



UNIVERSITE DE LILLE

Faculté D'Ingénierie et Management de la Santé (ILIS)

**MEMOIRE**

Master 2<sup>ème</sup> année « Qualité Santé Environnement Toxicologie »

par

**Benjamin LIMA**

# TOXICITE PULMONAIRE DES PARTICULES ULTRAFINES DE FUMEEES DE SOUDAGE : ETUDE IN VITRO ET ROLE DES FACTEURS EPIGENETIQUES

Sous la direction du Dr LO-GUIDICE Jean-Marc

Soutenu le 8 Octobre 2019 devant le jury composé de :

Professeur HUBERT Hervé, EA 2694 Professeur Universitaire

Docteur LO GUIDICE Jean-Marc, CR INSERM, EA 4483 Directeur de mémoire

Docteur LEPAGE Nadège, Praticien Hospitalier au Service de médecine du travail et pathologies professionnelles

*En collaboration avec l'Institut des Mines-Télécom  
de Douai et l'Institut National de Recherche et de Sécurité.*



Faculté d'Ingénierie et Management de la Santé - ILIS

42 rue Ambroise Paré

59120 LOOS



# TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION .....	1
Contexte.....	1
Epidémiologie des atteintes respiratoires du soudeur.....	3
Etudes toxicologiques <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> sur les fumées de soudage.....	5
Etudes épigénétiques.....	6
MATERIELS ET METHODES.....	9
Caractérisation physicochimique des particules de FS.....	9
Collecte des particules de fumée de soudage :.....	9
Dosage des métaux :.....	9
Dosage du chrome hexavalent :.....	10
Dispersion granulométrique des PUF et potentiel zêta :.....	10
Culture cellulaire.....	10
Analyse de la cytotoxicité .....	11
Dosage des protéines totales .....	12
Analyse de l'inflammation.....	12
Analyse du stress oxydant.....	13
Dosage des protéines carbonylées :.....	13
Dosage de la 8-hydroxy-desoxyguanine :.....	14
Evaluation du statut du glutathion :.....	14
Analyses transcriptomiques.....	14
Extraction des ARN totaux :.....	14
Analyse du profil des ARNm :.....	15
Analyse du profil des miARN :.....	15
Analyse statistique des données de PCR quantitative (qPCR) :.....	16
Analyses statistiques.....	16
RESULTATS.....	17
Caractérisation physicochimique des particules de FS.....	17
Collecte des particules de fumée de soudage :.....	17
Dosage des métaux :.....	17
Dosage du chrome hexavalent :.....	18
Dispersion granulométrique des PUF et potentiel zêta :.....	18
Cytotoxicité.....	20
Analyse du stress oxydant.....	24
Protéines Carbonylées :.....	24

Dosage de la 8-hydroxy-desoxyguanine : .....	25
Evaluation du statut du glutathion : .....	26
Analyse transcriptomique .....	27
Analyse visuelle des OpenArray® (ARN et miARN) : .....	27
Analyse des données transcriptomiques (ARN et miARN) : .....	29
DISCUSSION .....	35
CONCLUSION .....	43
BIBLIOGRAPHIE .....	44

## TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Schéma du protocole d'exposition pour l'analyse de l'inflammation, du stress oxydant, l'analyse transcriptomique (ARNm) et des altérations épigénétiques (miARN).....	12
Figure 2 : Représentation graphique de la composition élémentaire relative des PUF de FS (ng/μg).....	18
Figure 3 - Scattergrammes de la dispersion moyenne des PUF de FS (a) par nombre et (b) par intensité.....	19
Figure 4 - Scattergrammes de la distribution des PUF de FS en suspension à 1,91 μg/μL.....	19
Figure 5 - Représentation graphique des courbes de viabilité cellulaire des 3 expositions indépendantes en fonction de la concentration (μg/cm <sup>2</sup> ).....	21
Figure 6 - Représentation graphique de la viabilité cellulaire moyenne.....	22
Figure 7 : Plot des concentrations des cytokines (pg/mL) observées à l'issue de l'étude de l'inflammation des BEAS-2B exposée aux PUF de FS.....	22
Figure 8 : Expression des cytokines dans les lysats cellulaires selon le schéma d'exposition (aiguë ou répétée) et selon la dose (μg/cm <sup>2</sup> ).....	23
Figure 9 : Courbes de régression de la gamme de calibration pour la quantification des protéines totales (μg/mL) (a) et le dosage des protéines carbonylées (nmol/mg) (b).....	24
Figure 10 : Représentation de synthèse de protéines carbonylées selon la concentration de PUF et le schéma d'exposition.....	25
Figure 11 - Représentation de l'analyse de 8OHdG.....	26
Figure 12 : Représentation du ratio Glutathion oxydé sur Glutathion réduit en fonction de la dose (μg/cm <sup>2</sup> ) et du schéma d'exposition (aiguë et répétée).....	27
Figure 13 : Exemple d'erreurs analytiques aléatoires observées sur l'image de la lame OpenArray® AZK11 à la fin de 40 cycles d'amplification.....	28
Figure 14 : Artéfacts d'amplification mis en évidence à l'aide du logiciel intégré ThermoFisher (Cloud).....	28
Figure 15 : Courbes d'amplification (RT-PCR) de PDK1.....	29
Figure 16 : Exemple de Volcano-Plot des ARNm surexprimés (rouge) et sous-exprimés (vert) dans les cellules exposées de manière répétée à forte dose de PUF de FS (1,5 μg/cm <sup>2</sup> ) par rapport aux cellules contrôles.....	30
Figure 17 : Représentation du nombre d'ARNm (a) et de miARN (b) dérégulés selon le type d'exposition (aiguë ou répétée) et selon la dose (faible ou forte).....	30
Figure 18 : Diagramme de Venn des cibles potentielles de hsa-miR-744-3p.....	32
Tableau 1 : Synthèse des ARNm et miARN dérégulés après exposition aux PUF de FS, selon le schéma d'exposition (aiguë ou répétée) et de la dose (faible ou forte en μg/cm <sup>2</sup> ).....	33

# GLOSSAIRE

ANSES	Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
ARNm	ARN messenger
BPCO	Broncho pneumopathie chronique obstructive
CIRC	Centre international de recherche sur le cancer
CMR	Cancérogène, mutagène et reprotoxique
CrVI	Chrome hexavalent
C <sub>T</sub>	Cycle de réplication seuil
DO	Densité optique
DOHaD	Origine développementale de la santé de des maladies
ERO	Espèces réactives de l'oxygène
ERS	Evaluation du risque sanitaire
FC	Fold-change
FS	Fumées de soudage
GSH	Glutathion réduit
GSSG	Glutathion oxydé
miARN	Micro ARN
NP	Nanoparticules
PCR	Polymerase chain reaction
PF	Particules fines
PM	Matières particulaires
PUF	Particules ultrafines
VLEP	Valeur limite d'exposition professionnelle
VLEP-8h	Valeur limite d'exposition professionnelle sur huit heures
VLEP-CT	Valeur limite d'exposition professionnelle de Court Terme

# INTRODUCTION

## Contexte

Au-delà de l'enjeu économique, la santé et la sécurité au travail (S&ST) sont avant tout un enjeu de santé publique. Selon l'Organisation Internationale du Travail plus de 2,78 millions de personnes décèdent à la suite d'un accident du travail ou d'une maladie professionnelle (1). Outre l'impact des traumatismes et pathologies sur les communautés, le coût pour les entreprises et pour l'économie est considérable. La norme internationale ISO 45001, relative à la S&ST, intégrée à un système de management globale, qualité, environnement fixe un cadre permettant de réduire les risques sur le lieu de travail et améliorer la santé et le bien-être des travailleurs. En plus de ce cadre normatif, il existe un cadre réglementaire strict sur la prévention du risque chimique en milieu professionnel dont les dispositions sont décrites par le Code du travail. Il est aujourd'hui de l'obligation des employeurs d'assurer la santé et la sécurité de leurs employés exposés à des agents chimiques dangereux ou agents cancérogènes, mutagènes et reprotoxique (CMR); ceci par le biais d'une évaluation périodique du risque chimique (article R.4412-5 à R.4412-10). Les règles générales de prévention du risque chimique sont établies par les articles R.4412-1 à R.4412-58 du Code du travail (Décret n°2003-1254 du 23/12/2003). Des mentions particulières sont prescrites dans les articles R.4412-59 à R.4412-93 (Décret n°2001-97 du 01/02/2001) à l'encontre des agents CMR de catégorie 1. Les soudeurs ne dérogent pas à la règle et sont concernés par cette réglementation. Dans leur activité professionnelle, ils sont exposés de façon quasi constante, dans un environnement polluant, à divers agents chimiques, principalement des fumées de soudage (FS) ainsi que d'autres polluants liés aux activités connexes des entreprises concernées : découpe, ponçage, fraisage, meulage ou encore peinture. Tous ces agents créent un environnement polluant qui se doit être maîtrisé pour limiter le risque d'apparition de maladie professionnelle. L'activité de soudage concerne 600 000 salariés en France. Parmi les procédés les plus utilisés à travers le monde nous pouvons citer les procédés de soudage à l'arc électrique avec électrodes fusibles (MIG-MAG : *metal inert gaz-metal active gaz*), électrodes non fusibles (TIG : *tungsten inert gaz*), avec électrodes enrobées (MMA : *manual metal arc*) ou le soudage aluminothermique. Les différents procédés sont référencés selon la norme ISO 4063. Du fait des hautes températures au point de fusion, les différents procédés de soudage émettent des fumées qui peuvent

être inhalées par les soudeurs et les personnes qui travaillent à proximité. Ces fumées sont constituées de gaz et de poussières en proportion variable selon le procédé : la phase gazeuse est composée des gaz protecteurs, des gaz émis lors de la soudure (monoxyde de carbone, ozone, oxydes d'azote...) et des gaz provenant de la dégradation thermique du revêtement présent sur les pièces soudées (phosgène, formaldéhyde, cyanure d'hydrogène...). La phase particulaire est composée de particules métalliques et d'oxydes métalliques en concentrations variables selon le procédé de soudage (oxydes de zinc, de cadmium, de fer, de chrome, de manganèse, de nickel, d'aluminium, de béryllium, de plomb, de cuivre...). Malgré les différences d'exposition, variable dans le temps et l'espace, qu'elles soient directes ou indirectes, les particules de FS demeurent excessives (2). Les particules primaires de FS présentent un diamètre inférieur à 1 µm, voire 0,1µm et cette faible granulométrie se traduit par une bonne pénétration dans le système respiratoire. En théorie la fraction ultrafine des particules (PUF), c'est-à-dire inférieur à 100 nm a un potentiel de pénétration dans l'arbre respiratoire plus important que les fractions fines (PF), de diamètre compris entre 0,1 et 1µm. Ceci est vrai jusqu'à un certain diamètre aérodynamique des PUF. Puisque, en dessous de 20 nm, la fraction déposée au niveau des alvéoles pulmonaires diminue graduellement. Ces particules ont tendance à se déposer au niveau de la région trachéobronchique voire nasopharyngée, à cause de leur coefficient de diffusion très élevée. L'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES) gère depuis 2005, l'organisation de l'expertise scientifique, indépendante, pluridisciplinaire et collective, nécessaire à la fixation des valeurs limites d'exposition professionnelle (VLEP). Les VLEP recommandées par l'ANSES sont des concentrations dans l'air d'une substance chimique que peuvent respirer les travailleurs pendant un temps déterminé, sans entraîner d'effets néfastes pour leur santé. Ceci en l'état des connaissances au moment de l'expertise. Le code du travail définit les VLEP aux agents chimiques (article R. 4412-4). Il dresse la liste des VLEP réglementaires contraignantes (article R. 4412-149) et renvoie à des arrêtés pour les VLEP réglementaires indicatives (article R. 4412-150 et arrêté du 30 Juin 2004 modifié). L'Institut National de Recherche et de Sécurité (INRS) met à disposition la liste des VLEP établies pour des substances chimiques (3). Elle prend en compte les derniers textes parus (décret 2016-344 du 23 mars 2016 et arrêté du 23 mars 2016). L'application de la VLEP s'intègre dans la démarche globale de prévention du risque chimique, en milieu professionnelle pour le personnel exposé à tous agent chimique défini comme tel, figurant

à l'article R.4411-6 ou pouvant présenté un risque pour la santé. Les FS sont considérés, à ce titre, comme un agent chimique à part entière. En France, la VLEP sur huit heures (VLEP-8h) pour la totalité des particules composant les FS est de 5mg/m<sup>3</sup>. Les différents constituants des FS sont également rencontrés dans d'autres activités professionnelles et possèdent individuellement leurs propre VLEP (Annexe 1). La VLEP pour les particules de FS a été définie en 1987 et en l'état des connaissances actuelles sur les FS, elle paraît dorénavant désuète. En effet, en 1990, les FS ont été classées par le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC) dans le groupe 2B, soit considérées comme agent, pouvant être cancérogène pour l'homme (monographie 49). Cependant en 2017, suite à la publication du groupe de travail sur l'évaluation des risques cancérogènes pour l'homme (4), le classement est revu et le CIRC classe les FS dans le groupe 1, agents cancérogènes avérés pour l'homme (monographie 118). Cette publication par le CIRC s'appuie sur une méta-analyse effectuée par le Groupe de travail à partir de 36 études de cohorte et 23 études cas-témoins (5). Elle montre des risque relatifs (RR) à 1.29 (IC à 95% : 1.24–1.34) pour le fait d'avoir été soudeur et 1.27 (IC à 95% : 1.22–1.32) pour celui d'avoir été exposé aux fumées de soudage, avec ajustement sur le tabac et l'amiante. Dans ce contexte les dispositions relatives aux agents CMR s'appliquent pour la prévention du risque chimique chez les soudeurs : éviter le risque, substitution de l'agent, travailler en système clos. Parmi les composants des FS, certains sont classés cancérogènes par le CIRC : Béryllium, Cadmium, Chrome VI et/ou par l'Union Européenne : oxydes de Nickel, rayonnement ionisants alpha (Annexe 2).

## **Epidémiologie des atteintes respiratoires du soudeur**

Compte tenu de l'exposition par voie aérienne, de la granulométrie des particules de FS et de leur capacité à pénétrer dans les poumons, on comprend que les atteintes soient principalement respiratoires. Il faut cependant garder à l'esprit que l'atteinte oculaire et cutanée est possible pour l'activité de soudage et les activités connexes. Les mesures de prévention doivent limiter le risque pour tout type d'exposition. De nombreuses études font état d'une augmentation du risque de développer des atteintes respiratoires chez les soudeurs ou les travailleurs exposés aux FS. Les atteintes de la fonction pulmonaire ont été mises en évidence dans deux cohortes de soudeurs exposés. En montrant des modifications de la fonction basale respiratoire, par spirométrie (6,7), en ajustant les données sur l'indice de masse corporel ou le tabagisme. Les soudeurs ont également

une susceptibilité à développer des maladies respiratoires chroniques : une étude transversale multicentrique (étude RHINE) met en exergue une incidence plus importante de l'asthme chez les soudeurs [hasard ratio (HR) à 1.4, 95% CI 1.04–1.97)], ainsi qu'une sur-incidence de rhinite [HR 1.4, 95% CI 1.3–1.6] (8), de bronchite chronique avec un risque associé au niveau d'exposition (basse/élevée) et à la consommation de tabac [HR respectivement de 1.4, 95% CI 1.1–1.8 (exposition basse); 2.0, 95% CI 1.6–2.7 (exposition élevée) et 2.1, 95% CI 1.8–2.5 (tabagisme)] (9). L'approche Evidence-Based Medicine (EBM) de l'étude suivante met en évidence une association entre l'exposition aux FS et l'apparition de maladies respiratoires obstructives (asthme et BPCO) avec le plus haut niveau de preuve (\*\*) (10). La prévalence de la broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO) augmente d'autant plus selon le niveau d'exposition. Odds ratios à 3,9; 95% CI 1,4–13,3 (exposition moyenne) et 3,8; 95% CI 1,03–16,2 (exposition forte) comparé au groupe faiblement exposé (11). D'autre part l'exposition au FS augmente la susceptibilité aux infections respiratoires (12–14). Les preuves d'association sont moins documentées pour la sidérose (forme de pneumoconiose du soudeur), les surcharges en fer de type hémochromatose secondaire à l'inhalation chronique d'oxyde de fer ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ) (15), ou encore pour la fibrose pulmonaire (16). Malgré la mise en évidence de marqueurs de toxicité cohérents, tels que les modifications histopathologiques du tissu pulmonaire suite à l'exposition aux nanoparticules d'oxydes métalliques (17) ou la présence de macrophages chargés en hémossidérine dans le lavage bronchoalvéolaire d'un patient (18). Si certaines de ces maladies ont un impact, que l'on peut qualifier avec circonspection de modéré, elles pourraient néanmoins être des facteurs de risque d'autres affections réduisant à la fois la qualité de vie des personnes exposées mais surtout leur espérance de vie avec l'apparition notamment de cancer broncho-pulmonaire (5,19–21). Les atteintes liées à la nature des particules peuvent également être extra-respiratoires. Certaines atteintes rénales peuvent être liées à la présence d'oxyde de cadmium ou de plomb ; des atteintes neurologiques liées à la présence de d'oxyde d'aluminium ou de manganèse. Même si les nombreuses études menées permettent de comprendre les impacts de l'exposition par voie inhalée des particules de FS, les effets biologiques de cette toxicité pulmonaire restent peu connus tant l'exposition des soudeurs est complexe. De plus la notion d'exposition professionnelle s'intègre également dans un contexte d'exposition plus global des individus, concept récemment décrit sous le terme d'exposome. Il s'agit de l'étude des expositions au sens large mais spécifique d'un individu ou d'un groupe d'individus.

## **Etudes toxicologiques *in vitro* et *in vivo* sur les fumées de soudage**

Les études épidémiologiques montrent au cours du temps qu'il existe des corrélations entre l'exposition aux FS et l'apparition de pathologies respiratoires. Les déterminants de la toxicité des FS ne sont pas actuellement tous connus. Néanmoins certains effets biologiques sont retrouvés et décrits dans la littérature et participent à la compréhension des mécanismes impliqués dans l'apparition de certaines des pathologies décrites précédemment. Concernant les caractéristiques physiques des particules, celles-ci ont la particularité de former rapidement des chaînes d'agglomérats (22) du fait de la réactivité et de leur potentiel de surface. Le fer, composé majoritaire retrouvé dans la composition des fumées de soudage à l'acier inoxydable ou à l'acier doux, et l'aluminium sont tous deux connus pour entraîner des pathologies de surcharge, les pneumoconioses. D'autres composés métalliques de FS, comme le chrome VI, le cadmium, le béryllium, le cobalt et le nickel sont des agents cancérigènes pulmonaires avérés ou suspectés. Vis-à-vis de la phase nanoparticulaire de FS (particules ayant un diamètre inférieur à 100 nm), les données actuelles sur les effets et modes d'action tendent à montrer l'existence d'effets biologiques au niveau de l'appareil respiratoire avec notamment la production d'un stress oxydant, d'effets pro-inflammatoires, d'effets pro-thrombotiques, de dommage à l'ADN et d'éventuels effets pro-fibrotiques. Plus spécifiquement, concernant les fumées de soudage, il a été montré que les nanoparticules (NP) métalliques identifiées dans des macrophages de poumons de soudeurs (essentiellement oxydes de Fe, Cr, Mn) induisaient *in vitro* la production de cytokines pro-inflammatoire par les macrophages exposés (17). Une étude toxicologique *in vivo* a mis en évidence l'apparition, suite à l'exposition de souris à 50 µg de NP d'oxydes métalliques, le développement d'une fibrose péribronchiolaire, périvasculaire et alvéolaire associées à une inflammation interstitielle (23). La production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) est actuellement considérée comme un élément central des réponses adaptatives ou des événements toxiques induits par les particules fines et ultrafines (24). Plusieurs publications rapportent la génération d'ERO lors de l'exposition aux FS (25–27). La production d'ERO peut être responsable de la formation de cassures de brins d'ADN et de lésions oxydatives de l'ADN (28,29). De plus, le stress oxydant initié par la formation d'ERO déclencherait l'activation de voies de signalisation et de facteurs de transcription nucléaires qui régulent l'expression de gènes impliqués dans de nombreux processus biologiques comme la croissance, l'apoptose, l'inflammation et la réponse au stress.

