene, m-xylene, and 1,3,5-trimethylbenzene
Murugadoss	2021	Vitrocell AES								
Rossner	2021	Home made spark ignition engine (Euro 5)	BEAS-2B, MucilAir™	24 h (BEAS-2B)	Monolayer	?	5 % CO_2, 85 % RH, 37 °C	None	2 h, 1 at 5 days repeat	Gasoline complete E5 and E20 emissions
Verstraelen	2021	VITROCELL® 24/48	A549	None	NA	1,4 mL/min	37 °C ?	None	4 h	Ethylbenzene

First aut+L1:R11hor	Publication year	Endpoints	Controls		Comments	doi
			Air	Incubator		
Bessa	2021	Cytotoxicity (LDH), viability (WST-1), comet assay, standard alkaline	Yes	Yes	Impact of air flow on LDH and WST-1	https://doi.org/10.3390/nano11123225
Bowers	2021	Epithelial integrity (TEER), gene expression of *IL-8, IL-6, HMOX1, COX2*	Clean air filtered	**NR**	No incubator control	https://doi.org/10.1093/toxsci/kfab128
He	2021	Viability (WST-1), epithelial integrity (TEER), cytotoxicity (LDH), secretory cytokines IL-6, IL-8, IL-10 and TNF-α	Clean air filtered	**NR**	No incubator control	https://doi.org/10.1016/j.envint.2021.106718
Hufnagel	2021	Cytotoxicity (LDH), secretory cytokines IL-8, DNA-strand break, gene expression of *HMOX-1* , *HSPA1A* , *GADD45A*	Filtered air without particle fraction	**NR**	Filtered air condition sometimes triggering higher response than NPs exposure; very different to clean air	https://doi.org/10.3390/nano11071685
Lovén	2021	Viability (WST-1), cytotoxicity (LDH), secretory cytokines IL-6, IL-8, TNF-α, MCP-1	Unexposed controls = filtered air exposed cells	**NR**	No "totally" unexposed controls here, "solvent" or "exposure" controls were included	https://doi.org/10.1080/17435390.2021.1884301
Méausoone	2021	Cytotoxicity (LDH), gene expression of *CYP1A1, CYP1B1, CYP2E1, CYP2F1, EPHX1,* secretory cytokines TNF-α, IL-6, IL-8, MCP-1/CCL-2, and GM-CSF, protein expression of MUC1	Clean air filtered	Yes		https://analyticalsciencejournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jat.4113
Murugadoss	2021					
Rossner	2021	Detection of arachidonic acid and lipid oxidation products, 45 secretory cytokines, chemokines, and growth factors	Clean air filtered	Clean air filtered	Big inflammatory and lipid analyse. No incubator control.	https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.130833
Verstraelen	2021	Cytotoxicity (MTT, LDH), gene expression *IL-6, IL-8, HMOX1, SOD2, CCL2, GADPH, HPRT1, ACTB,* secretory cytokines IL-6, IL-8	Yes	Yes	RTqPCR: impact of air flow with gene expression increase *IL-6, IL-8, HMOX1*	https://doi.org/10.14573/altex.2010211

