

**MÉMOIRE
POUR LE DIPLOME D'ÉTUDES SPECIALISÉES
D'INNOVATION PHARMACEUTIQUE ET RECHERCHE**

**Soutenue publiquement le 20 Mars 2023
Par Mme BARBIER Emeline**

**Conformément aux dispositions réglementaires en vigueur tient lieu de
THESE EN VUE DU DIPLOME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

**ÉTUDE *IN VIVO* DE LA PATHOGÉNICITÉ PULMONAIRE
DES PARTICULES FINES ATMOSPHÉRIQUES.**

Membres du jury :

Président : ALLORGE Delphine, PU-PH en Toxicologie, Université de Lille.

Directeur de thèse : GARÇON Guillaume, PU en Toxicologie, Université de Lille.

Assesseur(s) :

- FRÉALLE Émilie, PH en Parasitologie-Mycologie, CHU de Lille.
- MONTEIL Christelle, PU en Toxicologie, Université de Rouen-Normandie.
- DEVOS David, PU-PH en Pharmacologie médicale, Université de Lille.
- LO GUIDICE Jean-Marc, Chargé de recherche INSERM, Université de Lille.

**MÉMOIRE
POUR LE DIPLOME D'ÉTUDES SPECIALISÉES
D'INNOVATION PHARMACEUTIQUE ET RECHERCHE**

**Soutenue publiquement le 20 Mars 2023
Par Mme BARBIER Emeline**

**Conformément aux dispositions réglementaires en vigueur tient lieu de
THESE EN VUE DU DIPLOME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

**ÉTUDE *IN VIVO* DE LA PATHOGÉNICITÉ PULMONAIRE
DES PARTICULES FINES ATMOSPHÉRIQUES.**

Membres du jury :

Président : ALLORGE Delphine, PU-PH en Toxicologie, Université de Lille.

Directeur de thèse : GARÇON Guillaume, PU en Toxicologie, Université de Lille.

Assesseur(s) :

- FRÉALLE Émilie, PH en Parasitologie-Mycologie, CHU de Lille.
- MONTEIL Christelle, PU en Toxicologie, Université de Rouen-Normandie.
- DEVOS David, PU-PH en Pharmacologie médicale, Université de Lille.
- LO GUIDICE Jean-Marc, Chargé de recherche INSERM, Université de Lille.

Faculté de Pharmacie de Lille
3 Rue du Professeur Laguesse – 59000 Lille
03 20 96 40 40
<https://pharmacie.univ-lille.fr>

Université de Lille

Président
Premier Vice-président
Vice-présidente Formation
Vice-président Recherche
Vice-présidente Réseaux internationaux et européens
Vice-président Ressources humaines
Directrice Générale des Services

Régis BORDET
Etienne PEYRAT
Christel BEAUCOURT
Olivier COLOT
Kathleen O'CONNOR
Jérôme FONCEL
Marie-Dominique SAVINA

UFR3S

Doyen
Premier Vice-Doyen
Vice-Doyen Recherche
Vice-Doyen Finances et Patrimoine
Vice-Doyen Coordination pluriprofessionnelle et Formations sanitaires
Vice-Doyen RH, SI et Qualité
Vice-Doyenne Formation tout au long de la vie
Vice-Doyen Territoires-Partenariats
Vice-Doyenne Vie de Campus
Vice-Doyen International et Communication
Vice-Doyen étudiant

Dominique LACROIX
Guillaume PENEL
Éric BOULANGER
Damien CUNY
Sébastien D'HARANCY
Hervé HUBERT
Caroline LANIER
Thomas MORGENROTH
Claire PINÇON
Vincent SOBANSKI
Dorian QUINZAIN

Faculté de Pharmacie

Doyen
Premier Assesseur et Assesseur en charge des études
Assesseur aux Ressources et Personnels
Assesseur à la Santé et à l'Accompagnement
Assesseur à la Vie de la Faculté
Responsable des Services
Représentant étudiant

Delphine ALLORGE
Benjamin BERTIN
Stéphanie DELBAERE
Anne GARAT
Emmanuelle LIPKA
Cyrille PORTA
Honoré GUISE

Professeurs des Universités - Praticiens Hospitaliers (PU-PH)

| Civ. | Nom | Prénom | Service d'enseignement | Section CNU |
|------|--------------|-----------|--|-------------|
| Mme | ALLORGE | Delphine | Toxicologie et Santé publique | 81 |
| M. | BROUSSEAU | Thierry | Biochimie | 82 |
| M. | DÉCAUDIN | Bertrand | Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière | 81 |
| M. | DINE | Thierry | Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique | 81 |
| Mme | DUPONT-PRADO | Annabelle | Hématologie | 82 |
| Mme | GOFFARD | Anne | Bactériologie - Virologie | 82 |
| M. | GRESSIER | Bernard | Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique | 81 |
| M. | ODOU | Pascal | Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière | 80 |
| Mme | POULAIN | Stéphanie | Hématologie | 82 |
| M. | SIMON | Nicolas | Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique | 81 |
| M. | STAELS | Bart | Biologie cellulaire | 82 |