## Etudes épigénétiques

L'émergence de l'épigénétique, décrite comme l'étude des modifications de l'expression de gènes, sans modification de la séquence ADN (30), s'intègre depuis quelques années à la compréhension des mécanismes impliqués dans les pathologies cancéreuses ou chroniques. Ces modifications résultent de la dérégulation de l'expression des microARN (miARN), des modifications post-traductionnelles des histones ou encore de la méthylation de l'ADN. Ces modifications ont également un potentiel transgénérationnel d'où leur implication également dans le concept émergent de DOHaD (Developmental Origin of Health and Diseases) (31–33) qui recherche l'origine développemental de la santé et des maladies. L'intérêt croissant de l'épigénétique dans l'apparition des maladies est perçu comme un nouveau paradigme dans le développement du cancer (34,35). La régulation de l'expression des gènes est cruciale pour le maintien de l'homéostasie tissulaire ainsi que dans le développement des processus pathologiques. Les microARN (miARN) qui constituent une famille de petits ARN non-codants d'environ 22 pb, jouent un rôle majeur dans le contrôle de l'expression génique. Leurs mécanismes d'action impliquent la formation de complexes avec la partie 3'-non codante d'ARNm cibles (36). Cette interaction conduit à une déstabilisation des ARNm cibles et/ou une inhibition de la synthèse protéique (36). Chaque miARN a la capacité de réguler un large spectre d'ARNm distincts. Plusieurs milliers de miARN ont été caractérisés à ce jour chez l'Homme où ils réguleraient environ 60% des transcrits. Les miARN sont impliqués dans la régulation de quasiment tous les processus biologiques : dans le développement et le maintien des états souches et de différenciation, dans des processus cellulaires comme l'apoptose, la prolifération et la régulation du cycle cellulaire, le métabolisme etc. (37). Pour ces raisons, les miARN ont été étudiés dans de nombreuses maladies dont les maladies respiratoires (38–41). L'implication de miARN dans l'initiation et la progression de la fibrose pulmonaire idiopathique a notamment été montrée dans des travaux effectués par l'équipe de recherche EA4483 (42,43). Le lien entre miARN et cancers est tout particulièrement étudié (44–47). En effet, les miARN interagissent avec les réseaux classiques d'oncogènes et gènes suppresseurs de tumeur, contribuant à l'initiation et à la progression de la plupart des tumeurs malignes. L'analyse de la dérégulation ou de l'altération éventuelle des miARN (sous-expression importante de certains miARN impliqués dans la réponse au stress, l'apoptose, la prolifération ou l'angiogenèse par exemple), suite à une exposition à des facteurs

environnementaux commence aussi à être explorée. Certaines nuisances chimiques de l'environnement professionnel, telles que l'amiante, le benzol[a]pyrène, le benzène, le formaldéhyde, le 4-aminobiphényle, les pesticides ou encore les PM (particule en suspension dans l'air) de façon plus générale sont ainsi mises en lien avec des dérégulations de certains miARN (48–52); nous ne disposons pas de telles données pour les FS. L'intérêt porté à la dérégulation des miARNs s'étend au diagnostic des cancers (53) et une recherche intensive sur l'utilisation des miARN comme cible thérapeutique ou comme marqueurs pronostic, est menée. En complément de l'action des miARN, la méthylation de l'ADN, les modifications post-traductionnelles des histones (e.g. (dé)méthylation et/ou (dés)acétylation des histones), et les variations des activités télomérasiques constituent d'autres mécanismes épigénétiques contrôlant la transcription des gènes. Sotty et al montre des modifications de l'activité enzymatique des histones (acétylase, désacétylase) après exposition à des PUF (air atmosphérique) dans des conditions expérimentales similaires (54). L'étude transversale de Cantone et al met en exergue une augmentation significative des histones diméthylées et acétylées chez les travailleurs exposés à des particules riches en métaux (55). A noter que le stress oxydant joue un rôle dans la diminution des télomères, entre autre, par défaut de réparation des lésions causées à l'ADN, pouvant expliquer l'intérêt porté par certaines équipes à ces modifications épigénétiques. Une étude longitudinale montre en effet l'association significative entre l'exposition cumulée au PM<sub>2,5</sub> (particule de taille comprise entre 1 et 2,5 µm) de FS et la diminution de la taille des télomères (extrémité d'un chromosome) (21). A contrario, l'étude expérimentale *in vivo* (rat Sprague-Dawley) de Shoeb et al ont mis en évidence une augmentation significative de la taille des télomères après exposition à 2,0 mg/rat de PUF, issues de soudure à l'acier inoxydable (29). Encore peu d'équipes s'intéressent aux variations de ces marqueurs sous l'influence des fumées de soudage avec des résultats variables d'où l'intérêt porté également à ces modifications dans le projet global de l'équipe mené sur les FS.

L'impact de l'exposition aux FS sur la santé respiratoire a été démontré (ou suspecté pour certaines pathologies). L'amélioration des connaissances sur les relations entre des caractéristiques physico-chimiques précises des FS (granulométrie, composition chimique, bio accessibilité des particules) et les altérations biologiques mises en évidence sont importante pour comprendre la survenue des pathologies. L'identification d'altérations épigénétiques (dérégulation de miARN, méthylation de l'ADN, modifications

d'histones, etc.) lors de l'exposition aux FS, connues pour avoir également un lien avec la survenue de certaines pathologies décrites chez les soudeurs, serait d'un intérêt incontestable. Ce sont les objectifs principaux de l'étude *in vitro* menée par l'équipe de recherche. Le travail réalisé dans le cadre de ce mémoire de master représente une partie du projet. Il s'intéresse à l'impact de l'exposition des PUF de FS sur l'inflammation, le stress oxydant ainsi que sur l'évaluation de l'expression des gènes et les altérations épigénétiques associées. L'étude de la toxicité pulmonaire des FS employée est cohérente avec les différentes études de toxicologie *in vitro* retrouvées dans la littérature. Elle consiste à exposer, à dose toxique, en interface liquide/liquide des cellules épithéliales bronchique humaines immortalisées (lignée BEAS-2B) à des PUF de FS issues de soudure d'acier inoxydable selon deux schémas d'exposition : aiguë et répétée.

## MATERIELS ET METHODES

### Caractérisation physicochimique des particules de FS

#### Collecte des particules de fumée de soudage :

Les particules de fumées de soudage sont obtenues à l'aide d'un générateur de soudage associé à un système d'aspiration et un impacteur en cascade pour la collecte des particules. La soudure est réalisée selon le procédé « metal inert gas - metal active gas » (MIG-MAG SAF PRO) sous Shield Gaz M21 (82% Argon et 18% de CO<sub>2</sub>) avec un fil d'apport en acier inoxydable (316LSi Ø1 mm : mm avec Fe 50-60%, Cr 10-25%, Ni 10-15%, Mn 1-3%) sur une plaque métallique faite d'acier inox dégraissé. Les FS sont simultanément aspirées avec un débit de 120 m<sup>3</sup>/h (Annexe 3). Les impacteurs (filtres) SIOUTAS munis de 4 supports d'impaction en polycarbonate (PC) 25 mm (porosité 0.8 µm, Whatman®, ServiLab, Le Mans, France) et d'un filtre terminal en PC 37 mm (porosité 0.8 µm, Whatman®). Cet impacteur permet de collecter les particules en fonction de leur diamètre aérodynamique sur 5 étages : < 0.25 µm, 0.25 – 0.50 µm, 0.50 – 1 µm, 1 – 2.5 µm et > 2.5 µm. Débit de prélèvement 9 L/min. Les échantillons de FS collectés ont été extraits aux ultrasons à 500W, 20 KHz (Vibracell™, Sonics & Materials Inc, Newton, Coonecticut, Etats-Unis) en salle blanche d'eau MilliQ. A noter que les tous les dispositifs d'impaction ne sont pas stériles, non graissés, taré avant prélèvement. Les particules collectées sont congelées à -25°C.

#### Dosage des métaux :

Les analyses sont effectuées en triplicats pour trois sous-échantillons de 100 µg de PUF et pour deux dilutions différentes (1/2 et 1/10). Les échantillons de PUF ont été pesés et minéralisés en milieu acide (HNO<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/HF) pour les analyses élémentaires. La composition chimique en métaux est évaluée par dosage par spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif (ICP-AES, Perkin Elmer, Courtaboeuf, France). Cette méthode permet un dosage simultané de nombreux métaux. Trente éléments à l'état de trace et 7 éléments majeurs ont été dosés : (Ag, As, Ba, Be, Bi, Cd, Ce, Co, Cr, Cs, Cu, La, Li, Mn, Mo, Ni, Pb, Pd, Pt, Rb, Sb, Se, Sn, Sr, Th, Ti, Tl, U, V, Zn, Al, Ca, Fe, K, Mg, Na, Si).

### Dosage du chrome hexavalent :

Le dosage du chrome hexavalent (CrVI) est réalisé selon les recommandations pour la biométrie des polluants dans le cadre d'évaluation des risques sanitaires en environnement professionnel, conformément aux dispositions relatives en vigueur. Les prélèvements ont été réalisés dans les mêmes conditions que la collecte, sur cassette Millipore® fermée (CFC) munie d'un filtre en fibres de quartz 37 mm (Whatman QMA lot 9641593) imprégné de sulfate de magnésium et carbonate de sodium, avec un débit de prélèvement de 9 L/min. Les analyses en chrome VI suivant la méthode MétroPol M-43, protocole à une extraction  $-\text{NaOH}+\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) du CrVI total (56). L'analyse est réalisée par chromatographie ionique couplée à un détecteur ultraviolet.

### Dispersion granulométrique des PUF et potentiel zêta :

Le diamètre hydrodynamique des PUF est mesuré directement en suspension dans l'eau milliQ (1,91  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) en utilisant la technologie de diffusion de la lumière dynamique (DLS) avec le Zetasizer® nano ZS (Malvern Instrument, Malvern, Royaume-Uni). Cet appareil permet d'observer la distribution des particules ultrafines en fonction de leur taille grâce à la diffraction de la lumière au contact des particules. Il réalise la mesure de façon dynamique pendant un laps de temps fixé à 2 minutes. La suspension de PUF est passée brièvement aux ultrasons (Sonifier SFX150, Branson Ultrasonics, Danbury, Connecticut, Etats-Unis) : 45W à la fréquence de 40 kHz durant 2 secondes, pour faciliter la séparation des particules et observer les phénomènes d'agrégation en répétant la mesure dans un délai de 5 minutes. La mesure du potentiel zêta est effectuée à température ambiante ( $25^\circ\text{C} \pm 2$ ) pour évaluer le potentiel de répulsion des particules entre elles.

## **Culture cellulaire**

Le modèle cellulaire utilisé pour cette étude in vitro est la lignée de cellules épithéliales bronchiques humaines BEAS-2B (ATCC® CRL-9609™). Les cellules BEAS-2B sont cultivées sur des flasques de 75 cm<sup>2</sup> pré-cotées avec du collagène de type 1, permettant l'adhésion des BEAS-2B prévue à la culture cellulaire, à 37°, sous 5 % de CO<sub>2</sub>, dans un milieu défini sans sérum (LHC-9 medium, Life Technologies, Carlsbad, Californie, États-Unis). Ce milieu est additionné de deux antibiotiques : Pénicilline et Streptomycine, à la concentration de 1% (V/V) dans le milieu. Pour le repiquage des cellules, le protocole fait

intervenir du PBS 1X (Life Technologies) pour le rinçage et de la trypsine (Trypsin-EDTA – Gibco™, Life Technologies) pour permettre une bonne individualisation des cellules afin d'assurer le comptage en cellule de Malassez. Les cellules BEAS-2B sont repiquées à environ 80% de confluence (évaluée au microscope optique) pour maintenir une bonne croissance de celles-ci. Fonction de la vitesse de division des cellules, le repiquage est effectué tous les 3 jours. En dehors des périodes de croissance et expansion cellulaire, la souche BEAS-2B est conservée dans l'azote liquide (-195°C) dans un milieu spécifique pour la cryoconservation : Recovery TM® Cell Culture (Life Technologies). Avant l'exposition des BEAS-2B aux FS, l'intégrité, la morphologie des cellules est vérifiée au microscope optique pour assurer une homogénéité des cultures cellulaires. Pour l'étude de cytotoxicité les BEAS-2B sont cultivées en plaque 96 puits (0,34 cm<sup>2</sup> par puits), pour l'analyse des autres paramètres (stress oxydant, inflammation, transcriptomique, épigénétique) les cultures BEAS-2B sont cultivées en plaque 6 puits (9,6 cm<sup>2</sup> par puits).

## **Analyse de la cytotoxicité**

L'analyse de viabilité cellulaire ou cytotoxicité est réalisée par mesure de l'ATP intracellulaire. La diminution de la production d'ATP par les BEAS-2B en fonction de la concentration de PUF de FS est un marqueur d'effet cytotoxique. La détection de l'ATP se fait par luminescence. Les résultats sont représentés par une courbe sigmoïde décroissante. Cette analyse est réalisée à l'aide du kit CellTiter Glo™ analysis Promega, Madison, Wisconsin, Etats-Unis) et la luminescence est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre SPARK® (TECAN Männedorf, Suisse) après exposition des cellules à des doses croissantes de PUF (exprimée en µg/cm<sup>2</sup>, rapporté à la surface du puit). Deux modes d'exposition sont testés : (1) aiguë, exposition de 24h avec une dose unique de PUF et (2) répétée, trois expositions successives de 24 h. La gamme de concentrations croît de 0,1 µg à 50 µg par cm<sup>2</sup> de tapis cellulaire (0,1; 0,2; 0,5; 1; 2; 5; 10; 20; 50 µg/cm<sup>2</sup>). La réalisation de la gamme de concentrations se fait à partir d'aliqots d'une suspension de PUF dans l'eau ultrapure à la concentration de 1,91 µg/µL. L'analyse est réalisée en octupliquat (n=8) sur une plaque 96-puits sur trois expériences indépendantes. Ce test permettra de sélectionner les 2 doses d'exposition qui seront utilisées ultérieurement afin d'étudier les mécanismes cellulaires et moléculaires de la toxicité des particules de FS ; une première dose équivalant à la DL10 sera choisie, la

deuxième dose correspondant à 6 fois la DL10. La DL10 correspond à la concentration pour laquelle 90% des cellules sont encore viable. Ces doses seront exposées selon le protocole présenté sur la Figure 1 : exposition aiguë (24h) et répétée (3x24h).

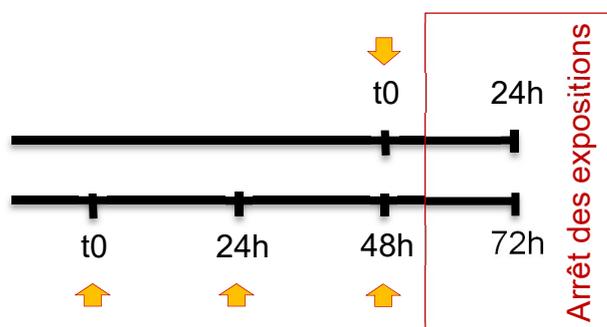


Figure 1 : Schéma du protocole d'exposition pour l'analyse de l'inflammation, du stress oxydant, l'analyse transcriptomique (ARNm) et des altérations épigénétiques (miARN) : exposition aiguë (24h) et exposition répétée (3x24h). 📌 = exposition de PUF aux doses définies respectivement en fonction du schéma d'exposition.

## Dosage des protéines totales

Les résultats d'analyse des cytokines inflammatoires et des protéines carbonylées sont ajustés à la concentration en protéines totale du lysat cellulaire, quantifiée à l'aide du kit Pierce™ BCA Protein Assay kit (ThermoFisher Scientific, Montigny-le-Bretonneux, France). Cette technique utilise une réaction colorimétrique à la longueur d'onde de 562 nm produite par le complexe BCA (acide bicinchoninique)-Cu<sup>1+</sup> obtenu après réaction entre certains acides aminés des protéines et le sulfate de cuivre (Cu<sup>2+</sup>). La réalisation simultanément d'une gamme de calibration (BSA standard) permet de déduire la concentration en protéine des échantillons inconnus. La relation entre la concentration en protéines totales et l'absorbance est non linéaire, saturable et représentée par une hyperbole.

## Analyse de l'inflammation

La sécrétion de huit cytokines inflammatoires dans le surnageant de culture des BEAS-2B exposées est évalué simultanément à l'aide du système MAGPIX® (technologie Luminex®, Merck-Millipore, Guyancourt, France). Cette technique ELISA (enzyme-linked immunoassay) utilise des microparticules (billes) magnétiques fluorescentes, spécifiques et pré-cotées avec des anticorps reconnaissant les analytes d'intérêt à doser : MCP-1 (monocyte chemoattractant protein 1), IL-8 (interleukine 8), IL-1β (interleukine 1β), TNF-α (tumor necrosis factor- α), GRO-α (growth-regulated oncogene-α), GM-CSF

(granulocyte macrophage colony stimulating factor), IL-6 (interleukine 6), CCL5 (chemokine ligand 5 ou RANTES). Les cytokines sont ensuite révélées. Un anticorps spécifique biotinylé (biotine ou vitamine B7) lui-même couplé avec de la streptavidine conjuguée à de la phycoérythrine (PE), La spécificité est liée à la combinaison de la fluorescence par microparticule (spécifique pour chaque analyte) et celle émise par la PE. La gamme de calibration est préparée dans les mêmes conditions, simultanément aux échantillons inconnus, à partir d'un standard compris dans le kit d'analyse. La régression de cette gamme (logistique 4- paramètres) calculée par l'appareil, permet de déduire la concentration des échantillons inconnus (n=30). Les analyses sont réalisées en duplicata. Les concentrations en cytokines dans les différentes conditions d'exposition sont ensuite interprétées en se rapportant à la condition non exposée (NE).

## **Analyse du stress oxydant**

Le stress oxydant induit par les PUF de FS est évalué en mesurant les protéines carbonylées dans le lysat cellulaire des cellules exposées ou en quantifiant les lésions oxydatives de l'ADN de ces cellules (8-hydroxydesoxyguanine, 8OH-dG). La mise en évidence des défenses anti-oxydantes par les cellules BEAS-2B exposées est également évaluée par la détermination du rapport glutathion réduit/oxydé.

### Dosage des protéines carbonylées :

La recherche de protéines carbonylées est effectuée à l'aide du kit OxiSelect™ Protein Carbonyl ELISA (Cell Biolabs Inc, Paris, France). Après les expositions, le tapis cellulaire, est lysé à l'aide d'un tampon RIPA, supplémenté d'inhibiteurs de phosphatases et de protéases. Cette technique ELISA utilise le potentiel de réaction des protéines carbonylées avec le DNPH (dinitrophenylhydrazine). Le produit de la réaction de dérivatisation (DNP-hydrazone protéine) se lie à un anticorps anti-DNP (épitope DNP). L'utilisation d'un anticorps secondaire conjugué à la peroxydase (HRP) permet la révélation de la liaison anti-DNP/DNP-hydrazone protéine. La quantification se fait par comparaison à une gamme d'étalonnage préparée à partir d'un mélange BSA (bovin serum albumine) oxydé/réduit. Le signal d'absorbance (à la longueur d'onde de 450 nm) est proportionnel à la concentration en protéines carbonylées dans le milieu selon une relation linéaire.

### Dosage de la 8-hydroxy-desoxyguanine :

Après exposition, les cellules sont lysées et les ADN extraits selon le protocole du kit QIAamp DNA Mini™ kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). Après extraction les échantillons d'ADN sont quantifiés à l'aide du spectrophotomètre SPARK® (TECAN). Le dosage de la 8-hydroxy-desoxyguanine (8-OHdG) est réalisé à l'aide du kit OxiSelect™ Oxidative DNA Damage ELISA (Cell Biolabs Inc) avec une prise d'essai identique à tous les échantillons de 2,5 µg d'ADN digéré. L'étape préliminaire de digestion de l'ADN sous forme de mononucléotides est réalisée à l'aide d'une nucléase P1 (Fujifilm Wako Chemicals, Neuss, Allemagne) et d'une phosphatase alcaline (PA, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Allemagne) après dénaturation des doubles brins d'ADN par chauffage à 100°C durant 2 minutes. Le dosage est une réaction de compétition inverse. La concentration en 8-OHdG des échantillons d'ADN est inversement proportionnelle au signal d'absorbance à la longueur d'onde de 450nm. La régression non linéaire (courbe sigmoïdale inverse) obtenu à partir de la gamme de calibration permet de déduire les concentrations des échantillons de l'étude.

### Evaluation du statut du glutathion :

Le glutathion total (addition de la forme oxydée et réduite) au sein des cellules BEAS-2B ainsi que le ratio entre ces deux entités apporte des indications sur le statut oxydatif des cellules. Le glutathion oxydé (GSSG) ou réduit (GSH) est évalué dans cette étude par une mesure de luminescence à l'aide du kit GSH/GSSG-Glo™ Assay (Promega). L'analyse s'effectue après exposition, à partir du lysat cellulaire obtenu par précipitation des protéines par l'acide métaphosphorique. La relation entre la concentration en glutathion (réduit ou oxydé) est proportionnelle au signal de luminescence détecté. Cette relation, saturable à forte concentration, est représentée par une hyperbole. Il s'agit d'une mesure simultanée du glutathion total et du glutathion oxydé permettant d'en déduire par soustraction le glutathion réduit. L'activité enzymatique de la glutathion S-transférase, essentielle à la réaction, est active à pH proche de 7. Le pH des échantillons est vérifié après adjonction à l'acide métaphosphorique, de NaOH 1N (dilution au 2/3 des échantillons).