First author	Publication year	Exposure system	Cell model	ALI acclimatization	Confluence	Airflow	Aerosol conditioning	Particle deposition enhancement	Exposure duration	Tested contaminant
Augustin	2020	Vitrocell® 6/3 CF Stainless	BEAS-2B	Just before exposure	NA	NA	None	None	2 h, 1 at 5 days repeated	Ambient air in industrial and urban coastal sites
Cappellini	2020	XposeALI	A549/THP-1	20 h	NA	5 mL/min	None	None	5-20 min + 24 hpe	CeO_2
Cervena	2020	Home made spark ignition engine (Euro 5)	BEAS-2B, MucilAir™	24 h (BEAS-2B)	Monolayer	NA	5% CO2, 85% RH, 37 °C	None	2 h, 1 at 5 days repeated + 5 hpe	Gasoline exhaust
Delaval	2019	NACIVT (Jeannet, 2014)	HBE (healthy donors)	28 days	NA	25 mL/min	85-95% rH, 5% CO2, 36-37°C	Electrostatic	1 h + 24 hpe	E-cigarette aerosols
Diabaté	2020	Vitrocell AES	A549	Just before exposure	NA (seeded at 10^5 cells on 4.67 cm² and incubated	100 mL/min	None	Electric field	4h	CeO_2
Ding	2019	NACIVT (Jeannet, 2014)						electrostatic		
Fizeşan	2018	Vitrocell module	A549/THP-1/HMC-1/Ea.hy926	24 h	Confluent	6 mL/min	NA	None	7-20 min + 12-24 hpe	Diesel exhaust
Inhantola	2020	Thermophoretic exposure system (Tox-ALI) + Custom electrophoresis system (OMICS-ALI)	A549, RAW264.7	24-48 h	NA	Tox-ALI: 150 mL/min OMICS-ALI: 100 mL/min	Tox-ALI: 100% RH, 37°C OMICS-ALI: 85% RH, 37°C	Tox-ALI: thermophoresis OMICS-ALI: electrostatic	1 h + 24 hpe or 4 h + 0 hpe	Wood combustion (spruce and pine)
Ji	2019	XposeALI	pHBEC	3 weeks	Confluent	10 mL/min		None	1-3 min + 24 hpe	Printex 90
Jonsdottir	2019	NACIVT (Jeannet, 2014)	BEAS-2B	4-8 h	NA (seeded at the density of 2×10^5 cells cm^{-2} for next day exposure on microporous 6.5 mm Transwell)	25 mL/min	85-95% RH, 5% CO2, 36-37°C	Electrostatic	1 h +24 hpe	Non volatile PM aircraft emissions
Kooter	2019	Vitrocell module	MucilAir	1 week	monolayer	1.5 mL/min		None	1h + 24 hpe	CuO
Leibrock	2020	Vitrocell module	A549	NA	NA	5 mL/min	RH > 90%, 38°C	None	1-4 h	CeO2
Medina-Reyes	2020	Vitrocell AES	A549	NA	NA	100 mL/min		Electrostatic	1-4 h + 24-72 hpe	TiO2
Tilly	2020	Custom designed Aerosol Exposure Chamber	A549	24h	NA	10 mL/min	37°C, 95% RH	Electrostatic	15-60 min + 24 hpe	CuO, ZnO, NiO
Tsoutsoulopoulos	2019	CULTEX RFS	A549	NA	NA	30 mL/min			15-30 min + 24 hpe	CuO
Wang	2019	CULTEX	BEAS-2B	NA	NA	5 mL/min		None	3 h	SiO_2-OH and SiO_2-NH_2
Wang	2020	Vitrocell module	A549, A549/THP-1/Ea.hy926	12 h	Confluent	5 mL/min		None	4 h	Ag, Au, CuO

First author	Publication year	Endpoints	Controls		Comments	doi
			Air	Incubator		
Augustin	2020	Gene expression of *IL-6, CYP1A1, CAT,* secretory cytokines IL-6	Clean air filtered	Yes		https://doi.org/10.3390/rs12040648
Cappellini	2020	Viability (Alamar blue), cytotoxicity (LDH), secretory cytokines IL-1β, IL-6, IL-8, TNF-α	Sham	Yes	"Sham" term is normali use for animal control.	https://doi.org/10.3390/nano10040618