## **Analyses transcriptomiques**

### Extraction des ARN totaux :

Après exposition, les cellules BEAS-2B sont lysées dans 0,7 mL de QIAzol (Qiagen). Les ARN totaux sont ensuite extraits selon le protocole du kit miRNeasy mini™ (Qiagen) qui permet d'extraire en même temps ARNm et miARN. Le protocole d'extraction inclut une étape de digestion à la DNase I permettant l'élimination de toute trace d'ADN génomique résiduel. Les ARNs totaux extraits sont quantifiés à l'aide du spectrophotomètre SPARK® (TECAN).

#### Analyse du profil des ARNm :

Le profil d'expression d'un panel de 672 gènes impliqués dans des voies de signalisations importantes chez l'Homme : les gènes codants pour les voies JAK-STAT, NFκB, Akt, GPCR, cAMP et MAP kinase sont bien représentées. Panel analysé à l'aide d'OpenArrays® avec le système QuantStudio™ 12K Flex équipé du robot AccuFill™ (Applied Biosystems™, Life Technologies). Cette technique consiste à réaliser des RT-PCR quantitatives en temps réel à très haut-débit avec la technologie Taqman® sur des lames pouvant contenir jusqu'à 3072 sondes. Dans un premier temps, les échantillons d'ARN à la concentration fixe de 200ng/μL sont rétrotranscrits en ADNc (ADN complémentaire) à l'aide de l'enzyme Superscript™ IV VILO™ Mastermix (Invitrogen™). L'amplification est ensuite réalisée à l'aide du TaqMan® OpenArray® Real-time MasterMix (Life Technologies) et de lames préconfigurées TaqMan® OpenArray® Human Signal Transduction Panel (Applied Biosystems™,). Cinq lames d'OpenArray® contenant 4 échantillons chacune, sont réalisées. Compte tenu du nombre d'échantillons d'ARN obtenus après exposition (n=30), cette contrainte impose de rassembler les reliquats de l'exposition n°1. A l'exception des échantillons de forte dose en exposition répétée. Au total 20 échantillons sont analysés.

#### Analyse du profil des miARN :

L'analyse de l'expression des microARN est également réalisée par OpenArray®. Dans un premier temps, les miARNs à la concentration de 33,3 ng/μL sont rétro-transcrits en ADNc à l'aide du kit TaqMa® MicroRNA Reverse Transcription (Life Technologies) puis pré-amplifiés à l'aide de TaqMan® PreAmp MasterMix (Life Technologies) et des primers Megaplex™ pool A et B (Life Technologies). L'amplification est réalisée par TaqMan® OpenArray® Real-time MasterMix (Life Technologies). L'expression de 754 miARNs est ensuite quantifiée en utilisant les lames préconfigurées Taqman® OpenArray® Human

miRNA Panel (Applied Biosystems™). Six lames d'OpenArray® contenant 3 échantillons chacune, sont réalisées. Compte tenu du nombre d'échantillon d'ARN obtenus après exposition (n=30), cette contrainte impose de rassembler les reliquats de l'exposition n°1. Au total 18 échantillons sont analysés.

#### Analyse statistique des données de PCR quantitative (qPCR) :

L'analyse statistique est réalisée à l'aide de l'application en ligne (Applied Biosystems™ Relative Quantification, ThermoFisher). Le cycle de réplique seuil ( $C_T$ ) est la pierre angulaire la différence du niveau d'expression. Les ARNm ou les miARN sont mis en évidence lorsqu'ils sont surexprimés ou sous-exprimés significativement, après normalisation par l'expression d'un gène dont l'expression est constante entre les échantillons (gène de ménage), avec une valeur seuil à 1,5 (fold-change ou FC). La comparaison des moyennes du  $C_T$  dans un groupe d'échantillon par rapport au groupe contrôle non exposés permet d'obtenir la p-value : valeur seuil de significativité fixé à 0,05. Le fold-change (facteur multiplicatif de réplique de l'ADN spécifique recherché) et la p-value constituent les deux paramètres permettant la représentation des résultats sous forme de Volcano-Plot, utilisés classiquement en analyse transcriptomique.

### **Analyses statistiques**

En dehors de l'analyse transcriptomique, les résultats sont exprimés en moyenne et écart-type (ET) et analysés avec le logiciel GraphPad Prism v7.00 (GraphPad Software, San Diego, Californie, Etats-Unis). Les analyses statistiques de comparaison entre les multiples groupes sont effectuées par test Kruskal-Wallis, équivaut à une ANOVA non paramétrique dans la mesure où les populations sont supposées non distribuées selon la loi normale N de moyenne zéro et d'écart-type 1. Les analyses statistiques de comparaison de groupe un à un, sont réalisées à l'aide du test de Mann-Whitney U. Le degré de significativité est fixé avec p-value < 0,05. Les régressions des différentes gammes de calibration des dosages par techniques ELISA, linéaires ou non linéaires, sont conformes aux recommandations des fournisseurs. Les résultats obtenus dans les conditions exposées (aux doses prévues et selon le schéma d'exposition) aux particules de fumée de soudage sont rapportés, dans toutes les analyses, à la condition NE.

# RESULTATS

## Caractérisation physicochimique des particules de FS

### Collecte des particules de fumée de soudage :

La campagne de génération des fumées de soudage est réalisée entre le 10 et le 13 septembre 2018, avec pour objectif de collecter la fraction ultrafine (< 250 nm) de fumées de soudage (acier inox). Cinquante-sept cordons de soudure ont permis de collecter à l'aide des impacteurs SIOUTAS 133 mg de particules < 250 nm. La concentration finale des PUF dans l'eau milliQ est de 1,91 µg/µL. Cette solution est répartie en aliquote de 500 µL et congelée à -20°C. Elle est utilisée pour la préparation des suspensions de PUF dans le milieu culture aux concentrations adéquates pour les diverses expositions de BEAS-2B. La concentration moyenne en masse des fumées est de  $40.1 \pm 3.9$  mg/m<sup>3</sup> sur l'ensemble de la collecte. Les concentrations en nombre sont comprises entre 6.6 et  $11.7 \times 10^6$  #/cm<sup>3</sup> sur l'ensemble de la collecte. La fraction < 250 nm représente de manière répétable environ 87% de la quantité collectée pour chaque génération de particules.

### Dosage des métaux :

Les résultats de l'analyse par ICP-AES de la composition des PUF en ETM (éléments traces métalliques) démontre la présence exclusive d'oxydes métalliques. La minéralisation en milieu acide permet de casser les oxydes métalliques produit par la réactivité des métaux au contact de l'oxygène de l'air. La Figure 2 ci-dessous synthétise les treize oxydes représentant 99,5% de la composition des PUF. L'oxyde fer est majoritairement représenté à 37,7% (m/m) ainsi que l'oxyde de chrome (19,1%), l'oxyde manganèse (18,6%) et l'oxyde de nickel (6,2%). Cumulés, ils représentent 81,6% de la composition des PUF de FS. Le dioxyde de silice représente par ailleurs 13,4% (m/m).

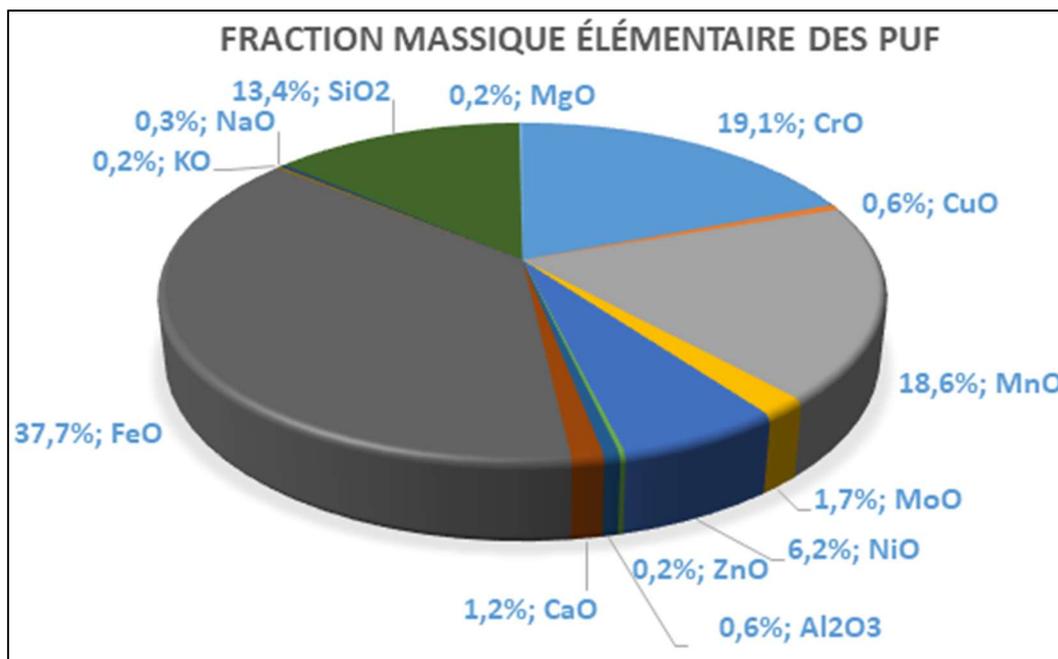


Figure 2 : Représentation graphique de la composition élémentaire relative des PUF de FS (ng/μg). 37 éléments analysés : Ag, As, Ba, Be, Bi, Cd, Ce, Co, Cr, Cs, Cu, La, Li, Mn, Mo, Ni, Pb, Pd, Pt, Rb, Sb, Se, Sn, Sr, Th, Ti, Tl, U, V, Zn, Al, Ca, Fe, K, Mg, Na et Si. Seuls les éléments supérieurs à 1 (ng/μg) sont représentés. Résultats moyens sur trois aliquots indépendants de 100 μg de particules.

#### Dosage du chrome hexavalent :

La quantité moyenne de CrVI retrouvée sur les supports est de 4,3 μg, ceci correspond à une concentration moyenne en CrVI de 160 μg/m<sup>3</sup>. Les résultats complets des concentrations en CrVI, des différentes générations de fumée de soudage sont donnés en Annexe 4. La moyenne est calculée à partir des échantillons respectant strictement les conditions de prélèvement pour le dosage du CrVI total.

#### Dispersion granulométrique des PUF et potentiel zêta :

L'analyse de la distribution des particules de nos échantillons est représentée dans les scattergrammes de la Figure 3. Au-delà de 10 minutes après le passage aux ultrasons, on observe une bonne homogénéité dans la répartition des particules en suspension. La comparaison des deux représentations de la répartition, par nombre et par intensité permet d'évaluer si plusieurs « populations » de particules sont présentes dans la suspension. Ce résultat montre une seule population avec un diamètre moyen (pics de 3 mesures successives) de 1245,7 ± 84,3 nm. Après passage aux ultrasons (45 W à la fréquence de 40 kHz durant 2 secondes), les mesures de répartition des PUF donnent les résultats suivants (Figure 4). Deux mesures à intervalle de 2 minutes sont réalisées (t<sub>0</sub> : Figure 4(a), t<sub>5min</sub> : Figure 4(b)).

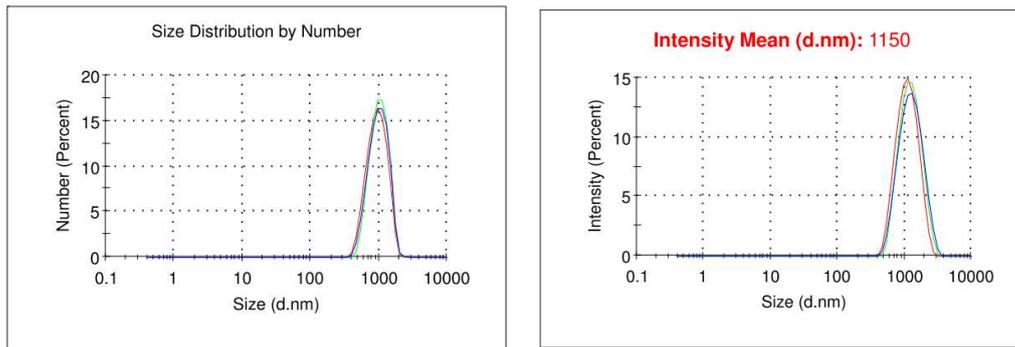
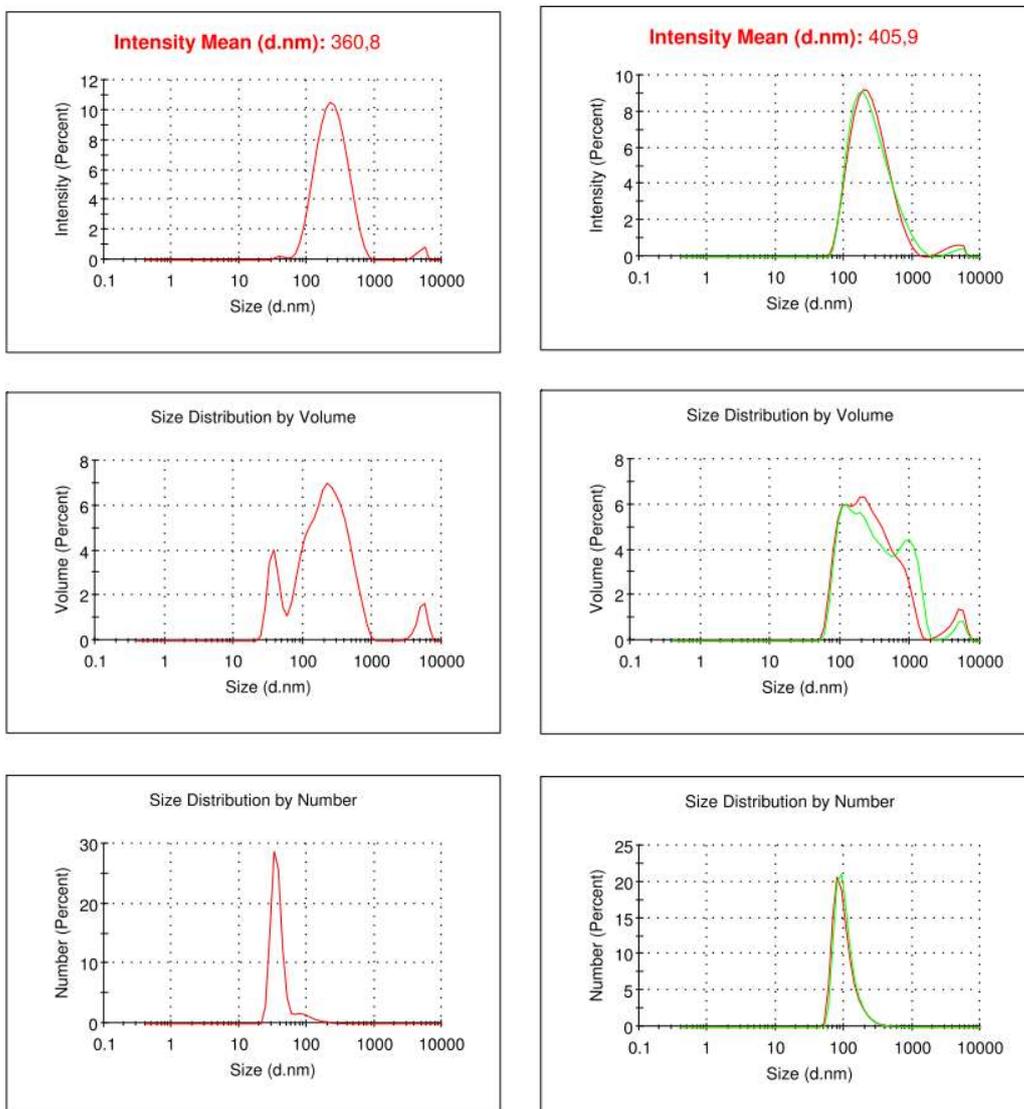


Figure 3 - Scattergrammes de la dispersion moyenne des PUF de FS (a) par nombre et (b) par intensité. Trois analyses successives réalisées au-delà de 10 minutes après passage aux ultrasons.



(a) t0

(b) t+5 minutes

Figure 4 - Scattergrammes de la distribution des PUF de FS en suspension à 1,91 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , après passage au ultrasons (SFX150, Branson 45 W, 40kHz, 2 minutes)(a) A t=0 (b) A t+5 minutes après passage aux ultrasons. Représentation par intensité, par volume et par nombre.

La distribution de la taille des particules diffère par rapport au schéma précédent. En (a) l'intensité de la diffusion dynamique est égale à 360,8 nm, mais sur le graphique par volume on observe distinctement deux populations majoritaires : un premier pic à  $39,5 \pm 8,5$  nm (14,4%), un second à  $263,5 \pm 164,3$  nm (80,7%) avec un épaulement sur la gauche de ce second pic proche de 100nm, et une troisième population minoritaire à  $5075 \pm 835,7$  nm (4,9%). Parallèlement la répartition par nombre montre deux pics : un pic à  $36,5 \pm 8,0$  nm (91,2%) et un second pic à  $111,9 \pm 55,8$  nm (8,8%). En (b) il est intéressant d'observer les modifications rapides de la distribution des PUF ; en témoigne les épaulements successifs en répartition par volume entre 100 et 1000nm par rapport à la mesure précédente. Le scattergramme par nombre montre un décalage sur la droite avec un pic à  $104,4 \pm 52,3$  nm (100%) et une distribution qui « traîne » un peu aux alentours de 200 nm correspondant aux épaulement successifs en volume. Celui par intensité est sensiblement identique à l'analyse précédente.

L'analyse du potentiel zêta rapporte un résultat moyen négatif de  $-13,8 \pm 0,3$  mV pour les PUF en suspension.

## **Cytotoxicité**

L'analyse de viabilité cellulaire a été effectuée en plaque 96-puits, à trois reprises afin de définir le mieux possible la DL10 après exposition aiguë et répétée aux PUF de FS. Le taux de confluence des cellules (vérification au microscope optique) est vérifié avant chaque exposition pour assurer une homogénéité dans les résultats de cytotoxicité. Dans le cas des expositions aiguës, les DL10 déduites par régression non linéaire sont respectivement de 2,99, 1,40 et 0,60  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  pour les trois expositions indépendantes. L'effet cytotoxique en fonction de la concentration est représenté classiquement par une courbe sigmoïdale décroissante. Pour les expositions répétées, les DL10 sont respectivement de 0,09, 0,24 et 0,56  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  sur les trois expérimentations indépendantes. Les résultats sont représentés sur les graphiques de la Figure 5. Les paramètres de régression sont satisfaisants avec  $r^2$  compris entre 0,921 et 0,987 en exposition aiguë et compris entre 0,945 et 0,971 en exposition répétée.

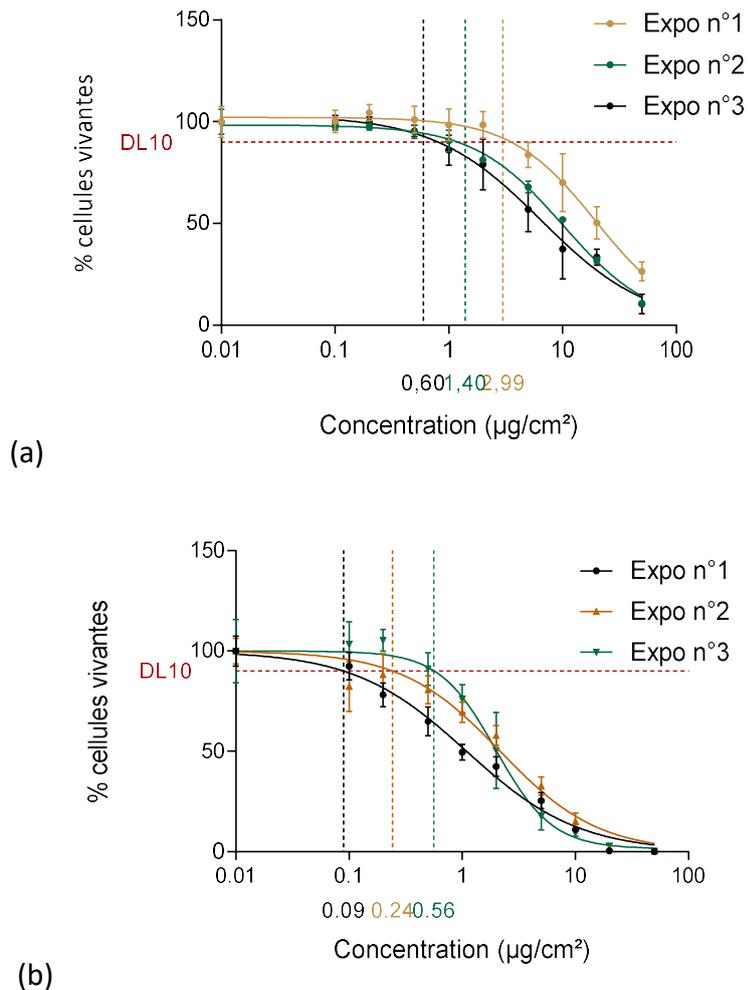


Figure 5 - Représentation graphique des courbes de viabilité cellulaire des 3 expositions indépendantes en fonction de la concentration ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) (a) en exposition aiguë (b) en exposition répétée ( $n=8$  réplicats). Obtenues par un test de cytotoxicité à l'ATP intracellulaire.

Ces données ont ensuite été regroupées pour définir la DL10 moyenne dans le cas des expositions aiguës et répétées au PUF de FS (Figure 6). Les DL10 moyennes sont respectivement de 1,22 et 0,25  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  en expositions aiguës et répétées aux PUF. Les concentrations choisies pour les analyses ultérieures découlent directement de ces résultats. La DL10 est la première concentration utilisée pour chaque condition d'exposition (aiguë ou réitérée). Afin d'avoir une dose commune de PUF entre les deux schémas d'exposition, les doses en exposition aiguë sont fixées à 1,5 et 9  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  et en exposition réitérée à 0,25 et 1,5  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ . La deuxième dose induit, dans les conditions expérimentales précédentes un effet cytotoxique important avec viabilité cellulaire résiduelle d'environ 50%.

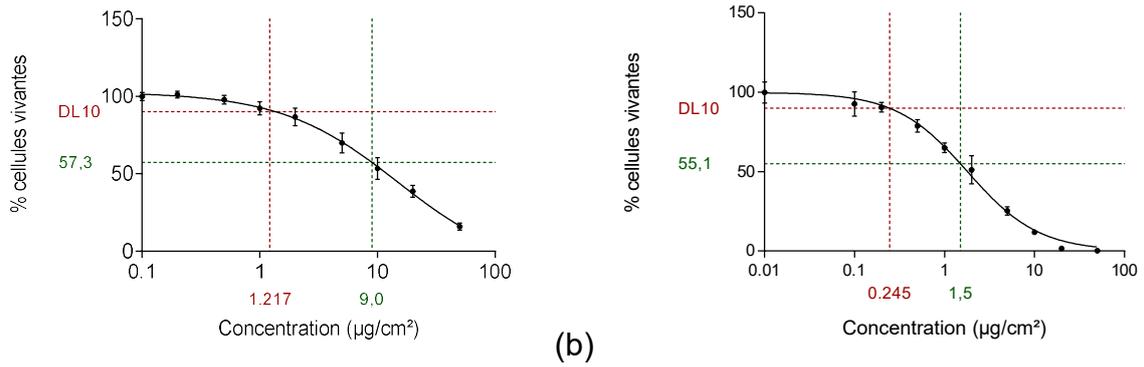


Figure 6 - Représentation graphique de la viabilité cellulaire moyenne des 3 expositions indépendantes, en fonction de la concentration ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ). (a) en exposition aiguë (b) en exposition répétée.

## ANALYSE DE L'INFLAMMATION

De manière générale, les concentrations des huit cytokines recherchées sont détectables dans le surnageant de culture des cellules exposées ou non. Les cytokines IL-1 $\beta$  et TNF- $\alpha$  ont été détectées à très faible concentration. La Figure 7 montre les différences de concentration observées d'une cytokine à l'autre.

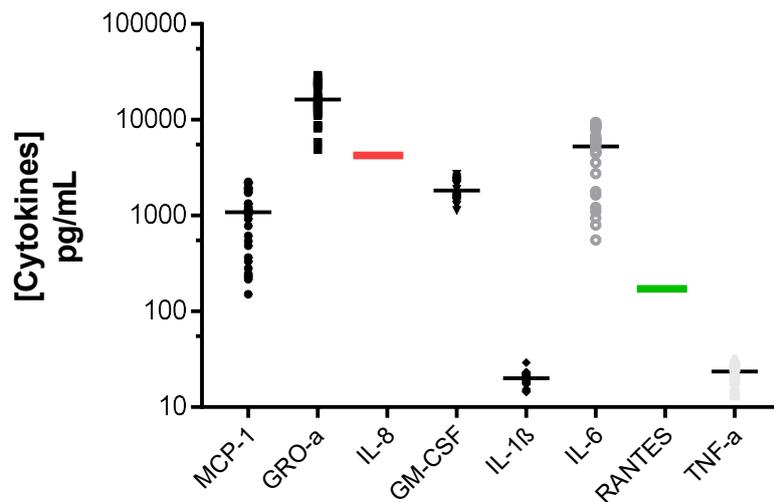


Figure 7 : Plot des concentrations des cytokines (pg/mL) observées à l'issue de l'étude de l'inflammation des BEAS-2B exposée aux PUF de FS. Limite de linéarité d'IL-8 représentée par la barre rouge. Limite de linéarité de RANTES représentée par la barre verte.

Les gammes de calibration et les régressions logistiques 5-paramètres calculées sont, pour chacune des cytokines recherchées, satisfaisantes ( $R^2$  proche de 1). Les niveaux d'expression des cytokines présentés sur la Figure 8 sont exprimés après normalisation des données brutes par ajustement à la concentration en protéines totales des lysats cellulaires de BEAS-2B et comparaison des résultats par rapport à la condition NE.

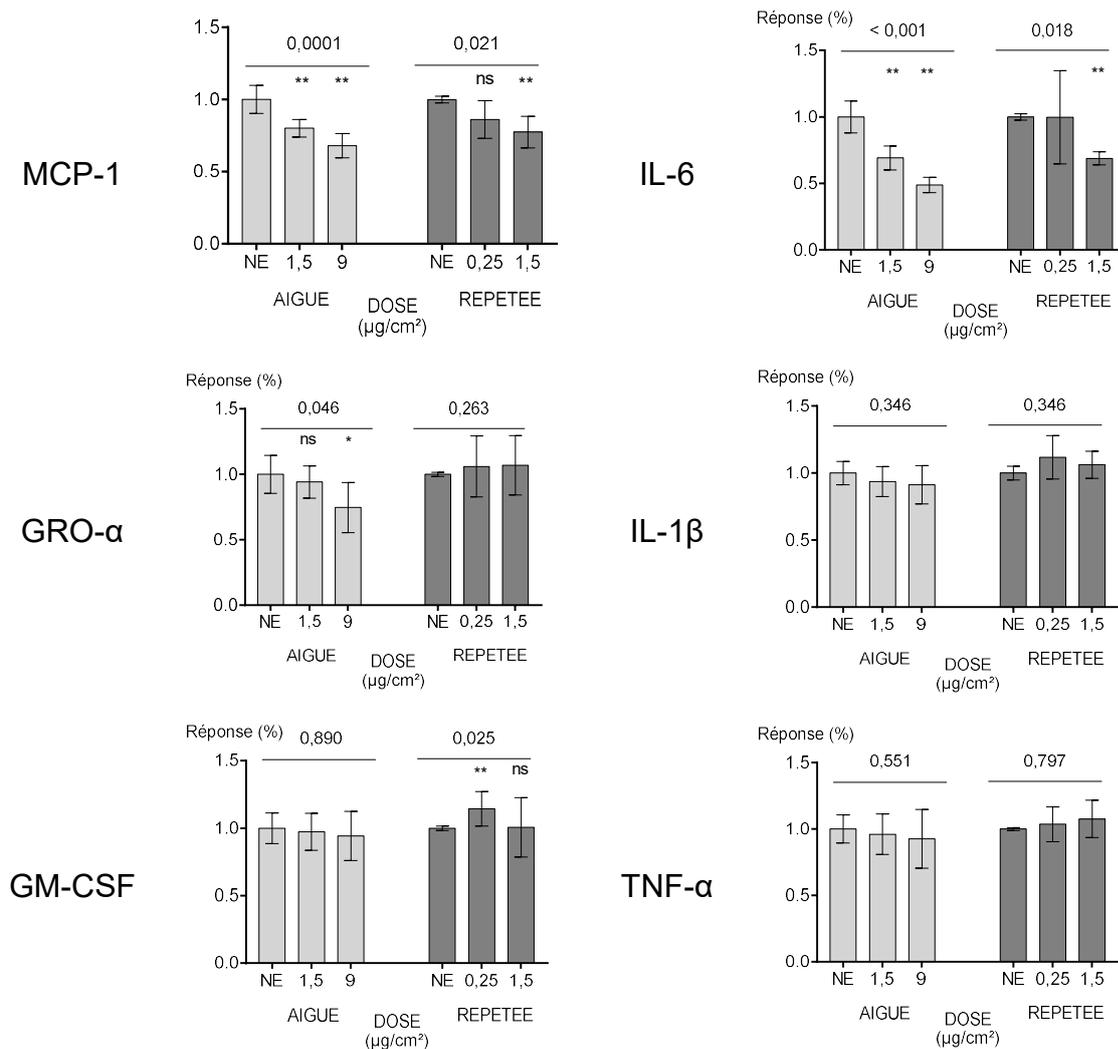


Figure 8 : Expression des cytokines dans les lysats cellulaires selon le schéma d'exposition (aiguë ou répétée) et selon la dose ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ). Les p-values sont représentées par le calcul des moyennes et écart-types ( $n=5$ ). Kruskal-Wallis (ANOVA non paramétriques) pour la comparaison de l'ensemble des groupes et Mann-Whitney (t test non paramétriques ; \*\*\* p-value < 0,001, \*\* : p-value < 0,01, \* : p-value < 0,05, ns : non significatif) pour la comparaison des groupes exposés à la condition NE.

Une diminution significative dans le niveau d'expression de MCP-1 et d'IL-6 dans les deux schémas d'exposition, indépendamment de la dose, est mise en évidence. GRO- $\alpha$  est également en concentration plus faible en exposition aiguë avec une différence marquée à forte dose ( $9 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ). Le test Mann-Whitney comparant au groupe NE corrobore ce résultat : p-value à 0,016 (\*). En exposition répétée aux PUF, la concentration en GRO- $\alpha$  a toutefois tendance à augmentation mais de manière non significative (p-value à 0,263). Pour GM-CSF il existe une différence entre les groupes NE et exposés en condition répétée. Cette fois une tendance à l'augmentation du niveau d'expression à dose faible ( $0,25 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) se dégage : p-value à 0,008 (\*\*). Concernant IL-1 $\beta$  et TNF- $\alpha$  aucune différence significative n'est mise en évidence.

## Analyse du stress oxydant

### Protéines Carbonylées :

Avant de doser les protéines carbonylées dans les cellules BEAS-2B exposées, nous avons préalablement quantifié les protéines totales dans les lysats cellulaires (une gamme de calibration entre 0 et 2000  $\mu\text{g/mL}$  a été réalisée Figure 9).

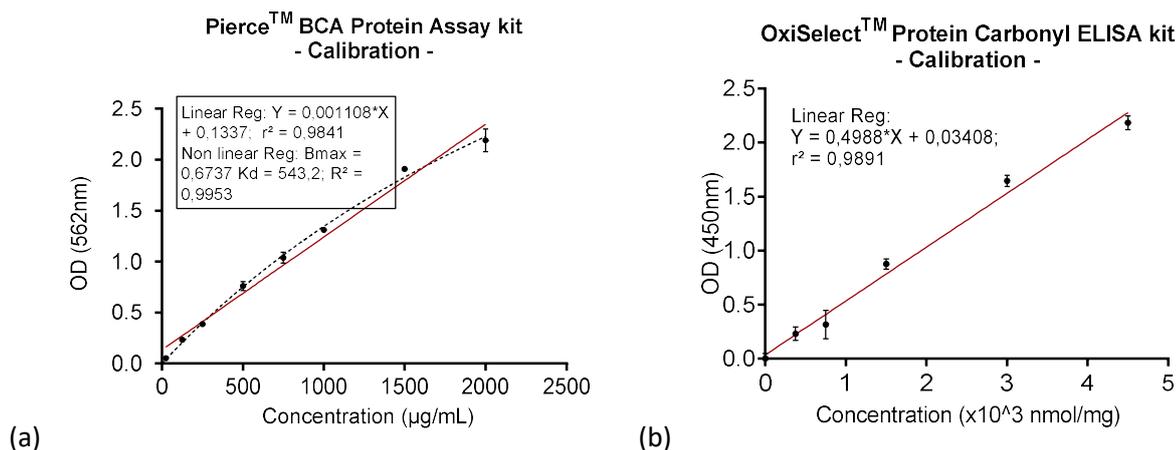


Figure 9 : Courbes de régression de la gamme de calibration pour la quantification des protéines totales ( $\mu\text{g/mL}$ ) (a) et le dosage des protéines carbonylées ( $\text{nmol/mg}$ ) (b)

Comme représenté sur la Figure 9 ci-dessus, la régression (a) non linéaire, hyperbolique, est plus adaptée que la régression linéaire simple ( $R^2$  à 0,9953 vs  $r^2$  à 0,9841). Cette gamme permet d'extrapoler les résultats d'absorbance de nos échantillons pour en déterminer la concentration en protéines totales : en moyenne de 8,06  $\mu\text{g/mL}$  [4,20 – 9,84  $\mu\text{g/mL}$ ]. On note que tous nos échantillons sont bien inclus dans cette gamme. Les résultats obtenus sont reportés dans le tableau en Annexe 5 en tenant compte du facteur cinq de dilution appliqué. La courbe de calibration du dosage des protéines carbonylées est également représentée ci-dessus (b). La relation entre la densité optique (DO) et la concentration en protéines carbonylées est linéaire. Les valeurs de concentration extrapolées en protéines carbonylées des échantillons exposés sont comprises entre 230 et 776  $\text{nmol/mg}$ . Seuls les cinq premiers points de la gamme sont utilisés pour la régression linéaire (soit entre 0 et 4500  $\text{nmol/mg}$ ) afin d'obtenir une bonne extrapolation de la concentration de nos échantillons en gardant une bonne relation linéaire entre la DO mesurée et la concentration ( $\text{nmol/mg}$ ) :  $r^2$  à 0,9891 vs  $r^2$  à 0,9619 en utilisant les 7 points de gamme. Les résultats du dosage des protéines carbonylées sont représentés sur la Figure 10. Après une exposition de 24h aux PUF, on note une augmentation de la quantité de protéines carbonylées qui semble être dose dépendante. Cependant cette

tendance n'est globalement pas significative avec une p-value à 0,182 même si l'augmentation à la dose de 9  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  est près d'être significative avec une p-value à 0,079. Après exposition répétée, aucune différence significative entre les 3 groupes (NE, 0,25 ou 1,5  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) n'est observée.

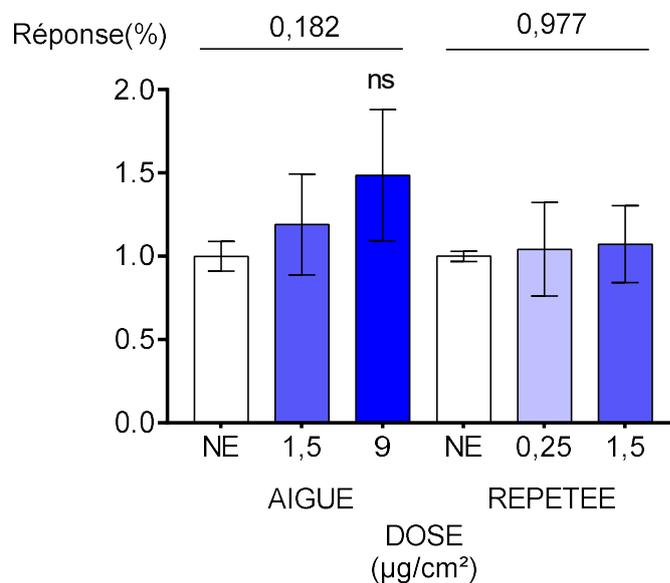


Figure 10 : Représentation de synthèse de protéines carbonylées selon la concentration de PUF et le schéma d'exposition. Les p-values sont représentées par le calcul des moyennes et écart-types ( $n=5$ ). Kruskal-Wallis (ANOVA non paramétriques) pour la comparaison de l'ensemble des groupes et Mann-Whitney (t test non paramétriques : \*\*\* p-value < 0,001, \*\* : p-value < 0,01, \* : p-value < 0,05, ns : non significatif) pour la comparaison des groupes exposées à la condition NE.

Au total, une variabilité relativement importante est observée entre les résultats obtenus pour les trois expositions indépendantes ; les coefficients de variation (CV) pour les expositions aiguës aux doses de 1,5 et 9  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  sont respectivement de 26,0 et 26,4%, ceux pour les expositions répétées sont du même ordre de grandeur (21,6% et 26,9% respectivement).

#### Dosage de la 8-hydroxy-desoxyguanine :

Les résultats du dosage des ADN extraits sont résumés en Annexe 6. S'agissant d'une réaction de compétition inverse la concentration en 8-OHdG des échantillons est inversement proportionnelle à l'intensité de l'absorbance (densité optique) mesurée par l'appareil de détection. Les paramètres de régression (logistique à quatre paramètres appliqué à la technique ELISA) calculés par l'appareil à partir de la gamme de calibration sont satisfaisant avec respectivement  $R^2$  à 0,995. La Figure 11 ci-dessous synthétise les résultats de 8OHdG après exposition aiguë et réitérée. Les tests statistiques non

paramétriques réalisés n'ont pas permis de mettre en évidence d'augmentation significative de la 8OHdG dans les échantillons analysés.

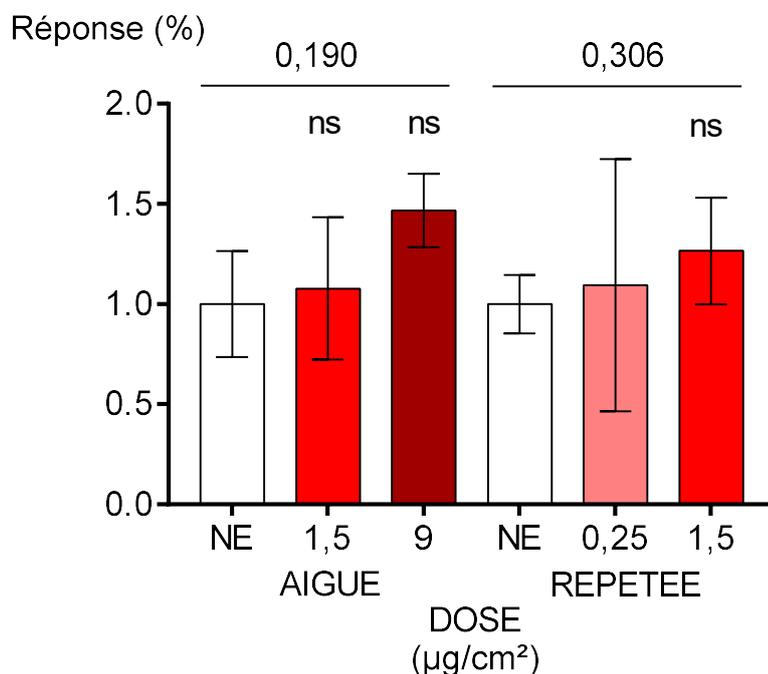


Figure 11 - Représentation de l'analyse de 8OHdG dans les cellules BEAS-2B exposés aux FS. Les p-values sont représentées par le calcul des moyennes et écart-types (n=5). Kruskal-Wallis (ANOVA non paramétriques) pour la comparaison de l'ensemble des groupes et Mann-Whitney (t test non paramétriques ; \*\*\* p-value < 0,001, \*\* : p-value < 0,01, \* : p-value < 0,05, ns : non significatif) pour la comparaison des groupes exposés à la condition NE.

On note cependant une légère tendance, dans les deux schémas d'exposition, à une l'augmentation à forte dose de PUF. Les tests Mann-Whitney entre les groupes NE vs 9 µg/cm² en exposition aiguë et entre les groupes NE vs 1,5 µg/cm² en exposition répétée donne les p-value respectives suivante : 0,114 et 0,167.

#### Evaluation du statut du glutathion :

La quantification du glutathion total, Figure 12, montre un ratio glutathion oxydé (GSSG)/glutathion réduit (GSH) significativement supérieur dans les cellules exposées de manière aiguë par rapport aux cellules contrôles (NE). Ce ratio est 2,08 fois plus élevé dans les cellules exposées à la faible dose de PUF de FS (1,5 µg/cm²) ; le différentiel atteint 12,62 dans les cellules exposées à la forte dose (9 µg/cm²). En ce qui concerne les expositions répétées, l'augmentation du ratio GSSG/GSH est plus modérée ; elle n'est significative (p-value à 0,008) que pour les cellules exposées à la forte dose (1,5 µg/cm²) et atteint un différentiel de 3,08.