Cervena	2020	Cytotoxicity (LDH), Epithelial integrity (TEER), genotoxicity (γ-H2AX), sequencing, secretory mucine, gene expression *CYP1A1, GSTA3, ACTB, TOP1*	Clean air filtered	Yes	Impact air flow on IL-6 secretion and gene expression of *IL-6, CAT and CYP1A1* (depending of the periode)	https://doi.org/10.3390/ijms22010079
Delaval	2019	Cytotoxicity (LDH)	1) unexposed cells (incubator cells) 2) p-free air exposed cells	NR	p-free air = filtered lab air	https://doi.org/10.1016/j.jaerosci.2018.11.011
Diabaté	2020	Cytotoxicity (LDH), gene expression of *HO-1, IL1b, IL-8, MCP-1, TNF*, comet assay	Clean air filtered (HEPA) + untreated control	NR	Increase in IL-8 secretion after 0.08 L/min clean HEPA filtered air Untreated control = incubator control ?	https://doi.org/10.3390/nano11010065
Ding	2019			NR	Incubator control data is in Supplementary	
Fizeşan	2018	Cytotoxicity (LDH), secretory cytokines IL-8, IL-6, proteins expression HMOX-1, PCR of 26 genes	Clean filtered ambient air	NR		https://doi.org/10.1016/j.tiv.2018.07.019
Inhantola	2020	Cell death, DNA damage, cytokine, LDH, transcriptome/proteome	Clean air/HEPA-filtered air	Yes	Incubator control data is in Supplementary "The Tox-ALI exposure system systematically reduced viability in both the clean air controls and the exposure group"	https://doi.org/10.1186/s12989-020-00355-1
Ji	2019	Alamar blue, LDH, CXCL8, MMP9, qPCR (CXLC8, IL6, TNF–α, NFkB, HMOX, SOD3, MMP9, MUC5AC), TEER	Sham (clean air)	Yes	Incubator control data is in Supplementary	https://doi.org/10.1080/17435390.2019.1655600
Jonsdottir	2019	LDH, HMOX (qPCR), IL-6, IL-8, MCP-1	p-free air exposed cells	Yes	thermodenuder to remove volatile components from exhaust	https://doi.org/10.1038/s42003-019-0332-7
Kooter	2019	LDH, IL-8, IL-6, MCP-1, transcriptomics	Air exposed controls	Yes		https://doi.org/10.1021/acsnano.9b01823
Leibrock	2020	WST-1	Clean air	Yes		https://doi.org/10.3390/nano10122369
Medina-Reyes	2020	LDH, DNA strand breaks	Clean air	NR		https://doi.org/10.1016/j.tiv.2020.104798
Tilly	2020	Alamar blue, LDH, IL-8	NR	NR	No indication of control for the ALI exposure; "Control" condition in ALI is not stated	https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.9b00237
Mitsoulopoulos	2019	WST-1	Clean air	Yes		https://doi.org/10.1016/j.tiv.2019.03.020
Wang	2019	CCK-8 cell viability, LDH, DCFH-DA, gene/protein exp of apoptotic markers	Clean air	Yes	No impact of filtered air compared to incubator control	https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.02.022
Wang	2020	MoxiCyte (cell viability), ROS, LDH, IL-8	Filtered air	Yes	Parametric optimization investigating effects of flow rates, T°C, RH on cell viability	https://doi.org/10.1016/j.impact.2020.100215