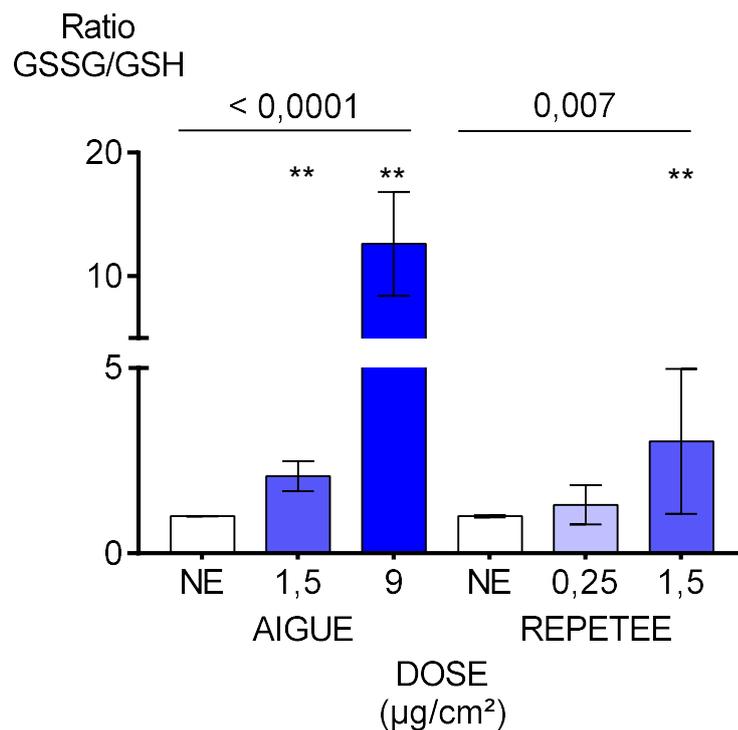


Figure 12 : Représentation du ratio Glutathion oxydé sur Glutathion réduit en fonction de la dose ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) et du schéma d'exposition (aiguë et répétée). Les p-values sont représentées par le calcul des moyennes et écart-types ( $n=5$ ). Kruskal-Wallis (ANOVA non paramétriques) pour la comparaison de l'ensemble des groupes et Mann-Whitney (t test non paramétriques ; \*\*\* p-value < 0,001, \*\* : p-value < 0,01, \* : p-value < 0,05, ns : non significatif) pour la comparaison des groupes exposés à la condition NE.

## Analyse transcriptomique

### Analyse visuelle des OpenArray® (ARN et miARN) :

Les concentrations des différents ARN extraits sont résumées en Annexe 6. La quantité d'ARN utilisée pour la réalisation des qPCR est identique entre les échantillons. Préalablement au traitement des données issues, il est nécessaire de contrôler visuellement les OpenArrays à la fin de chaque run afin de vérifier l'existence éventuelle d'anomalies de dépôt des échantillons, de scellage ou de pré-chargement (présence des sondes fluorescentes) des lames qui pourraient fausser l'interprétation des résultats. Cela s'effectue par une analyse des photographies des lames d'OpenArray prises automatiquement par le thermocycleur avant et après les cycles d'amplification. Les deux exemples ci-dessous (Figure 13) montrent : (a) un défaut de dépôt d'échantillon sur la lame d'OpenArray aboutissant à une absence de réaction et d'amplification concernant le gène TCF7L dans l'échantillon NE de l'exposition n°1; (b) la présence d'une impureté fluorescente (poussière) au niveau du puits correspondant au gène PRKCA susceptible de créer un résultat faussement positif. Une vérification de l'ensemble des lames

d'OpenArray® a permis de s'affranchir de 50 erreurs potentielles d'interprétation des résultats de PCR. Comme le nombre de réaction de PCR réalisées sur l'ensemble de l'analyse est de 25774, les erreurs aléatoires observées représentent seulement 0,19% des réactions d'amplification.

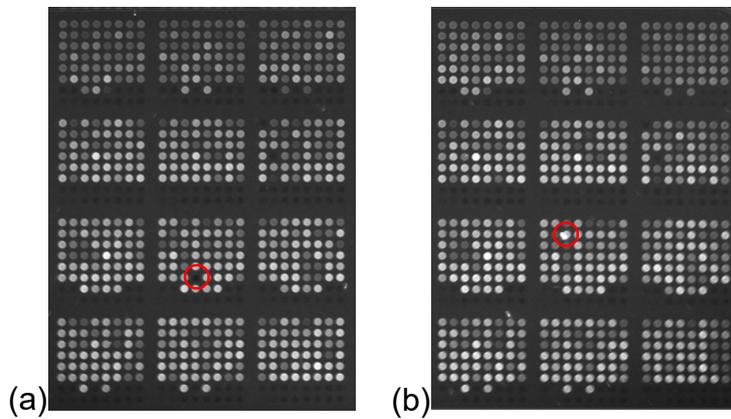


Figure 13 : Exemple d'erreurs analytiques aléatoires observées sur l'image de la lame OpenArray® AZK11 à la fin de 40 cycles d'amplification. (a) Défaut de remplissage en position C2f4 (TCF7L), échantillon de l'exposition aiguë n°1 en condition NE (b) Impureté en position C11b3 (PRKCA), échantillon de l'exposition aiguë n°2 en condition NE.

Un contrôle des courbes d'amplification éditées par le système QuantStudio 12K Flex complète les vérifications préalables à l'interprétation des données. La Figure 14 montre l'identification d'artéfacts d'amplification mis en évidence, a posteriori, par la photo prise en début de cycle montrant une zone floutée sur l'OpenArray.

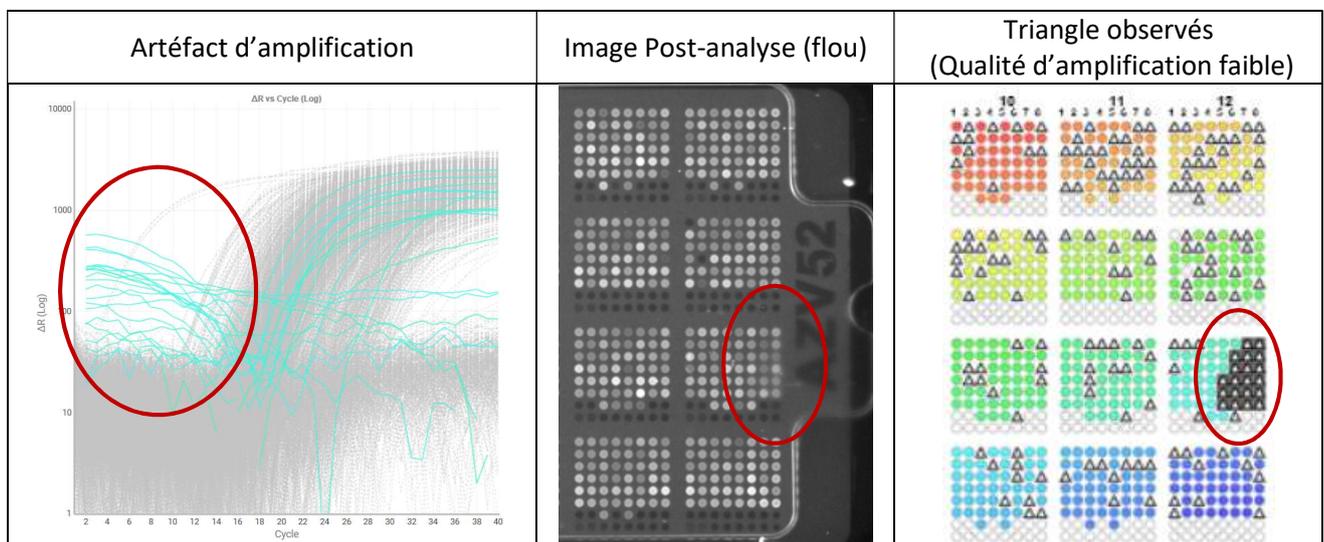


Figure 14 : Artéfacts d'amplification mis en évidence à l'aide du logiciel intégré ThermoFisher (Cloud) et éclairés par l'image prise en début du cycle d'amplification montrant une zone floutée anormale (cercle rouge). Lame OpenArray® AZV52 au niveau de l'échantillon de l'exposition répétée n°1 en condition NE.

Ces artéfacts pouvant influencer l'interprétation des résultats les données correspondantes aux puits impactés ont été omises de l'analyse.

## Analyse des données transcriptomiques (ARN et miARN) :

Les différentiels d'expression entre les groupes exposés et les groupes contrôles non exposés sont définis par un fold-change (FC). Nous avons considéré comme dérégulés les gènes présentant un  $FC \geq 1,5$  avec une p-value fixée à 0,05. Les résultats tiennent compte du score d'amplification pour chaque PCR fixé à 1,24 selon les recommandations du fournisseur. A titre d'exemple, la Figure 15 ci-dessous montre les courbes d'amplification de l'ADNc du gène *PDK1* pour les échantillons exposés de manière répétée à forte dose ( $1,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) et les échantillons contrôles NE. La moyenne des cycles seuils (nombre de cycles d'amplification nécessaires pour générer un signal qui atteint une valeur seuil de fluorescence significativement différente du bruit de fond) pour le groupe « exposé » atteint 19,3 contre 21,3 pour le groupe contrôle, témoignant d'une surexpression du gène *PDK1* dans le groupe exposé.

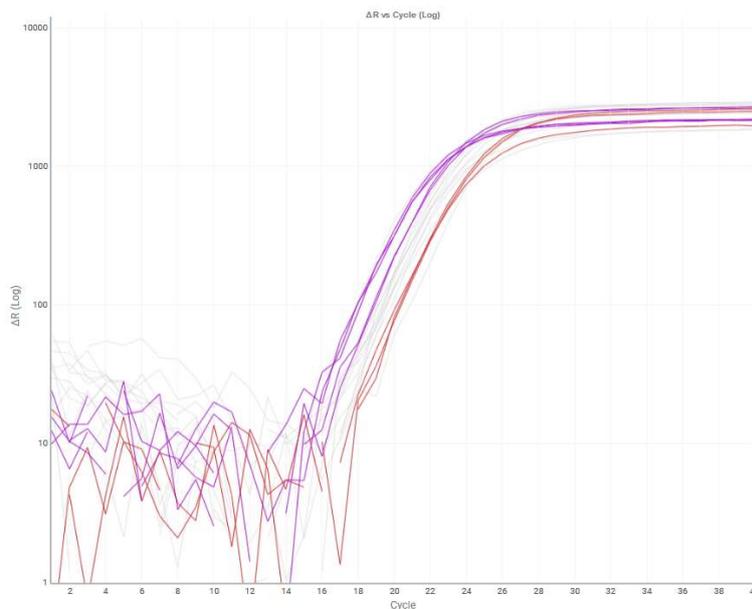


Figure 15 : Courbes d'amplification (RT-PCR) de *PDK1* entre le groupe exposé à forte dose ( $1,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) en exposition répétée (violet,  $C_T$  moyen à 19,3) et le groupe contrôle NE (rouge,  $C_T$  moyen à 21,3). Fold-Change à 3,059 et p-value à 0,002.

Ces calculs sont effectués pour chaque cible (ARNm ou miARN), dans chaque condition et permettent d'obtenir des résultats statistiques représentés sous forme de Volcano-plot, du type de celui présenté sur la Figure 16 (un plot pour une cible). Le nombre et la nature des cibles significativement dérégulées sont respectivement représentés dans la Figure 17 et le Tableau 1.

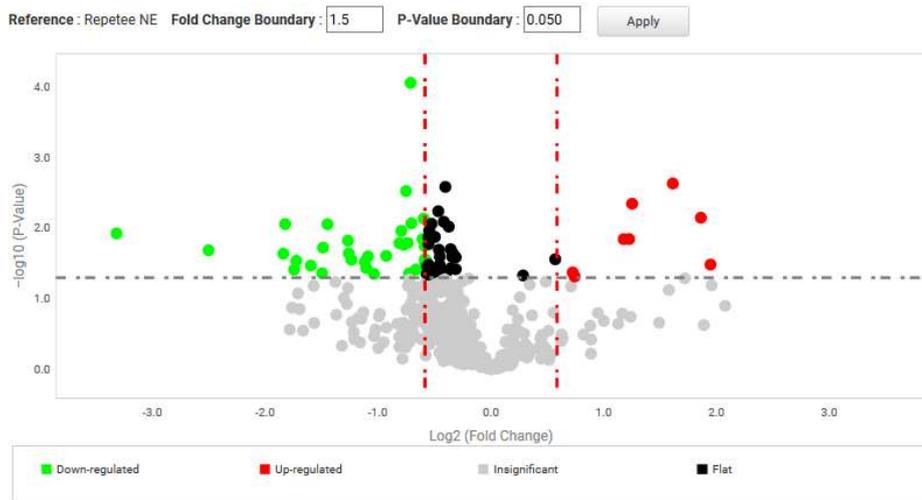


Figure 16 : Exemple de Volcano-Plot des ARNm surexprimés (rouge) et sous-exprimés (vert) dans les cellules exposées de manière répétée à forte dose de PUF de FS (1,5 µg/cm<sup>2</sup>) par rapport aux cellules contrôles. P-value fixée à 0,05 (en ordonnée) et fold-change à 1,5 (en abscisse).

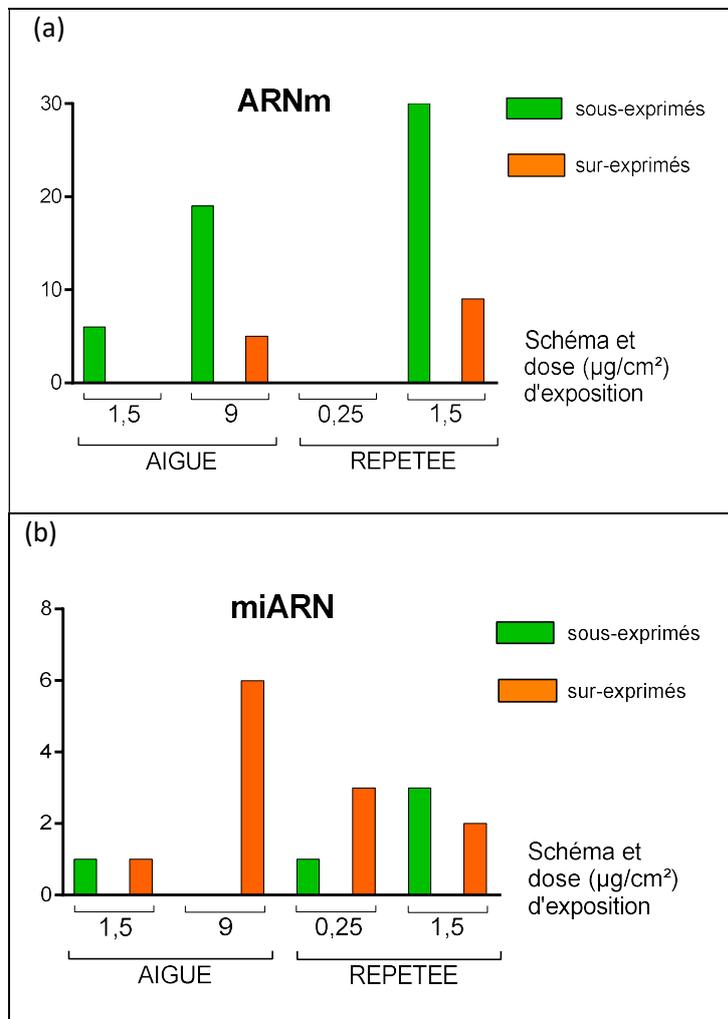


Figure 17 : Représentation du nombre d'ARNm (a) et de miARN (b) dérégulés selon le type d'exposition (aiguë ou répétée) et selon la dose (faible ou forte).

Globalement, on observe que le nombre d'ARNm dérégulés à la dose de 1,5 µg/cm<sup>2</sup> est supérieur en condition d'exposition répétée qu'en condition d'exposition aiguë :

respectivement 30 vs 6 gènes sous-exprimés et 9 vs 0 gènes surexprimés. STAT5A l'ARNm entre ces deux expositions. En exposition aiguë, la forte dose induit un nombre d'ARNm dérégulés (sous-exprimés et surexprimés) supérieur à la faible dose : 24 gènes vs 6 gènes, là aussi certains ARNm sont communs : RHEB et HSPD1, MTOR et CDK4 sous exprimés. MTOR et CDK4 également communs à l'exposition répétée forte dose. En condition à forte dose, l'exposition répétée induit un nombre d'ARNm dérégulés (sous-exprimés et surexprimés) supérieur à l'exposition aiguë : LEF1, HMBS, BCL2, PENK et JAK2 sous exprimés et PDK1 surexprimés sont communs. Quelles que soient les conditions d'exposition, le nombre de gènes sous-exprimés est supérieur au nombre de gènes surexprimés. Concernant l'expression des miARN à l'issue des différentes expositions, leur dérégulation est moins importante que celle des ARNm ; au maximum 6 miARN sont surexprimés après 24h d'exposition des BEAS-2B à 9 µg/cm<sup>2</sup> de PUF de FS. A l'exception de hsa-miR-210-3p, aucun de ces miARN ne sont communs aux autres conditions d'expositions.

La mise en évidence des mécanismes moléculaires et cellulaires liés à la toxicité des FS a porté dans un premier temps sur l'analyse des ARNm dérégulés communément dans les différentes conditions d'exposition (Tableau 1 ci-dessous). Par la suite, afin de mettre en lien les miARN et les ARNm dérégulés après exposition aux FS et ainsi d'identifier des cibles potentielles de ces miARN, nous avons croisé, pour chaque miARN différentiellement exprimé, la liste des ARNm dérégulés dans les mêmes conditions d'exposition avec des bases de données provenant de 3 algorithmes de prédiction de cibles des miARN : miRDB (<http://mirdb.org>, Saint Louis, Missouri, Etats-Unis), TargetScanHuman v7.2 ([http://www.targetscan.org/vert\\_72/](http://www.targetscan.org/vert_72/), Cambridge, Massachussetts, Etats-Unis) et DIANA TOOLS microT-CDS v5.0 ([http://diana.imis.athena-innovation.gr/DianaTools/index.php?r=MicroT\\_CDS/index](http://diana.imis.athena-innovation.gr/DianaTools/index.php?r=MicroT_CDS/index), Thessaly, Grèce). Les résultats obtenus sont représentés sous forme d'un diagramme de Venn (Bioinformatics & Evolutionary Genomics, Gent, Belgique). A titre d'exemple, concernant le miARN hsa-miR-744-3p significativement surexprimé après exposition répétée à forte dose, la Figure 18 ci-dessous montre un ARNm commun aux 3 bases de données et nos données transcriptomiques (MEF2C) et huit ARNm communs (NKD1, BCL2, CDK4, TLR6, LEF1, LPAR2, ADORA1 et CALCRL) entre la base TargetScan et la liste des ARNm sous-exprimés dans les mêmes conditions d'exposition.

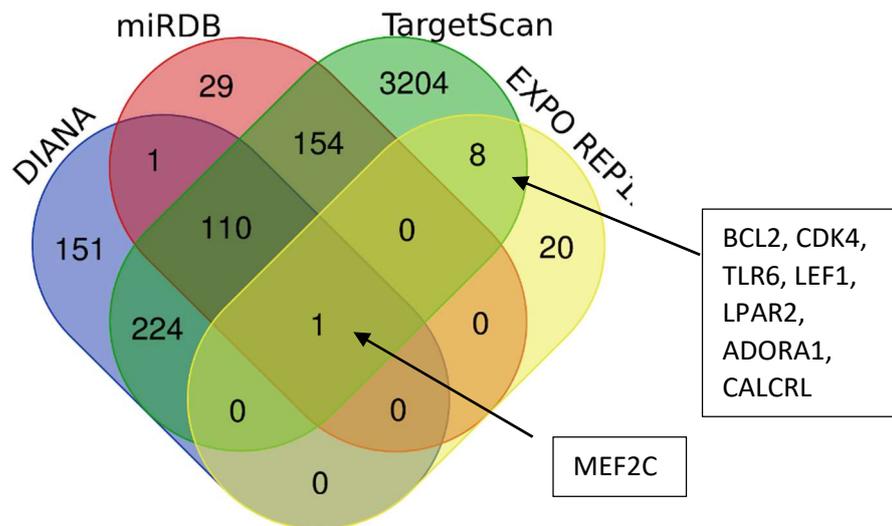


Figure 18 : Diagramme de Venn des cibles potentielles de hsa-miR-744-3p à partir des 3 bases de données : miRDB, TargetScan et DIANA et les ARNm sous-exprimés (analyse transcriptomique) en condition d'exposition répétée à dose forte (1,5 µg/cm²).

Le même type d'analyse ont été réalisées pour l'ensemble des miARN surexprimés (Annexe 7).

Schéma et dose ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) d'exposition												
AIGUË				REPETEE								
1,5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$		9 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$		0,25 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$		1,5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$						
Down ↓	Up ↑	Down ↓	Up ↑	Down ↓	Up ↑	Down ↓	Up ↑	Up ↑				
<b>STAT5A</b> ; <b>REHB</b> ; <b>MTOR</b> ; SMAD4; <b>CDK4</b> ; <b>HSPD1</b>  <u>6 gènes</u>		<b>LEF1</b> ; <b>BCL2</b> ; <b>MTOR</b> ; <b>PENK</b> ; <b>HMBS</b> ; NCAM1; <b>JAK2</b> ; TCF7; PP3CA; <b>REHB</b> ; MAP3K7; RASA1; <b>HSPD1</b> ; AREG; <b>CDK4</b> ; IKBKG; PPARG; CASP1; MYD88  <u>19 gènes</u>		HMOX1; FOSB; MAP4K1; MYC; <b>PDK1</b>  <u>5 gènes</u>				WNT5B; <b>BCL2</b> ; GALR2; <b>PENK</b> ; ODC1; TLR6; <b>LEF1</b> ; IL12A; MEF2C; CALCRL; ADORA1; GATA3; SOXS2; NKD1; HSPA5; INHA; CDKN2A; MAP4K1; KSR1; <b>CDK4</b> ; <b>JAK2</b> ; SLC44A2; WISP3; LPAR2; <b>STAT5A</b> ; CCNB1; TLR4; <b>MTOR</b> ; <b>HMBS</b> ; MAPKAPK3  <u>30 gènes</u>			GYS1; ENO2; HK2; <b>PDK1</b> ; CSF2; FZD8; CCL20; GAPDH; IL8  <u>9 gènes</u>	
miARN		hsa-miR-92a-3p	hsa-miR-424-5p		hsa-miR-625-5p; hsa-miR-212-3p; hsa-miR-1248; <b>hsa-miR-210-3p</b> ; hsa-miR-597-5p; hsa-miR-1260a	hsa-miR-548b-3p	<b>hsa-miR-210-3p</b> ; hsa-miR-1274b; hsa-miR-494-3p	hsa-miR-1233; hsa-miR-378a-5p; hsa-miR-339-3p	hsa-miR-744-3p; hsa-miR-766-3p			

Tableau 1 : Synthèse des ARNm et miARN dérégulés après exposition aux PUF de FS, selon le schéma d'exposition (aiguë ou répétée) et de la dose (faible ou forte en  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ). Résultats extraits du Cloud (ThermoFisher) avec fold-change à 1,5 et p-value à 0,05. Mise en évidence par couleur des ARNm, significativement dérégulés, communs entre les deux expositions aiguës et l'exposition répétée à dose forte à l'issue de l'analyse transcriptomique.



## DISCUSSION

Afin d'évaluer la toxicité *in vitro* des FS, nous avons collecté, à l'aide d'un système d'aspiration et d'un impacteur en cascade, la fraction particulaire ultrafine générée par un banc de soudage automatisé utilisant un procédé MIG-MAG avec un fil d'apport en acier inoxydable sur une plaque d'acier inoxydable. La quantité de PUF produite, environ 40,1 mg/m<sup>3</sup>, est au-delà de celle à laquelle un soudeur pourrait être exposé compte tenu de la réglementation en vigueur (VLEP à 5 mg/m<sup>3</sup>), mais il s'agit d'un banc expérimental, difficilement transposable à l'individu dans des conditions de travail. A titre de comparaison, l'étude d'exposition contrôlée à des FS menée par Graczyk *et al.* a mesuré, pour les particules de diamètre inférieur à 4 µm, une concentration moyenne de 0,72 mg/m<sup>3</sup> [0,25 et 2,29]. Néanmoins dans cette étude le procédé de soudage utilisé est le TIG (tungsten inert gas) qui produit moins de particules que le procédé MIG-MAG, bien plus émissif. Les PUF de FS que nous avons recueillies sont principalement constituées d'oxydes de métaux du fait de la réactivité des particules métalliques produites avec l'oxygène de l'air. L'objectif étant d'étudier la toxicité associée aux métaux, les conditions de production des PUF garantissent une absence de substances secondaires (graisses, peintures constituant les pièces à souder par exemple). Les résultats de l'analyse élémentaire des particules réalisée par ICP-AES concordent avec ce qui est décrit dans la littérature. Le Fer (Fe), le Manganèse (Mn), le Chrome (Cr) et le Nickel (Ni) sont les éléments principaux retrouvés, dans des proportions similaires, dans les FS analysées par Leonard *et al.* (25,29). Toutefois, ces études ne mentionnent pas la présence de dioxyde de silice (SiO<sub>2</sub>) dans l'acier inoxydable mais dans l'acier doux en faible proportion (2,75%). Les dioxydes de silice sont responsables de complications respiratoires (57). L'analyse de la spéciation du Cr dans les PUF que nous avons collectées a permis de déterminer une concentration moyenne en chrome VI (hexavalent) de 160 mg/m<sup>3</sup> équivalente avec ce qui avait été précédemment obtenu pour des particules générées par un banc de soudage selon le même procédé. Cette concentration mesurée dans des conditions expérimentales de génération de FS est difficilement transposable aux conditions réelles de soudage. En milieu professionnel, les mesures de CrVI sont effectuées dans les conditions d'exposition du travailleur au niveau de la zone de respiration de celui-ci. L'analyse de la dispersion granulométrique des PUF a mis en évidence un phénomène d'agrégation des particules au cours du temps. Cinq minutes après sonication, la population majoritaire des PUF passe d'une taille moyenne de 36,5

$\pm 8,0$  nm à  $104,4 \pm 53,2$  nm, avec une intensité de réfraction lumineuse inchangée pour l'ensemble des PUF. Cela laisse supposer qu'à leur émission, les particules de FS sont majoritairement inférieures à 100 nm puis s'agrègent progressivement au cours du temps. Cette hypothèse est également rapportée dans une étude précédente qui suggère que les particules de diamètre inférieur à 50 nm sont émises à proximité de l'arc de soudure (2). Concernant l'analyse du potentiel zêta, la valeur obtenue de  $-13,8 \pm 0,3$  mV correspond à un potentiel de répulsion modéré entre les particules. Au-delà de 30 mV (en valeur absolue), les particules résistent à l'agrégation (58). Cette mesure est en accord avec les résultats de dispersion granulométrique des PUF de FS.

Le modèle BEAS-2B utilisé dans ce projet présente un profil d'expression des enzymes du métabolisme des xénobiotiques proche de celui observé dans les cellules épithéliales bronchiques humaines *in vivo* (59). Des travaux récents réalisés avec la lignée BEAS-2B pour évaluer, la cytotoxicité des nanoparticules de tungsten, leur impact génotoxique, leurs effets sur le stress oxydant (statut du glutathion) ou sur les altérations épigénétiques (méthylation de l'ADN), confirment que ce modèle cellulaire est adapté à notre étude (60). D'autres travaux sur la toxicité de particules environnementales (61) ou de la fumée de cigarette (62) démontrent aussi que les cellules BEAS-2B sont adaptées à l'étude du stress oxydant par cytométrie en flux ou par mesure de marqueurs tels que le malondialdéhyde, le 4-hydroxyhydroxy-2-nonenal (4-HNE), le statut en glutathion (oxydé/réduit) et la 8-hydroxydesoxyguanine (8-OHdG). Après exposition à des particules de FS, les BEAS-2B ont montré également un intérêt dans l'évaluation de la susceptibilité aux infections à pneumocoque (63). Enfin, le modèle BEAS-2B a été utilisé pour étudier les processus de tumorigénèse, associés à l'exposition au chrome hexavalent (64).

Les analyses de la cytotoxicité induite par les PUF de FS ont permis de déterminer une DL10 de  $1,22 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  en exposition aiguë de 24 h et de  $0,25 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  en exposition répétée de 3 x 24 h. A titre de comparaison, la DL10 calculée suite à l'exposition de modèles cellulaires d'épithélium bronchique à des fractions particulaires ultrafines de la pollution atmosphérique était de  $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  (54). Nos résultats suggèrent que les PUF de FS ont un potentiel de réactivité plus important que les PUF de l'air ambiant, ce qui pourrait traduire un risque de toxicité accru. Après exposition de macrophages (RAW264.7) pendant 24h aux particules issues de soudures à l'acier inoxydable, une perte de viabilité de 20% a été observée pour une concentration particulaire de  $6,25 \mu\text{g}/\text{mL}$  (27), soit pour une concentration près de 5 fois moins importante que celle que nous avons mesurée dans

notre étude pour un même temps d'exposition (DL20 de 3,1 µg/cm<sup>2</sup> ou 29,4 µg/mL). Cette différence pourrait être expliquée par le modèle cellulaire utilisé (RAW264.7 vs BEAS-2B) ou le procédé de soudure utilisé pour générer les FS (MMA vs MAG). Dans une étude précédente, 50% des macrophages en culture primaire étaient encore viables après une exposition de 24h aux particules de FS issues de soudure à l'acier inoxydable à la concentration de 25 µg/mL (65). De nombreuses études *in vitro* rapportent des expositions de modèles cellulaires à des concentrations importantes de contaminants pour étayer les déterminants de toxicité associée à ces expositions. Néanmoins, les doses utilisées reflètent moins les conditions réelles d'exposition, d'autant plus s'agissant d'expositions professionnelles pour lesquelles la réglementation en vigueur impose des valeurs limites d'exposition. Avec les expérimentations menées jusqu'à ce jour, les résultats ne nous permettent néanmoins pas de conclure sur la représentativité des doses d'exposition choisies.

La recherche des cytokines pro-inflammatoires dans le lysat cellulaire des cellules exposées permet d'avoir un aperçu de la mise en place des mécanismes cellulaires associés à l'immunité innée. Le système immunitaire inné, orchestré par plusieurs types cellulaires dont les cellules épithéliales bronchiques, est sollicité, lorsque notre organisme perçoit des stimuli étrangers, pour sécréter, entre autres, des cytokines pro-inflammatoires ayant différentes fonctions : recrutement d'autres cellules de l'immunité par effet chimiotactique, réduction ou amplification de la réaction inflammatoire. Dans cette étude, l'analyse de l'inflammation apporte des résultats inattendus avec une diminution significative de la sécrétion de certaines cytokines, notamment MCP-1 (ou CCL2) et IL-6 quelles que soient les conditions d'exposition ou encore GRO-α (ou CXCL1) en condition d'exposition aiguë à forte dose. On note également une augmentation significative de la sécrétion de GM-CSF en condition d'exposition répétée à dose faible ; à forte dose, l'augmentation observée n'est pas significative du fait d'une trop grande variabilité de réponse. Ces résultats sont néanmoins à confronter avec ceux rapportés dans la littérature. Dans une étude menée par Andujar *et al.*, l'exposition de macrophage en culture primaire, pendant 24 h à des doses élevées (25 µg/cm<sup>2</sup>) de NP manufacturées d'oxydes métalliques induit l'augmentation significative des cytokines pro-inflammatoires IL-1β, TNF-α, MCP-1 et IL-6 dans 18 des 20 conditions expérimentales testées (définies par le type de NP et la dose). A la dose de 5µg/cm<sup>2</sup>, les résultats obtenus par les auteurs sont plus nuancés, significatifs dans seulement 4 des 20 des conditions

testées (17). Une autre étude met en évidence une augmentation des cytokines IL-1 $\beta$ , IL-8 ou IL-6 dans des extraits tissulaires pulmonaires de rat Sprague-Dawley exposés respectivement pendant 24 h, un jour, une, deux et quatre semaines à 50 mg/m<sup>3</sup> de particules issues d'acier inoxydable (28). Une étude comparative entre des oxydes métalliques manufacturés (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, NiO, SiO<sub>2</sub> ou TiO<sub>2</sub>) et des PM<sub>2,5</sub> issues de poussières de sol, suggère que les nanoparticules n'ont pas plus de potentiel d'induction d'IL-6 et IL-8 après exposition de cellules BEAS-2B (66). Les auteurs évoquent la possibilité d'artéfacts et d'interactions non biologiques entre les cytokines sécrétées et la surface importante des particules ultrafines. Cette hypothèse pourrait expliquer la difficulté d'obtenir des résultats cohérents lorsque l'on veut quantifier des cytokines après exposition à des NP. Dans le cadre de notre étude, les résultats de la mesure de la sécrétion des cytokines ne permettent pas de mettre en évidence l'instauration d'une réponse inflammatoire dans les cellules 24 h ou 72 h après exposition à des PUF de FS. La sécrétion des cytokines est processus dynamique et variable au cours du temps. Il est dès lors possible qu'aux temps d'exposition considérés, les cellules soient déjà dans une phase d'adaptation pour atténuer une inflammation qui se serait installée plus précocement. Une étude cinétique de mesure des cytokines avec des temps d'exposition plus courts pourrait apporter des éléments complémentaires à la compréhension des mécanismes inflammatoires induits suite à l'exposition des cellules épithéliales pulmonaires aux PUF de FS.

Le stress oxydant qui pourrait résulter de l'exposition aux PUF de FS a été évalué, dans un premier temps, par la mesure de lésions oxydatives de protéines et de l'ADN produites directement ou indirectement par les espèces réactives de l'oxygène (ERO), à savoir les protéines carbonylées et la 8-OHDG, respectivement. Malgré l'absence de significativité, la production de protéines carbonylées tend à augmenter de façon dose-dépendante dans le cadre des expositions aiguës. Ce résultat est d'ailleurs superposable à celui obtenu par la mesure de la 8-OHDG dans les mêmes conditions d'exposition. L'étude de Krishnaraj *et al.* a mis en évidence chez des rats la présence de 8-OHDG dans le sérum après 24 h d'exposition à des FS d'acier inoxydable à la concentration de 50 mg/m<sup>3</sup> (28). La présence significative de 8-OHDG a également été mise en évidence dans le plasma d'individus après 3 jours d'exposition contrôlée (26). Dans le cadre des expositions répétées de notre étude, les tendances à l'augmentation des protéines carbonylées et de la 8-OHDG sont plus limitées. Ces résultats pourraient traduire la mise

en place d'un phénomène adaptatif des cellules exposées pour lutter contre le stress oxydatif. La mesure du statut glutathion oxydé/réduit corrobore ces résultats et la capacité des PUF de FS à induire des lésions oxydatives. En effet, nous avons observé une augmentation significative du rapport GSSG/GSH particulièrement en expositions aiguës et en expositions répétées à forte dose (1,5 µg/cm<sup>2</sup>), traduisant la mise en place de systèmes antioxydants pour limiter les lésions oxydatives et autres effets nocifs induits par les ERO. Le stress oxydant est une réaction précoce dans la réponse cellulaire aux agressions chimiques de l'environnement. L'étude de Fidan *et al.* montre, chez le soudeur, une concentration en GSH significativement diminuée (67). Comme pour la sécrétion des cytokines, il est possible que les temps d'exposition considérés soient trop longs pour observer les effets maximums du stress oxydant. Une étude cinétique de mesure des lésions oxydatives à des temps d'exposition plus courts est envisagée pour confirmer cette hypothèse.

Les analyses transcriptomiques effectuées ont révélé que les différents protocoles d'exposition des cellules BEAS-2B aux PUF de FS induisaient au total la dérégulation d'une soixantaine de gènes impliqués dans la transduction du signal et d'une quinzaine de miARN dont les ARNm cibles et la fonction ne sont pas toujours connus, le nombre de gènes dont l'expression est modulée croissant avec la dose d'exposition. Certains des transcrits dérégulés (ARNm et/ou miARN) sont communs entre les différents protocoles d'exposition aux PUF de FS. Par ailleurs la dérégulation de différents ARNm pourrait être secondaire à celle de miARN. Afin de mettre en lumière les mécanismes moléculaires et cellulaires utiles à la compréhension de la toxicité des PUF de FS, nous avons cherché à identifier les voies de signalisation affectées par l'exposition à ces aérocontaminants.

*Prolifération cellulaire et apoptose :* En expositions aiguës ainsi qu'en condition d'exposition répétée à forte dose, deux ARNm sous-exprimés sont communs : MTOR et CDK4. *MTOR* est un gène codant pour une enzyme (mTOR, mechanistic target of rapamycine) impliquée, d'une part, dans le métabolisme cellulaire (impliquant les lipides, les nucléotides et les protéines), la croissance cellulaire, le contrôle de la survie et de la prolifération cellulaire et, d'autre part, dans différents processus pathologiques (68). En amont, mTOR répond à différents stimuli : des facteurs de croissance, des cytokines mais aussi des lésions de l'ADN. La voie de signalisation mTOR fait intervenir de nombreux acteurs dont RHEB ou PDK1, deux ARNm dérégulés en exposition aiguë à forte dose. PDK1 est également retrouvé surexprimé en condition d'expositions répétées à forte

dose. L'activation de la voie mTOR par PDK1 et RHEB fait intervenir des réactions enzymatiques de phosphorylation de régulation. On peut supposer qu'après exposition aux PUF de FS, cette voie de signalisation soit activée. Néanmoins il est difficile de savoir vers quel type de mécanismes secondaires (prolifération, autophagie, métabolisme, ...) ces acteurs communs s'orientent. *CDK4* (cyclin dependent kinase) est un gène codant pour une enzyme formant un complexe avec CDK6 : Cdk4/6. Il est également impliqué dans la croissance et la mort cellulaire, en tant que checkpoint de contrôle du cycle cellulaire. En absence de stimuli défavorables, comme la réponse au stress cellulaire, les dommages à l'ADN ou l'activation de certains facteurs de croissance (TGF- $\beta$  par exemple), Cdk4/6 induit la progression du cycle de la phase G1 en phase S durant laquelle se produit la réplication de l'ADN. Dans cette cascade de signalisation d'autres acteurs sont impliqués : SMAD4 (mothers against decapentaplegic homolog 4, Smad4) ou MYC (Myc), respectivement sous-exprimés en condition d'exposition aiguë à faible dose et surexprimé en condition d'exposition aiguë à forte dose. SMAD4 formant un dimère avec SMAD3, est cible du facteur de croissance TGF- $\beta$  et induit l'inhibition de cdk4/6 bloquant ainsi le cycle cellulaire. En parallèle, l'analyse entre ARNm et miR a permis de montrer que CDK4 et SMAD4 pouvaient être des cibles potentielles de hsa-miR-424-5p surexprimé à l'issue de l'exposition aiguë à faible dose. Une étude récente, suggère que la surexpression de hsa-miR-424-5p dérégule négativement l'expression de la protéine SMAD3 induisant une prolifération cellulaire (69). Une étude de Xie *et al.* suggère le potentiel anti-oncogénique de miR-424-5p en induisant un arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M, mécanisme dépendant de la cyclin dependant kinase 1 (CDK1) (70). L'implication de ce miARN et des différents acteurs de cette voie de signalisation serait intéressante à explorer a posteriori pour améliorer la compréhension de la toxicité des PUF de FS. *MYC* est gène codant pour un facteur de transcription (Myc) régulateur positif de la croissance cellulaire et également décrit comme un proto-oncogène. Le fait que Myc et Cdk4, deux acteurs facilitant la progression du cycle cellulaire, soient dérégulés de manière opposée pour les mêmes conditions d'exposition (Myc est surexprimé et Cdk4 est sous exprimé après exposition aiguë à forte dose) semble contradictoire. Le processus de régulation du cycle cellulaire dans le cadre des expositions aiguës pourrait être induit par des lésions de l'ADN. Compte tenu des résultats obtenus en exposition aiguë pour le dosage de la 8-OHdG, il serait intéressant d'explorer par western blot l'expression de protéines impliquées dans le cycle cellulaire et associées aux dommages de l'ADN comme ATM, p53 et p21. Certaines autres voies

de signalisation d'apoptose, de prolifération cellulaire ou de régulation du cycle cellulaire peuvent être évoquées en observant les transcrits (ARNm) dérégulés après exposition aux PUF de FS. C'est en particulier le cas du gène *LEF1* (Lymphoid enhancer-binding factor 1) codant pour un facteur de transcription induit par la voie de signalisation WNT/ $\beta$ -catenin et jouant un rôle dans le maintien de l'homéostasie cellulaire (prolifération, différenciation). *LEF1* est impliqué dans le processus de cancérogénèse (71). Il est sous-exprimé dans notre analyse au même titre que *NKD1*, gène codant pour un second messenger (Naked-1) également impliqué dans la voie WNT/ $\beta$ -catenin. D'un point de vue globale, la sous-expression de ces 2 gènes tend à réduire la différenciation cellulaire. Les travaux de Guan *et al.* mettent en évidence la relation entre la voie WNT/ $\beta$ -catenin et hsa-miR-744-3p qui dérégulerait préférentiellement *NKD1* et induirait la prolifération cellulaire (72). Notre analyse transcriptomique montre une surexpression de miR-744-3p, il serait intéressant d'étudier, dans la suite de ce projet, son impact sur la modulation des gènes *NKD1* et *LEF1*. Le gène *CCNB1*, sous exprimé après exposition répétée à forte dose, code pour la protéine cyclinB1 impliquée spécifiquement dans le processus de mitose en intervenant dans la phase G2 du cycle de division cellulaire, point de contrôle important vis-à-vis des dommages causés à l'ADN. Ce mécanisme a été décrit après exposition de la lignée A549 à des NP de dioxyde de titane (73). Le schéma en Annexe 8 illustre brièvement certaines des hypothèses discutées.