Annexe 2 – Tableau non exhaustif des études d'exposition dynamique ALI

Annexe 3 – Tableau des gènes différentiellement dérégulés lors des expositions aux AOS

Annexe 3 – Tableau des gènes différentiellement dérégulés lors des expositions aux AOS

Tableau des gènes différentiellement dérégulé entre les CT AIR et tous les AOS et leur implication dans les différents mécanismes cellulaires :

- En rouge, les mécanismes de réponses inflammatoires et de stress oxydant classiquement induits lors d'exposition aux polluants atmosphériques.
- En bleu, les mécanismes liés au métabolisme cellulaire tel que ceux des sucres incluant les mécanismes énergétiques, de signalisation, de communication et de structures, ceux des composés exogènes incluant les hormones stéroïdes (CYP) et NADPH et ceux de détoxification
- En violet, les mécanismes de maintenance, réparation et remodelage tissulaire incluant les phénomènes de kératinisation, sécrétion de mucus et surfactant, remodelage du cytosquelette participant à la modification et l'adaptation des propriétés de surface cellulaire.
- En vert, les mécanismes de signalisation classique tels que MAPK, ERRK et NFκB impliquée dans l'inflammation et la régulation du cycle cellulaire.

Genes_ID	log2FoldChange	padj	Genes	symbol	description	refseq	Function
10148	1,529192087	2,99203E-05	ENSG00000188488	SERPINA5	serpin family A member 5	NM_000624	Inhibit serine proteases
13076	1,17487598	0,00541081	ENSG00000124253	PCK1	phosphoenolpyruvate carboxykinase 1	NM_002591	Gluconeogenesis
3102	1,068181658	0,000763785	ENSG00000235831	BHLHE40-AS1	BHLHE40 antisense RNA 1	NR_037903	
10732	1,053518222	2,36333E-05	ENSG00000166920	C15orf48	chromosome 15 open reading frame 48	NM_032413	
12139	1,049574632	0,001209968	ENSG00000212724	KRTAP2-3	keratin associated protein 2-3	NM_001165252	Keratinization
14167	1,033980946	0,047137099	ENSG00000125740	FOSB	FosB proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit	NM_001114171	IL-1 Family Signaling Pathways
10588	1,025920445	0,001301953	ENSG00000103888	CEMIP	cell migration inducing hyaluronidase 1	NM_001293298	Glycosaminoglycan metabolism and Metabolism
4012	1,023470623	0,015135033	ENSG00000238835	SCARNA18	small Cajal body-specific RNA 18	NR_003139	
11794	1,016771282	0,006451978	ENSG00000108551	RASD1	ras related dexamethasone induced 1	NM_001199989	MAP Kinase Signaling
14139	0,986019985	0,001187296	ENSG00000275395	FCGBP	Fc gamma binding protein	NM_003890	Maintenance of the mucosal structure
5969	0,977425963	0,016741984	ENSG00000002079	MYH16	myosin heavy chain 16 pseudogene	NR_002147	Cytoskeleton remodeling, Regulation of actin cytoskeleton by Rho GTPases and Immune response CCR3 signaling in eosinophils
9370	0,946426227	4,12345E-05	ENSG00000135094	SDS	serine dehydratase	NM_006843	Metabolism
14185	0,885234802	0,151423734	ENSG00000181143	MUC16	mucin 16, cell surface associated	NM_001401501	Mucus
13823	0,844533485	1,25783E-08	ENSG00000268621	IGFL2-AS1	IGFL2 antisense RNA 1	NR_135234	
8093	0,816430264	0,000390305	ENSG00000204381	LAYN	layilin	NM_001258390	Glycosaminoglycan metabolism
14219	0,813374204	0,005304277	ENSG00000268812	LIF-AS2	LIF antisense RNA 2	NM_052856	
6666	0,811780119	0,004451088	ENSG00000104368	PLAT	plasminogen activator, tissue type	NM_000930	Cell migration and Tissue remodeling

4895	0,808785404	0,048484101	ENSG00000146070	PLA2G7	phospholipase A2 group VII	NM_001168357	Lipoprotein-associated calcium-independent phospholipase A2 involved in phospholipid catabolism during inflammatory and oxidative stress response
10165	0,805698013	0,011402561	ENSG00000129538	RNASE1	ribonuclease A family member 1, pancreatic	NM_002933	
2114	0,802384572	0,000362712	ENSG00000168878	SFTPB	surfactant protein B	NM_000542	Pulmonary-associated surfactant protein B (SPB), an amphipathic surfactant protein essential for lung function and homeostasis, SPB enhances the rate of spreading and increases the stability of surfactant monolayers in vitro
5617	0,793379623	0,011400483	ENSG00000159784	FAM131B	family with sequence similarity 131 member B	NM_001031690	Oncogenic MAPK signaling
14122	0,793007212	0,018742049	ENSG00000188039	NWD1	NACHT and WD repeat domain containing 1	NM_001007525	Niemann-Pick Disease, Type C2
7401	0,784919059	0,093501421	ENSG00000264379	LOC124900282	small nucleolar RNA SNORD55/SNORD39	XR_007061913	
2912	0,781219018	0,002154553	ENSG00000118849	RARRES1	retinoic acid receptor responder 1	NM_002888	RA receptors
1598	0,774927857	0,000167332	ENSG00000136542	GALNT5	polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 5	NM_001329868	Mucin-type O-glycosylation of Golgi proteins
10878	0,772785382	0,019601801	ENSG00000198535	C2CD4A	C2 calcium dependent domain containing 4A	NM_207322	Involved in positive regulation of acute inflammatory response; regulation of cell adhesion;
12622	0,764401337	0,012318795	ENSG00000266278	LINC01910	long intergenic non-protein coding RNA 1910	NR_110764	