Systeme immunitaire et inflammation : *HSPD1* est le gène codant pour Hsp60 (heat shock protein), protéine décrite dans certains processus inflammatoires associés à la voie de signalisation TLR (Toll-Like Receptor) dépendante de MYD88 (myeloid differentiation primary response 88). Les récepteurs TLR sont présents à la surface des cellules immunitaires (macrophages, polynucléaires, lymphocytes B, lymphocytes T) mais également à la surface de cellules en contact avec l'environnement comme les cellules épithéliales bronchiques. Nos analyses transcriptomiques ont mis en évidence différents acteurs de cette voie. En effet, comme *HSPD1*, *MYD88* est également sous-exprimé dans les mêmes conditions d'exposition. Afin de conforter l'hypothèse de l'implication de cette voie de signalisation, *TLR6* et *TLR4*, correspondant aux gènes codants pour les récepteurs TLR6 et TLR4, sont sous-exprimés après exposition répétée à forte dose. L'activation des récepteurs TLR induit la sécrétion de différentes cytokines pro-inflammatoires, à la suite d'une cascade de signalisation impliquant NF- $\kappa$ B. NF- $\kappa$ B est un facteur de transcription nucléaire inhibé par un complexe protéique incluant une sous-unité IKK- $\gamma$  (ou NEMO) codée par le gène *IKBKG*, significativement sous-exprimé après exposition

aiguë à forte dose dans notre analyse. Le système immunitaire est également orchestré à travers la voie de signalisation JAK/STAT, induite en amont par un récepteur de cytokines. Cette voie active les protéines STAT (signal transducer and activator of transcription) qui se lient à l'ADN pour permettre la transcription de gènes impliqués dans la division, la survie, l'activation et le recrutement des cellules immunitaires. Dans notre analyse les transcrits de *STAT5* et *JAK2* sont sous-exprimés après exposition répétée à forte dose. *STAT5*, préférentiellement induit en amont par GM-CSF, participe au recrutement des globules blancs sanguins. GM-CSF également appelé CSF2 (colony stimulating factor 2) est surexprimé après exposition dans les mêmes conditions d'exposition. Les dérégulations associées aux mécanismes impliqués dans l'immunité, comme discuté ci-dessus avec la voie de signalisation TLR et JAK/STAT, pourraient également être intéressantes à explorer pour améliorer la compréhension de la susceptibilité aux infections décrite chez les soudeurs (63). Stress oxydant : HMOX est un gène codant pour l'hème oxygénase, protéine impliquée dans la réduction du stress oxydant. Décrit comme un marqueur de stress oxydant dans plusieurs études de toxicité comme, par exemple, après exposition de cellules épithéliales à du nitrate d'argent (74), après exposition de macrophages à des particules atmosphériques PM<sub>2,5</sub> (75) ou après exposition de cellules BEAS-2B à des solvants organiques (76). L'implication de HMOX dans la réduction du stress oxydatif a été démontrée dans un modèle de fibroblastes issus de souris déficientes pour ce gène, exposées au cadmium (77). Dans notre étude HMOX1 est surexprimé après exposition aiguë à dose forte. Le stress oxydant induit en principe la transcription de ce gène. Compte tenu de l'ensemble des résultats obtenus en expositions aiguës concernant le stress oxydant, notamment le statut du glutathion, l'hypothèse d'un excès de lésion oxydative et de l'implication importante des mécanismes d'adaptation des cellules BEAS-2B corrobore surexpression observée du gène HMOX1. L'approfondissement des mécanismes liés au stress oxydant pourrait être intéressant pour la suite de ce projet.

## CONCLUSION

En application d'une méthodologie expérimentale éprouvée pour appréhender les mécanismes de toxicité induits par l'exposition à des contaminants, l'étude menée in vitro, en amont d'un projet plus global, répond aux objectifs fixés. Inévitablement, la composition des PUF de FS en oxydes métalliques, la présence d'agents cancérigènes et la dispersion granulométrique dépendent du processus de soudage utilisé et les effets toxiques observés y sont liés. Notre étude conforte l'effet cytotoxique des PUF de FS. L'induction d'un stress oxydant précoce, par la présence de lésions oxydatives et l'augmentation significative du glutathion oxydé, en exposition aiguë témoignent d'un potentiel oxydant avéré. La mise en place des mécanismes cellulaires adaptatifs est probable et doit être explorée de manière plus approfondie. Des expérimentations devront être renouvelées pour mieux comprendre la dynamique de la réponse inflammatoire après exposition des cellules épithéliales pulmonaires. L'analyse des transcrits ARNm et miARN dérégulés après exposition apporte une perspective complémentaire dans la compréhension des mécanismes moléculaires et cellulaires d'action toxique des FS. La mise en évidence, dans cette étude, de gènes dérégulés codants pour des protéines impliquées dans des voies de signalisation responsables des effets toxiques observés témoigne de l'intérêt porté aux analyses transcriptomiques. La mise en évidence d'associations entre les dérégulations d'ARNm et de miARN appuie l'intérêt de poursuivre l'évaluation des altérations épigénétiques induites par les FS. Cette étude toxicologique in vitro devrait se poursuivre par la validation fonctionnelle des mécanismes cellulaires réactionnels mis en évidence, et par l'identification de protéines ou de marqueurs spécifiques liés aux modifications cellulaires et épigénétiques observées. Ces travaux complémentaires seront réalisés par des techniques de Western-blot, ELISA et cytométrie en flux. Des travaux collaboratifs sont également envisagés pour mesurer les effets génotoxiques des FS à l'aide de tests des comètes (altérations primaires de l'ADN) et du micronoyau (aberrations chromosomiques). A plus long terme, la toxicité de l'exposition chronique aux FS sera évaluée sur un modèle murin afin de rechercher des biomarqueurs non invasifs d'effets qui pourraient être ultérieurement validés dans une population d'ouvriers exposés.

## BIBLIOGRAPHIE

1. Organisation Internationale de Normalisation. ISO 45001 - Santé et sécurité au travail [Internet]. 2018. Disponible sur: [https://www.iso.org/files/live/sites/isoorg/files/store/fr/PUB100427\\_fr.pdf](https://www.iso.org/files/live/sites/isoorg/files/store/fr/PUB100427_fr.pdf)
2. Cena LG, Chen BT, Keane MJ. Evolution of Welding-Fume Aerosols with Time and Distance from the Source. *Weld J*. 2016;95:280-5.
3. INRS\_Institut Nationale de Recherche et de Sécurité. VLEP en France\_Mise à jour de Septembre 2018 [Internet]. 2018. Disponible sur: <http://www.inrs.fr/media.html?refINRS=outil65>
4. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, International Agency for Research on Cancer. Welding, molybdenum trioxide, and indium tin oxide [Internet]. 2018. Disponible sur: <http://publications.iarc.fr/569>
5. Guha N, Honaryar MK, Lunn RM, Luce D, Ahrens W, Stayner L, et al. 0341 Welding fumes and lung cancer: a meta-analysis by iarc working group. In BMJ Publishing Group Ltd; 2017. Disponible sur: <http://oem.bmj.com/lookup/doi/10.1136/oemed-2017-104636.279>
6. Thaon I, Demange V, Herin F, Touranchet A, Paris C. Increased Lung Function Decline in Blue-collar Workers Exposed to Welding Fumes. *Chest*. 2012;142(1):192-9.
7. Szram J, Schofield SJ, Cosgrove MP, Cullinan P. Welding, longitudinal lung function decline and chronic respiratory symptoms: a systematic review of cohort studies. *Eur Respir J*. 2013;42(5):1186-93.
8. Storaas T, Zock J-P, Morano AE, Holm M, Björnsson E, Forsberg B, et al. Incidence of rhinitis and asthma related to welding in Northern Europe. *Eur Respir J*. 2015;46(5):1290-7.
9. Holm M, Kim J-L, Lillienberg L, Storaas T, Jögi R, Svanes C, et al. Incidence and prevalence of chronic bronchitis: impact of smoking and welding. The RHINE study. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2012;16(4):553-7.
10. Baur X, Bakehe P, Vellguth H. Bronchial asthma and COPD due to irritants in the workplace - an evidence-based approach. *J Occup Med Toxicol*. 2012;7(1):19.
11. Koh D-H, Kim J-I, Kim K-H, Yoo S-W. Welding fume exposure and chronic obstructive pulmonary disease in welders. *Occup Med*. 2015;65(1):72-7.
12. Grigg J, Miyashita L, Suri R. Pneumococcal infection of respiratory cells exposed to welding fumes; Role of oxidative stress and HIF-1 alpha. Ahmad S, éditeur. *PLOS ONE*. 2017;12(3):e0173569.
13. Coggon D, Palmer KT. Are welders more at risk of respiratory infections? *Thorax*. 2016;71(7):581-2.
14. Marongiu A, Hasan O, Ali A, Bakhsh S, George B, Irfan N, et al. Are welders more at risk of respiratory infections? Findings from a cross-sectional survey and analysis of medical records in shipyard workers: the WELSHIP project. *Thorax*. 2016;71(7):601-6.
15. Doherty MJ, Healy M, Richardson SG, Fisher NC. Total body iron overload in welder's siderosis. *Occup Environ Med*. 2004;61:82-5.
16. Cosgrove MP. Pulmonary fibrosis and exposure to steel welding fume. *Occup Med*. 2015;(65):706-12.

17. Andujar P, Simon-Deckers A, Galateau-Sallé F, Fayard B, Beaune G, Clin B, et al. Role of metal oxide nanoparticles in histopathological changes observed in the lung of welders. *Part Fibre Toxicol*. 2014;11(1):23.
18. Koksall D, Karcioğlu O, Babaoglu E, Sarınc Ulaşlı S, Onder S. The contribution of bronchoalveolar lavage in the diagnosis of welder's lung in a patient with pulmonary fibrosis. *Arch Environ Occup Health*. 2019;1-4.
19. Matrat M, Guida F, Mattei F, Cénée S, Cyr D, Févotte J, et al. Welding, a risk factor of lung cancer: the ICARE study. *Occup Environ Med*. 2016;73(4):254-61.
20. MacLeod JS, Harris MA, Tjepkema M, Peters PA, Demers PA. Cancer Risks among Welders and Occasional Welders in a National Population-Based Cohort Study: Canadian Census Health and Environmental Cohort. *Saf Health Work*. 2017;8(3):258-66.
21. Wong JYY, Bassig BA, Seow WJ, Hu W, Ji B-T, Blair A, et al. Lung cancer risk in welders and foundry workers with a history of heavy smoking in the USA: The National Lung Screening Trial. *Occup Environ Med*. 2017;74(6):440-8.
22. Number Size Distribution of Fine and Ultrafine Fume Particles From Various Welding Processes. *Ann Occup Hyg* [Internet]. 1 oct 2012 [cité 26 nov 2018]; Disponible sur: <https://academic.oup.com/annweh/article/57/3/305/231025/Number-Size-Distribution-of-Fine-and-Ultrafine>
23. Prémumé M, Simon-Deckers A, Tomkiewicz-Raulet C, Le Grand B, Tran Van Nhieu J, Beaune G, et al. Exposure to metal oxide nanoparticles administered at occupationally relevant doses induces pulmonary effects in mice. *Nanotoxicology*. 2016;10(10):1535-44.
24. Li N, Sioutas C, Cho A, Schmitz D, Misra C, Sempf J, et al. Ultrafine particulate pollutants induce oxidative stress and mitochondrial damage. *Environ Health Perspect*. 2003;111(4):455-60.
25. Leonard SS, Chen BT, Stone SG, Schwegler-Berry D, Kenyon AJ, Frazer D, et al. Comparison of stainless and mild steel welding fumes in generation of reactive oxygen species. *Part Fibre Toxicol*. 2010;7(1):32.
26. Graczyk H, Lewinski N, Zhao J, Sauvain J-J, Suarez G, Wild P, et al. Increase in oxidative stress levels following welding fume inhalation: a controlled human exposure study. *Part Fibre Toxicol*. 2015;13(1).
27. Shoeb M, Kodali V, Farris B, Bishop LM, Meighan T, Salmen R, et al. Evaluation of the molecular mechanisms associated with cytotoxicity and inflammation after pulmonary exposure to different metal-rich welding particles. *Nanotoxicology*. 2017;1-12.
28. Krishnaraj J, Kowshik J, Sebastian R, Raghavan SC, Nagini S. Exposure to welding fumes activates DNA damage response and redox-sensitive transcription factor signalling in Sprague-Dawley rats. *Toxicol Lett*. 2017;274:8-19.
29. Shoeb M, Kodali VK, Farris BY, Bishop LM, Meighan TG, Salmen R, et al. Oxidative stress, DNA methylation, and telomere length changes in peripheral blood mononuclear cells after pulmonary exposure to metal-rich welding nanoparticles. *NanoImpact*. 2017;5:61-9.
30. Callinan PA, Feinberg AP. The emerging science of epigenomics. *Hum Mol Genet*. 2006;15:95-101.

31. Wadhwa P, Buss C, Entringer S, Swanson J. Developmental Origins of Health and Disease: Brief History of the Approach and Current Focus on Epigenetic Mechanisms. *Semin Reprod Med.* sept 2009;27(05):358-68.
32. Gabory A. SF-DOHAD - L'initiative des 1000 jours de l'OMS et l'origine développementale de la santé et des maladies (DOHAD) [Internet]. SF-DOHAD. 2014 [cité 26 févr 2019]. Disponible sur: <http://www.sf-dohad.fr/les-1000-jours/136-l-initiative-des-1000-jours-de-l-oms>
33. Rial-Sebbag E, Guibet Lafaye C, Simeoni U, Junien C. DOHAD et information épigénétique: Enjeux sociétaux. *médecine/sciences.* janv 2016;32(1):100-5.
34. Waterland RA, Michels KB. Epigenetic Epidemiology of the Developmental Origins Hypothesis. *Annu Rev Nutr.* août 2007;27(1):363-88.
35. Wu Y, Vadgama JV. Epigenetics in Breast and Prostate Cancer. In: *Cancer Epigenetics.* Springer New York; 2015. p. 425-66.
36. Brennecke J, Stark A, Russell RB, Cohen SM. Principles of MicroRNA–Target Recognition. James C. Carrington, éditeur. *PLoS Biol.* 2005;3(3):e85.
37. Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature.* 2004;431(7006):350-5.
38. De Guire V, Robitaille R, Tétreault N, Guérin R, Ménard C, Bambace N, et al. Circulating miRNAs as sensitive and specific biomarkers for the diagnosis and monitoring of human diseases: Promises and challenges. *Clin Biochem.* 2013;46(10-11):846-60.
39. Alipoor SD, Adcock IM, Garssen J, Mortaz E, Varahram M, Mirsaeidi M, et al. The roles of miRNAs as potential biomarkers in lung diseases. *Eur J Pharmacol.* 2016;791:395-404.
40. Ho S-M, Johnson A, Tarapore P, Janakiram V, Zhang X, Leung Y-K. Environmental Epigenetics and Its Implication on Disease Risk and Health Outcomes. *ILAR J.* 2012;53(3-4):289-305.
41. Maltby S, Plank M, Tay HL, Collison A, Foster PS. Targeting MicroRNA Function in Respiratory Diseases: Mini-Review. *Front Physiol.* 2016;7.
42. Pottier N, Maurin T, Chevalier B, Puisségur M-P, Lebrigand K, Robbe-Sermesant K, et al. Identification of Keratinocyte Growth Factor as a Target of microRNA-155 in Lung Fibroblasts: Implication in Epithelial-Mesenchymal Interactions. Jin D-Y, éditeur. *PLoS ONE.* 2009;4(8):e6718.
43. Savary G, Dewaeles E, Diazzi S, Buscot M, Nottet N, Fassy J, et al. The Long Noncoding RNA DNMT3OS Is a Reservoir of FibromiRs with Major Functions in Lung Fibroblast Response to TGF- $\beta$  and Pulmonary Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 15 juill 2019;200(2):184-98.
44. Castro D, Moreira M, Gouveia AM, Pozza DH, De Mello RA. MicroRNAs in lung cancer. *Oncotarget.* 2017;8(46).
45. Zhou Q, Huang S-X, Zhang F, Li S-J, Liu C, Xi Y-Y, et al. MicroRNAs: A novel potential biomarker for diagnosis and therapy in patients with non-small cell lung cancer. *Cell Prolif.* 2017;50(6):e12394.
46. Liu C, Cui H, Gu D, Zhang M, Fang Y, Chen S, et al. Genetic polymorphisms and lung cancer risk: Evidence from meta-analyses and genome-wide association studies. *Lung Cancer.* 2017;113:18-29.

47. Moretti F, D'Antona P, Finardi E, Barbetta M, Dominioni L, Poli A, et al. Systematic review and critique of circulating miRNAs as biomarkers of stage I-II non-small cell lung cancer. *Oncotarget*. 2017;8(55).
48. Izzotti A, Pulliero A. The effects of environmental chemical carcinogens on the microRNA machinery. *Int J Hyg Environ Health*. 2014;217(6):601-27.
49. Chappell G, Pogribny IP, Guyton KZ, Rusyn I. Epigenetic alterations induced by genotoxic occupational and environmental human chemical carcinogens: A systematic literature review. *Mutat Res Mutat Res*. 2016;768:27-45.
50. Salemi R, Marconi A, Di Salvatore V, Franco S, Rapisarda V, Libra M. Epigenetic alterations and occupational exposure to benzene, fibers, and heavy metals associated with tumor development. *Mol Med Rep*. 2017;15(5):3366-71.
51. Li J, Li WX, Bai C, Song Y. Particulate matter-induced epigenetic changes and lung cancer: Particulate matter, epigenetics and lung cancer. *Clin Respir J*. 2017;11(5):539-46.
52. Mossman BT. Mechanistic in vitro studies: What they have told us about carcinogenic properties of elongated mineral particles (EMPs). *Toxicol Appl Pharmacol*. déc 2018;361:62-7.
53. Beltrán-García J, Osca-Verdegal R, Mena-Mollá S, García-Giménez JL. Epigenetic IVD Tests for Personalized Precision Medicine in Cancer. *Front Genet*. 2019;10:621.
54. Sotty J, Garçon G, Denayer F-O, Alleman L-Y, Saleh Y, Perdrix E, et al. Toxicological effects of ambient fine (PM<sub>2.5-0.18</sub>) and ultrafine (PM<sub>0.18</sub>) particles in healthy and diseased 3D organo-typic mucociliary-phenotype models. *Environ Res*. 2019;176:108538.
55. Cantone L, Nordio F, Hou L, Apostoli P, Bonzini M, Tarantini L, et al. Inhalable Metal-Rich Air Particles and Histone H3K4 Dimethylation and H3K9 Acetylation in a Cross-sectional Study of Steel Workers. *Environ Health Perspect*. 2011;119(7):964-9.
56. INRS\_Institut Nationale de Recherche et de Sécurité. Chrome VI M-43 - MétroPol [Internet]. INRS Publication; 2017. Disponible sur: [http://www.inrs.fr/publications/bdd/metropol/fiche.html?refINRS=METROPOL\\_43](http://www.inrs.fr/publications/bdd/metropol/fiche.html?refINRS=METROPOL_43)
57. Murugadoss S, Lison D, Godderis L, Van Den Brule S, Mast J, Brassinne F, et al. Toxicology of silica nanoparticles: an update. *Arch Toxicol*. 2017;91(9):2967-3010.
58. Bhattacharjee S. DLS and zeta potential – What they are and what they are not? *J Controlled Release*. 2016;235:337-51.
59. Courcot E, Leclerc J, Lafitte J-J, Mensier E, Jaillard S, Gosset P, et al. Xenobiotic Metabolism and Disposition in Human Lung Cell Models: Comparison with In Vivo Expression Profiles. *Drug Metab Dispos*. 2012;40(10):1953-65.
60. Uboldi C, Sanles Sobrido M, Bernard E, Tassistro V, Herlin-Boime N, Vrel D, et al. In Vitro Analysis of the Effects of ITER-Like Tungsten Nanoparticles: Cytotoxicity and Epigenotoxicity in BEAS-2B Cells. *Nanomaterials*. 2019;9(9):1233.
61. Liu J, Chen X, Dou M, He H, Ju M, Ji S, et al. Particulate matter disrupts airway epithelial barrier via oxidative stress to promote *Pseudomonas aeruginosa* infection. *J Thorac Dis*. 2019;11(6):2617-27.