13126	0,763758549	0,000261823	ENSG00000230176	LINC01433	long intergenic non-protein coding RNA 1433	NR_033917	
13361	0,752230693	0,02044815	ENSG00000214049	UCA1	urothelial cancer associated 1	NR_015379	
10250	0,751459097	0,003831243	ENSG00000168398	BDKRB2	bradykinin receptor B2	NM_000623	Inflammation?
2320	0,750462802	0,00138744	ENSG00000134323	MYCN	MYCN proto-oncogene, bHLH transcription factor	NM_001293228	Tumor, Cell-cell junction organization and Signaling by TGFB family members
4861	0,745419959	0,031019434	ENSG00000204616	TRIM31	tripartite motif containing 31	NM_007028	Cytokine Signaling in Immune system.
8181	0,73493427	0,027338182	ENSG00000173237	C11orf86	chromosome 11 open reading frame 86	NM_001136485	
8502	0,731415425	0,00157756	ENSG00000223131	RNA5SP304	RNA, 5S ribosomal pseudogene 304		
12150	0,72895993	0,003764286	ENSG00000171401	KRT13	keratin 13	NM_002274	Keratinization
415	0,7283861	0,028620936	ENSG00000203857	HSD3B1	hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase, 3 beta- and steroid delta-isomerase 1	NM_000862	Metabolism of steroid hormones and Metabolism
5136	0,720539871	0,019635013	ENSG00000286042	LCAL1	lung cancer associated lncRNA 1	NR_130915	
14609	0,710923684	0,041702989	ENSG00000160179	ABCG1	ATP binding cassette subfamily G member 1	NM_004915	Pulmonary Alveolar Proteinosis. Among its related pathways are Plasma lipoprotein assembly, remodeling, and clearance
6994	0,694229411	0,117061343	ENSG00000235448	LURAP1L-AS1	LURAP1L antisense RNA 1	NR_125775	
14509	0,687885044	0,031825531	ENSG00000238120	LINC01589	long intergenic non-protein coding RNA 1589	NR_131244	
13581	0,684127717	0,055302827	ENSG00000187867	PALM3	paralemmin 3	NM_001145028	Negative regulation of cytokine-mediated signaling pathway; and response to lipopolysaccharide
8823	0,681459709	0,00352294	ENSG00000231298	MANCR	mitotically associated long non coding RNA	NR_024475	

5036	0,678918425	0,11970741	ENSG00000112182	BACH2	BTB domain and CNC homolog 2	NM_001170794	NF-kappaB Signaling
11163	0,672535031	0,921175775	ENSG00000205358	MT1H	metallothionein 1H	NM_005951	Metal ion SLC transporters and Cellular responses to stimuli.
7448	0,66648704	0,000243421	ENSG00000171889	MIR31HG	MIR31 host gene	NR_027054	
5334	0,663151685	0,122787693	ENSG00000006128	TAC1	tachykinin precursor 1	NM_003182	
11644	0,660943205	0,099688598	ENSG00000005513	SOX8	SRY-box transcription factor 8	NM_014587	ERK signaling
89	0,658776812	0,023408431	ENSG00000172260	NEGR1	neuronal growth regulator 1	NM_173808	Metabolism
9921	0,655592721	0,032641276	ENSG00000139515	PDX1	pancreatic and duodenal homeobox 1	NM_000209	Metabolism
4898	0,65047662	0,000959287	ENSG00000180573	H2AC6	H2A clustered histone 6	NM_003512	
13338	0,649764139	7,73605E-05	ENSG00000170608	FOXA3	forkhead box A3	NM_004497	Adult-Onset Severe Asthma
1342	0,645893181	0,026535041	ENSG00000143001	TMEM61	transmembrane protein 61	NM_182532	
7742	0,638321672	0,000335828	ENSG00000165905	LARGE2	LARGE xylosyl- and glucuronyltransferase 2	NM_001300721	O-linked glycosylation and Metabolism of proteins
12124	0,63294855	0,099688598	ENSG00000131737	KRT34	keratin 34	NM_001386014	Keratinization
4114	0,631188713	0,001301953	ENSG00000164266	SPINK1	serine peptidase inhibitor Kazal type 1	NM_001354966	
1285	0,629982537	0,012674604	ENSG00000131781	FMO5	flavin containing dimethylaniline monoxygenase 5	NM_001144829	Metapathway biotransformation Phase I and II
8261	0,628981888	0,023022315	ENSG00000245498	MSANTD2-AS1	MSANTD2 antisense RNA 1	NR_103862	
5438	0,627974746	4,80046E-10	ENSG00000085662	AKR1B1	aldo-keto reductase family 1 member B	NM_001346142	Catalyzes the NADPH-dependent reduction of a wide variety of carbonyl-containing compounds to their corresponding alcohols.
6465	0,624514107	0,04524159	ENSG00000253802	SIRLNT	SIRT1 regulating lncRNA tumor promoter	NR_156738	
13336	0,623901921	0,055513049	ENSG00000125735	TNFSF14	TNF superfamily member 14	NM_001376887	TNF ligand family
6116	0,621785285	5,56061E-05	ENSG00000049769	PPP1R3F	protein phosphatase 1 regulatory subunit 3F	NM_001184745	Glycogen and Glucose metabolism

10570	0,620246507	0,014769103	ENSG00000104043	ATP8B4	ATPase phospholipid transporting 8B4 (putative)	NM_024837	Component of a P4-ATPase flippase complex which catalyzes the hydrolysis of ATP coupled to the transport of aminophospholipids from the outer to the inner leaflet of various membranes and ensures the maintenance of asymmetric distribution of phospholipids.
8599	0,618710782	0,026818445	ENSG00000152779	SLC16A12	solute carrier family 16 member 12	NM_213606	Transmembrane transporter that likely plays a role in monocarboxylic acid transport
4744	0,617960176	6,70113E-08	ENSG00000124587	PEX6	peroxisomal biogenesis factor 6	NM_000287	Peroxisomal protein import
11706	0,604595304	0,028620936	ENSG00000173991	TCAP	titin-cap	NM_003673	
8960	0,601976242	0,029136284	ENSG00000232229	LINC00865	long intergenic non-protein coding RNA 865	NR_038382	
3869	0,599930446	0,005692951	ENSG00000133401	PDZD2	PDZ domain containing 2	NM_015022	Sequence similarity with pro-interleukin-16 (pro-IL-16)
3881	0,597599006	0,031894312	ENSG00000248727	LINC01948	long intergenic non-protein coding RNA 1948	NR_104664	
1694	0,597530393	0,04123637	ENSG00000144481	TRPM8	transient receptor potential cation channel subfamily M member 8	NM_001397606	Ion (Ca^{2+}) channel transport and CREB Pathway
460	0,593589009	0,016401651	ENSG00000117407	ARTN	artemin	NM_001136215	Secreted ligand of the glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) subfamily and TGF-beta (transforming growth factor-beta) superfamily of

							proteins, MAPK family signaling cascades
8227	0,592530788	0,349279727	ENSG00000187479	C11orf96	chromosome 11 open reading frame 96	NM_001145033	
1238	0,591888637	0,09668566	ENSG00000135835	KIAA1614	KIAA1614	NM_020950	Establishment or maintenance of cell polarity; and regulation of cellular localization. Predicted to be active in apical plasma membrane
7866	0,590827269	0,004492539	ENSG00000175538	KCNE3	potassium voltage-gated channel subfamily E regulatory subunit 3	NM_005472	Voltage-gated potassium (Kv) channels represent the most complex class of voltage-gated ion channels from both functional and structural standpoints: Their diverse functions includeregulating epithelial electrolyte transport and cell volume.
4380	0,588987742	0,197183695	ENSG00000250328	MGC32805	uncharacterized LOC153163	NR_051996	
7446	0,588673286	0,113812245	ENSG00000236849	LINC01474	long intergenic non-protein coding RNA 1474	NR_121120	
6705	0,587007377	0,122202035	ENSG00000182759	MAFA	MAF bZIP transcription factor A	NM_201589	
8726	0,586295177	0,09404258	ENSG00000170324	FRMPD2	FERM and PDZ domain containing 2	NM_001017929	This full-length gene appears to function in the establishment and maintenance of cell polarization. The protein is recruited to cell-cell junctions in an E-cadherin-dependent manner, and is selectively localized at the basolateral membrane in polarized epithelial cells.

11184	0,58565334	0,00267344	ENSG00000183196	CHST6	carbohydrate sulfotransferase 6	NM_021615	Diseases of glycosylation.
6023	0,585389543	0,01667769	ENSG00000268104	SLC6A14	solute carrier family 6 member 14	NM_007231	Transport of inorganic cations/anions and amino acids/oligopeptides and Disorders of transmembrane transporters.
9081	0,585178456	0,021456461	ENSG00000136040	PLXNC1	plexin C1	NM_005761	Plexins are transmembrane receptors for semaphorins, a large family of proteins that regulate axon guidance, cell motility and migration, and the immune response
170	-0,591447137	0,019853046	ENSG00000135842	NIBAN1	niban apoptosis regulator 1	NM_052966	The encoded protein may play a role in regulating p53-mediated apoptosis
14410	-0,601484155	0,04524159	ENSG00000100206	DMC1	DNA meiotic recombinase 1	NM_001278208	
6996	-0,604836691	6,33802E-07	ENSG00000148057	IDNK	IDNK gluconokinase	NM_001001551	Carbohydrate metabolism
3362	-0,610718904	0,065593879	ENSG00000250326	LOC105377623	uncharacterized LOC105377623	NR_136203	
3549	-0,621112798	0,006841596	ENSG00000169248	CXCL11	C-X-C motif chemokine ligand 11	NM_001302123	Chemokines also play fundamental roles in the development, homeostasis, and function of the immune system,
6839	-0,62525729	0,026566502	ENSG00000168077	SCARA3	scavenger receptor class A member 3	NM_016240	This gene encodes a macrophage scavenger receptor-like protein. This protein has been shown to deplete reactive oxygen species and thus play an important role in protecting cells from oxidative stress. The expression of this gene