62. Zhang S, Li X, Xie F, Liu K, Liu H, Xie J. Evaluation of whole cigarette smoke induced oxidative stress in A549 and BEAS-2B cells. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2017;54:40-7.
63. Suri R, Periselneris J, Lanone S, Zeidler-Erdely PC, Melton G, Palmer KT, et al. Exposure to welding fumes and lower airway infection with *Streptococcus pneumoniae*. *J Allergy Clin Immunol*. 2016;137(2):527-534.e7.
64. Park Y, Kim D, Dai J, Zhang Z. Human bronchial epithelial BEAS-2B cells, an appropriate in vitro model to study heavy metals induced carcinogenesis. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2015;287(3):240-5.
65. Antonini JM, Leonard SS, Roberts JR, Solano-Lopez C, Young S-H, Shi X, et al. Effect of stainless steel manual metal arc welding fume on free radical production, DNA damage, and apoptosis induction. *Mol Cell Biochem*. 2005;279(1-2):17-23.
66. Veranth JM, Kaser EG, Veranth MM, Koch M, Yost GS. Cytokine responses of human lung cells (BEAS-2B) treated with micron-sized and nanoparticles of metal oxides compared to soil dusts. *Part Fibre Toxicol*. 2007;4(1):2.
67. Fidan F, Ünlü M, Köken T, Tetik L, Akgün S, Demirel R, et al. Oxidant-Antioxidant Status and Pulmonary Function in Welding Workers. *J Occup Health*. 2005;47(4):286-92.
68. Saxton RA, Sabatini DM. mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell*. 2017;168(6):960-76.
69. Wei S, Li Q, Li Z, Wang L, Zhang L, Xu Z. miR-424-5p promotes proliferation of gastric cancer by targeting Smad3 through TGF- $\beta$ 2 signaling pathway. *Oncotarget* [Internet]. 2016 [cité 25 sept 2019];7(46). Disponible sur: <http://www.oncotarget.com/fulltext/12092>
70. Xie D, Song H, Wu T, Li D, Hua K, Xu H, et al. MicroRNA-424 serves an anti-oncogenic role by targeting cyclin-dependent kinase-1 in breast cancer cells. *Oncol Rep* [Internet]. 2018 [cité 25 sept 2019]; Disponible sur: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/or.2018.6741>
71. Santiago L, Daniels G, Wang D, Deng F-M, Lee P. Wnt signaling pathway protein LEF1 in cancer, as a biomarker for prognosis and a target for treatment. 2017;7(6):1389-406.
72. Guan H, Liu C, Fang F, Huang Y, Tao T, Ling Z, et al. MicroRNA-744 promotes prostate cancer progression through aberrantly activating Wnt/ $\beta$ -catenin signaling. *Oncotarget* [Internet]. 2017 [cité 25 sept 2019];8(9). Disponible sur: <http://www.oncotarget.com/fulltext/14711>
73. Kansara K, Patel P, Shah D, Shukla RK, Singh S, Kumar A, et al. TiO<sub>2</sub> nanoparticles induce DNA double strand breaks and cell cycle arrest in human alveolar cells: DNA Double Strand Breaks and Cell Cycle Arrest. *Environ Mol Mutagen*. 2015;56(2):204-17.
74. Herzog F, Clift MJ, Piccapietra F, Behra R, Schmid O, Petri-Fink A, et al. Exposure of silver-nanoparticles and silver-ions to lung cells in vitro at the air-liquid interface. *Part Fibre Toxicol*. 2013;10(1):11.
75. Martin PJ, Héliot A, Trémolet G, Landkocz Y, Dewaele D, Cazier F, et al. Cellular response and extracellular vesicles characterization of human macrophages exposed to fine atmospheric particulate matter. *Environ Pollut*. 2019;254:112933.
76. Ito T, Bekki K, Fujitani Y, Hirano S. The toxicological analysis of secondary organic aerosol in human lung epithelial cells and macrophages. *Environ Sci Pollut Res*. 2019;26(22):22747-55.

77. Poss KD, Tonegawa S. Reduced stress defense in heme oxygenase 1-deficient cells. *Proc Natl Acad Sci.* 1997;94(20):10925-30.

# ANNEXES

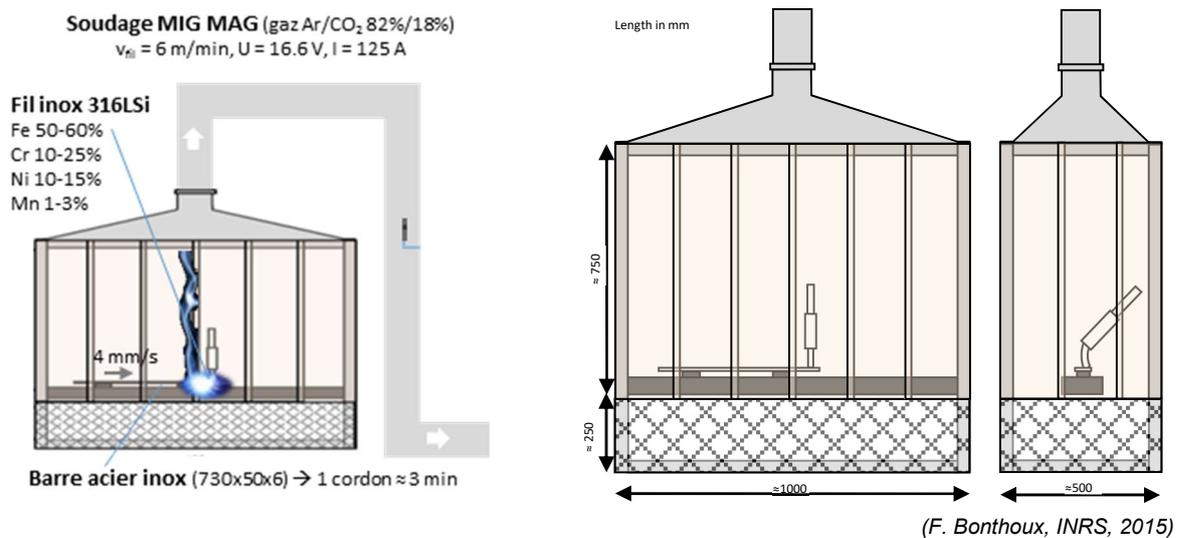
Annexe 1 : VLEP réglementaires contraignantes (fixée par décret) / VLEP réglementaires indicatives (fixées par arrêté) individuelles des différents constituants des fumées de soudage.

Principaux constituants des fumées de soudage	Valeur limite d'exposition professionnelle (mg/m <sup>3</sup> )	
	VLEP 8h	VLEP CT
Aluminium (fumées de soudage)	5	
Aluminium (Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> )	10	
Dioxyde d'azote	6	
Monoxyde d'azote	30	
Baryum (composés solubles)	0,5	
Béryllium (et composés)	0,002	
Cadmium (oxyde)	0,05	
Chrome VI (composés)	0,001	0,005
Cuivre (fumées)	0,2	
Dioxyde de titane	10	
Fer (Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> , fumées)	5	
Fluorures	2,5	
Manganèse (Mn <sub>2</sub> O <sub>4</sub> , fumées)	1	
Monoxyde de carbone	55	
Nickel et oxydes de nickel (NiO et Ni <sub>2</sub> O <sub>3</sub> )	1	
Ozone	0,2	0,4
Phosgène	0,08	0,4
Plomb (métallique et composés)	0,1	
Zinc (oxyde, fumées)	5	

Annexe 2 : Classification des principaux agents cancérogènes rencontrés lors des activités de soudage (2019).

Constituants des fumées de soudage	Union Européenne	Centre international de recherche sur le cancer
Béryllium	1 B (par inhalation)	1
Cadmium	1 B	1
Chrome VI (composés)	1 A	1
Cobalt (et composés)	/	2 B
Dioxyde de titane	/	2B
Formaldéhyde	2	1
Certains composés du nickel : monoxyde de nickel, trioxyde de nickel	1 A (par inhalation)	1
Plomb	2 (composés du plomb)	2 B (métal) 2 A (dérivés inorganiques)
Pentaoxyde de vanadium	/	2B
Rayonnements ionisants alpha (thorium)	/	1

Annexe 3 : Banc de génération des FS.



Annexe 4 : Concentrations en CrVI (Protocole à 1 extraction).

Génération	Support	Cr <sup>VI</sup> (µg)	[Cr <sup>VI</sup> ] (µg/m <sup>3</sup> )	Valid*.
ANSES03	CFC CrVI-001	4.47 ± 0.17	166 ± 18	O
ANSES07	CFC CrVI-002	4.25 ± 0.16	156 ± 17	O
ANSES15	CFC CrVI-003	4.40 ± 0.17	180 ± 19	N
ANSES19	CFC CrVI-004	4.61 ± 0.18	170 ± 18	O
ANSES23	CFC CrVI-005	4.17 ± 0.16	271 ± 29	N
ANSES31	CFC CrVI-006	5.61 ± 0.21	164 ± 18	N
ANSES35	CFC CrVI-007	4.37 ± 0.17	163 ± 17	O
ANSES43	CFC CrVI-008	4.34 ± 0.17	164 ± 18	O
ANSES47	CFC CrVI-009	3.76 ± 0.15	140 ± 15	O
ANSES51	CFC CrVI-010	4.23 ± 0.16	160 ± 17	O
<b>Moyenne (n=7)</b>		<b>4.3 ± 0.3</b>	<b>160 ± 10</b>	

\* Non-respect des conditions de prélèvement (variation débit...)

Annexe 5 : Concentrations en protéines dans le lysat cellulaire de BEAS-2B après exposition (µg/mL).

		Aiguë	Ech.		Prot totales (µg/µL)	Réitérée	Ech.		Prot totales (µg/µL)
Expo 1	NC		AIN28C	28	7,79		RIN82C	82	9,21
			AIN29C	29	7,96		RIN83C	83	8,99
			AIN30C	30	6,43		RIN84C	84	9,26
	D1		AI131C	31	9,12		RI185C	85	9,04
			AI132C	32	7,62		RI186C	86	8,39
			AI133C	33	7,81		RI187C	87	8,51
	D2		AI234C	34	8,59		RI288C	88	9,47
			AI235C	35	7,86		RI289C	89	9,64
			AI236C	36	7,68		RI290C	90	9,06
Expo 2	NC	"AINC	37	9,42	"RINC	91	9,59		
	D1	"AI1C	38	9,13	"RI1C	92	9,35		
	D2	"AI2C	39	9,84	"RI2C	93	9,80		
Expo 3	NC	*AINC	40	4,78	*RINC	94	6,21		
	D1	*AI1C	41	4,59	*RI1C	95	6,57		
	D2	*AI2C	42	4,20	*RI2C	96	5,77		

NE = Non Exposé; D1 = Dose 1; D2 = Dose 2

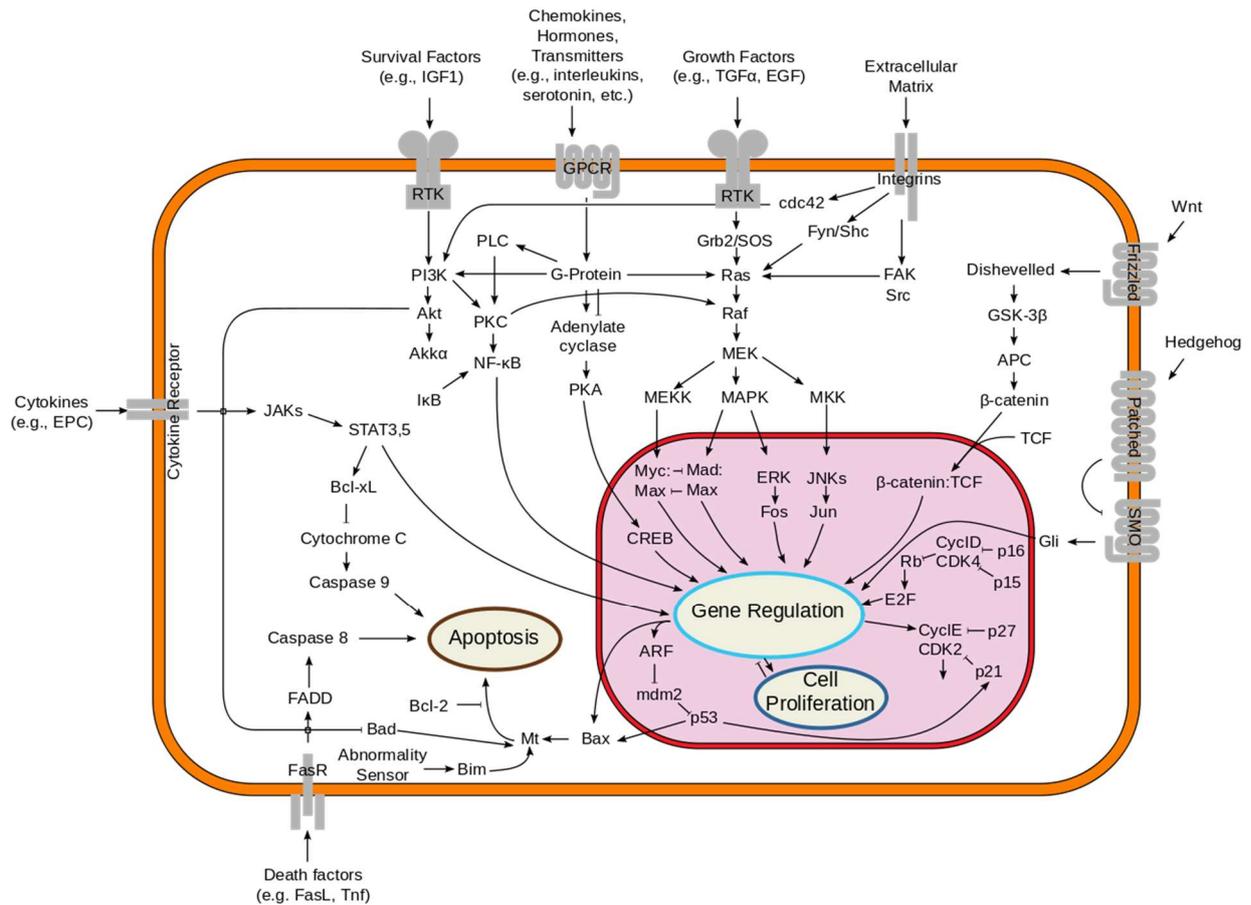
Annexe 6 : Résultats d'extractions d'ARN et ADN ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ).

DOSE ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )	Concentration ARN ( $\text{ng}/\mu\text{L}$ )	Concentration ADN ( $\text{ng}/\mu\text{L}$ )	DOSE ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )	Concentration ARN ( $\text{ng}/\mu\text{L}$ )	Concentration ADN ( $\text{ng}/\mu\text{L}$ )
Exposition aiguë n°1 (n=3)			Exposition répétée n°1 (n=3)		
NE	340,22	178,52	NE	458,84	175,8
NE	323,31	224,15	NE	386,47	117,1
NE	331,20	195,73	NE	440,68	216,0
1,5	347,32	232,15	0,25	662,04	140,33
1,5	346,87	253,48	0,25	846,10	146,88
1,5	338,99	225,09	0,25	746,37	106,17
9	293,97	230,13	1,5	581,75	135,8
9	331,08	195,15	1,5	611,22	281,9
9	297,42	86,91	1,5	593,07	179,3
Exposition aiguë n°2 (n=1)			Exposition répétée n°2 (n=1)		
NE	249,38	32,91	NE	442,94	62,88
1,5	269,54	43,11	0,25	513,25	55,9
9	200,07	25,87	1,5	240,74	60,7
Exposition aiguë n°3 (n=1)			Exposition répétée n°3 (n=1)		
NE	212,12	55,86	NE	178,36	51,59
1,5	225,89	46,33	0,25	205,39	50,8
9	199,46	52,06	1,5	123,33	31,8

Annexe 7 : Potentiels ARNm cibles des miARN dans les conditions d'exposition aux PUF de FS identiques. Analyse à partir des bases données : miRDB, TargetScanHuman et DIANA micro-T CDS.

Micro ARN	Schéma et dose ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) d'exposition	ARNm communs à DIANA, miRDB et TargetScan	Target Scan seul	TargetScan et miRDB	TargetScan et Diana	Diana seul
hsa-miR-424-5p	AIGUE 1,5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$		CDK4			SMAD4
hsa-miR-625-5p	AIGUE 9 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$		TCF7, IKBKG, CDK4			
hsa-miR-212-3p	AIGUE 9 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	RASA1				
hsa-miR 210-3p	AIGUE 9 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	Aucuns ARNm communs entre les cibles significative après expositions et les ARNm prédictifs de hsa-miR-210-3p connus dans la littérature				
hsa-miR-1248	AIGUE 9 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$		MAP3K7, IKBKG, CDK4, MYD88	BCL2		
hsa-miR-597-5p	AIGUE 9 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	NCAM1	IKBKG			PPARG
hsa-miR-1260a	AIGUE 9 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$		CASP1, BCL2, RASA1, MYD88	TCF7, PENK	IKBKG	
hsa-miR-744-3p	REPETEE 1,5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	MEF2C	NKD1, BCL2, CDK4, TLR6, LEF1, LPAR2, ADORA1, CALCRL			
hsa-miR-766-3p	REPETEE 1,5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	ADORA1	CCNB1, BCL2, STAT5A, MEF2C, LPAR2, TLR4, NKD1, SLC44A2, TLR6, CALCRL	LEF1, WNT5B	KSR1	

Annexe 8 : Vue d'ensemble des voies de signalisation impliquées dans le processus d'apoptose et de prolifération cellulaire. Similitudes avec l'analyse de transcrit ARNm obtenue après exposition aux PUF de FS.



## RESUME

En France 600 000 soudeurs sont quotidiennement exposés aux fumées de soudage (FS) que le Centre International de Recherche sur le Cancer a classé cancérigène avéré pour l'homme. La prévalence importante des atteintes broncho-pulmonaires et le risque de développement du cancer chez les soudeurs justifient de conduire des études afin d'identifier les déterminants de toxicité des FS actuellement peu connus. Notre étude menée sur des cellules épithéliales bronchiques humaines (BEAS-2B) a pour objectif, d'améliorer la compréhension des mécanismes moléculaires et cellulaires associés à la survenue d'atteintes respiratoires en lien avec une exposition aux FS. Après exposition de 24 h et trois fois 24 h des cellules, à plusieurs doses de particules ultrafines (PUF) de FS, des analyses de cytotoxicité (ATP intracellulaire), d'inflammation (cytokines), de stress oxydant (protéines carbonylées, 8-hydroxydésoxyguanine et glutathion), des modifications transcriptomiques (ARNm) et altérations épigénétiques (microARN ou miARN) ont été réalisées. La DL10 des PUF de FS a été déterminée pour les conditions d'exposition aiguës et répétées : respectivement 1,22 et 0,25 µg/cm<sup>2</sup>. Certains marqueurs du stress oxydant (glutathion oxydé/glutathion réduit) ont été mis en évidence. L'analyse des transcrits ARNm et miARN a permis d'identifier des voies de signalisation associées aux effets toxiques des PUF de FS. En perspective, l'étude approfondie et la validation fonctionnelle des mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans la toxicité des PUF de FS, permettra de justifier une étude *in vivo* pour rechercher des marqueurs d'effets spécifiques et précoces.

*Mots clé : Exposition, Stress Oxydant, Transcriptomique, miARN*

## ABSTRACT

In France 600,000 welders are exposed daily to welding fumes (WF). The International Agency for Research on Cancer has classified as carcinogenic to humans. The high prevalence of bronchopulmonary disease and the risk of cancer development in welders justifies to conduct studies to identify the determinants of toxicity currently unknown. Our study carried out on human bronchial epithelial cells (BEAS-2B) aims to improve understanding of the molecular and cellular mechanisms associated with the occurrence of respiratory disorders related to exposure to WF. After 24 hours and three times 24h cells exposure with multiple dose of ultrafine particles (UFP) of WF, analyzes of cytotoxicity (ATPase), inflammation (cytokines), oxidative stress (carbonylated proteins, 8-hydroxydesoxyguanine and glutathione) and transcriptomic modifications (mRNA and microRNA or miRNA) have been performed. The LD10 of UFP was determined for the acute and repeated exposure conditions: 1.22 and 0.25 µg/cm<sup>2</sup>, respectively. Some markers of oxidative stress (ratio oxidized glutathione/reduced glutathione) have been highlighted. Analysis of mRNA and miRNA transcripts allowed to identify signaling pathways associated with welding fume's toxics effects. In perspective, the in-depth study and functional validation of the molecular and cellular mechanisms involved in the toxicity of welding fumes UFP, will justify an *in vivo* study to look for markers of specific and forward effects.

Keywords: Exposure, Oxidative stress, Transcriptomic, miRNA