							is induced by oxidative stress.
11362	-0,631979495	0,595398029	ENSG00000125144	MT1G	metallothionein 1G	NM_001301267	Metal ion SLC transporters and Cellular responses to stimuli.
7960	-0,636100157	0,020429625	ENSG00000150773	PIH1D2	PIH1 domain containing 2	NM_001082619	
2596	-0,637786384	0,033096481	ENSG00000197415	VEPH1	ventricular zone expressed PH domain containing 1	NM_001167911	Involved in negative regulation of SMAD protein signal transduction and negative regulation of transforming growth factor beta receptor signaling pathway.
763	-0,638698241	0,021201337	ENSG00000214193	SH3D21	SH3 domain containing 21	NM_001162530	Actin cytoskeleton organization
6151	-0,650681536	0,06943321	ENSG00000123576	ESX1	ESX homeobox 1	NM_153448	
11673	-0,668614366	6,75032E-11	ENSG00000132141	CCT6B	chaperonin containing TCP1 subunit 6B	NM_001193529	Cytoskeleton organization
3548	-0,67819589	0,064552298	ENSG00000169245	CXCL10	C-X-C motif chemokine ligand 10	NM_001565	Pro-inflammatory cytokine that is involved in a wide variety of processes such as chemotaxis, differentiation, and activation of peripheral immune cells, regulation of cell growth, apoptosis and modulation of angiostatic effects
5632	-0,712771124	0,217570054	ENSG00000146678	IGFBP1	insulin like growth factor binding protein 1	NM_000596	
436	-0,715825428	0,056795712	ENSG00000082482	KCNK2	potassium two pore domain channel subfamily K member 2	NM_001017424	K(+) channel that conducts voltage-dependent outward rectifying currents upon membrane depolarization.
3295	-0,743891166	0,017311612	ENSG00000109181	UGT2B10	UDP glucuronosyltransferase family 2 member B10	NM_001075	Glucuronidation

1457	-0,747899421	0,331683418	ENSG00000158014	SLC30A2	solute carrier family 30 member 2	NM_001004434	Metal ion SLC transporters and Transport of inorganic cations/anions and amino acids/oligopeptides.
3409	-0,775081895	0,010482069	ENSG00000248866	USP46-DT	USP46 divergent transcript	NR_125363	
5794	-0,811537724	0,007044163	ENSG00000183696	UPP1	uridine phosphorylase 1	NM_001287426	Mechanism of protection against oxidative stress
10155	-0,85010288	0,13421871	ENSG00000100867	DHRS2	dehydrogenase/reductase 2	NM_001318835	Members of this family are enzymes that metabolize many different compounds, such as steroid hormones, prostaglandins, retinoids, lipids and xenobiotics.
2094	-0,85228262	0,013363997	ENSG00000183671	CMKLR2	chemerin chemokine-like receptor 2	NM_001098199	Glucose homeostasis
5565	-1,052871859	0,003907627	ENSG00000122641	INHBA	inhibin subunit beta A	NM_002192	TGF-beta (transforming growth factor-beta) superfamily of proteins

Toxicité pulmonaire *in vitro* des aérosols organiques secondaires issus de la combustion de biomasse

La pollution aux particules fines ($PM_{2.5}$) dans l'air ambiant est un enjeu environnemental et sanitaire majeur. La combustion de biomasse représente une source importante de $PM_{2.5}$ en lien avec le chauffage résidentiel au bois, les feux de forêt, les pratiques d'écobuage, etc. Cette source émet également de grandes quantités de composés organiques de différentes volatilités, conduisant à la formation d'aérosols organiques secondaires (AOS) par des processus (photo)-chimiques et physiques ayant lieu dans l'atmosphère. Malgré leur contribution importante aux concentrations atmosphériques des $PM_{2.5}$, la toxicité pulmonaire induite par les AOS issus de l'oxydation de précurseurs émis par la combustion de biomasse est encore méconnue. Compte tenu de la très faible granulométrie des AOS (< 1µm), l'étude de leurs effets toxicologiques est particulièrement adaptée à des modèles *in vitro* d'épithélium alvéolaire en interface air-liquide (ALI), permettant une exposition physiologiquement plus représentative. Dans ce contexte, ce travail de thèse visait à caractériser la toxicité des AOS issus de précurseurs (hydrocarbures aromatiques polycycliques – HAP – et phénol) majoritairement émis lors de la combustion de biomasse, en s'appuyant sur un modèle alvéolaire *in vitro* exposé en ALI, intégrant la maîtrise des conditions d'exposition dynamique (sous flux d'air) comme étape essentielle à l'interprétation des réponses toxicologiques. Ainsi, un modèle de coculture alvéolaire humain, simple, stable et physiologiquement pertinent, a été développé et caractérisé pour des conditions d'exposition dynamique en ALI jusqu'à 72 h. Une attention particulière a été portée sur l'impact du flux d'air en lui-même. Les résultats obtenus ont montré que ce dernier induisait un stress mécanique résultant en un stimulus biologique actif associé à une réponse cellulaire et une forte signature génique de mécanotransduction. Il est donc apparu indispensable d'évaluer son impact en lien avec des marqueurs de toxicité ciblés afin de disposer d'une interprétation fiable des effets des polluants atmosphériques testés. Les résultats d'exposition ALI aux AOS de HAP et phénol, seuls ou en mélange, formés dans des conditions d'oxydation diurne (impliquant le radical OH) ou nocturne (impliquant le radical NO_3), ont montré que le potentiel toxique des AOS était gouverné par leurs propriétés physico-chimiques et leur durée d'exposition. Les réponses cellulaires observées ont suivi une trajectoire dynamique allant de l'activation de mécanismes de défense et de réparation jusqu'à l'installation de mécanismes adaptatifs. Au-delà de ces résultats toxicologiques, ce travail a souligné une limite méthodologique majeure : sans contrôle rigoureux des conditions d'exposition en ALI, toute interprétation toxicologique reste discutable.

Mots clés : Toxicité pulmonaire *in vitro*, Qualité de l'air, Interface air-liquide (ALI), Aérosols organiques secondaires (AOS), Biomarqueurs, Combustion de biomasse.

Fine particulate matter ($PM_{2.5}$) air pollution is a major environmental and public health concern. Biomass burning accounts for a significant source of $PM_{2.5}$ linked to residential wood heating, wildfires, and agricultural open burning. This source also emits large quantities of organic compounds with varying volatilities, leading to the formation of secondary organic aerosols (SOA) through (photo)-chemical and physical processes occurring in the atmosphere. Despite their substantial contribution to atmospheric $PM_{2.5}$ concentrations, the pulmonary toxicity induced by SOA originating from the oxidation of biomass combustion precursors remains poorly understood. Given the small SOA particle size (< 1 µm), the study of their toxicological effects is particularly well suited to in vitro alveolar epithelial models cultured at the air-liquid interface (ALI), allowing for more physiologically relevant exposure conditions. In this context, the aim of this PhD work was to characterize the toxicity of SOA derived from precursors (polycyclic aromatic hydrocarbons - PAHs, and phenol) predominantly emitted during biomass combustion, using an *in vitro* alveolar model exposed at the ALI, while integrating the control of dynamic exposure conditions (under airflow) as a key step for the interpretation of the toxicological responses. Thus, a simple, stable, and physiologically relevant human alveolar co-culture model was developed and characterized by dynamic exposure conditions at the ALI up to 72 h. Particular attention was given to the impact of airflow itself. The results obtained showed that airflow induced mechanical stress, resulting in an active biological stimulus associated with cellular responses and a strong mechanotransduction genic signature. To ensure reliable interpretation of the effects of the tested atmospheric pollutants, it therefore essential to assess their impacts in relation to the targeted toxicity markers. ALI exposure experiments to SOA derived from PAHs and phenol, either individually or as mixtures, formed under daytime (involving OH radicals) or nighttime oxidation conditions (involving NO_3 radicals), showed that SOA toxic potential was governed by their physicochemical properties and exposure duration. The observed cellular responses followed a dynamic trajectory ranging from the activation of defense and repair mechanisms to the establishment of adaptive responses. Beyond these toxicological findings, this work highlighted a major methodological limitation: without rigorous control of ALI exposure conditions, any toxicological interpretation remains questionable.

Keys words: *In vitro* pulmonary toxicity, Air quality, Air-liquid interface, Secondary organic aerosols (SOA), Biomarkers, Biomass burning.

Alunni Aurelia - 2026