Professeurs des Universités (PU)

| Civ. | Nom | Prénom | Service d'enseignement | Section CNU |
|------|--------------|-------------|--|-------------|
| M. | ALIOUAT | El Moukhtar | Parasitologie - Biologie animale | 87 |
| Mme | AZAROUAL | Nathalie | Biophysique - RMN | 85 |
| M. | BLANCHEMAIN | Nicolas | Pharmacotechnie industrielle | 85 |
| M. | CARNOY | Christophe | Immunologie | 87 |
| M. | CAZIN | Jean-Louis | Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique | 86 |
| M. | CHAVATTE | Philippe | Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol | 86 |
| M. | COURTECUISSÉ | Régis | Sciences végétales et fongiques | 87 |
| M. | CUNY | Damien | Sciences végétales et fongiques | 87 |
| Mme | DELBAERE | Stéphanie | Biophysique - RMN | 85 |
| Mme | DEPREZ | Rebecca | Chimie thérapeutique | 86 |
| M. | DEPREZ | Benoît | Chimie bioinorganique | 85 |
| M. | DUPONT | Frédéric | Sciences végétales et fongiques | 87 |
| M. | DURIEZ | Patrick | Physiologie | 86 |

| | | | | |
|-----|---------------|-----------------|---|----|
| M. | ELATI | Mohamed | Biomathématiques | 27 |
| M. | FOLIGNÉ | Benoît | Bactériologie - Virologie | 87 |
| Mme | FOULON | Catherine | Chimie analytique | 85 |
| M. | GARÇON | Guillaume | Toxicologie et Santé publique | 86 |
| M. | GOOSSENS | Jean-François | Chimie analytique | 85 |
| M. | HENNEBELLE | Thierry | Pharmacognosie | 86 |
| M. | LEBEGUE | Nicolas | Chimie thérapeutique | 86 |
| M. | LEMDANI | Mohamed | Biomathématiques | 26 |
| Mme | LESTAVEL | Sophie | Biologie cellulaire | 87 |
| Mme | LESTRELIN | Réjane | Biologie cellulaire | 87 |
| Mme | MELNYK | Patricia | Chimie physique | 85 |
| M. | MILLET | Régis | Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol | 86 |
| Mme | MUHR-TAILLEUX | Anne | Biochimie | 87 |
| Mme | PERROY | Anne-Catherine | Droit et Economie pharmaceutique | 86 |
| Mme | ROMOND | Marie-Bénédicte | Bactériologie - Virologie | 87 |
| Mme | SAHPAZ | Sevser | Pharmacognosie | 86 |
| M. | SERGHERAERT | Éric | Droit et Economie pharmaceutique | 86 |
| M. | SIEPMANN | Juergen | Pharmacotechnie industrielle | 85 |
| Mme | SIEPMANN | Florence | Pharmacotechnie industrielle | 85 |
| M. | WILLAND | Nicolas | Chimie organique | 86 |

Maîtres de Conférences - Praticiens Hospitaliers (MCU-PH)

| Civ. | Nom | Prénom | Service d'enseignement | Section CNU |
|------|-----------|-----------------|---|-------------|
| M. | BLONDIAUX | Nicolas | Bactériologie - Virologie | 82 |
| Mme | DEMARET | Julie | Immunologie | 82 |
| Mme | GARAT | Anne | Toxicologie et Santé publique | 81 |
| Mme | GENAY | Stéphanie | Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière | 81 |
| M. | LANNON | Damien | Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière | 80 |
| Mme | ODOU | Marie-Françoise | Bactériologie - Virologie | 82 |

Maîtres de Conférences des Universités (MCU)

| Civ. | Nom | Prénom | Service d'enseignement | Section CNU |
|------|-----------------|--------------|--|-------------|
| M. | AGOURIDAS | Laurence | Chimie thérapeutique | 85 |
| Mme | ALIOUAT | Cécile-Marie | Parasitologie - Biologie animale | 87 |
| M. | ANTHÉRIEU | Sébastien | Toxicologie et Santé publique | 86 |
| Mme | AUMERCIER | Pierrette | Biochimie | 87 |
| M. | BANTUBUNGI-BLUM | Kadiombo | Biologie cellulaire | 87 |
| Mme | BARTHELEMY | Christine | Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière | 85 |
| Mme | BEHRA | Josette | Bactériologie - Virologie | 87 |
| M. | BELARBI | Karim-Ali | Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique | 86 |
| M. | BERTHET | Jérôme | Biophysique - RMN | 85 |
| M. | BERTIN | Benjamin | Immunologie | 87 |
| M. | BOCHU | Christophe | Biophysique - RMN | 85 |
| M. | BORDAGE | Simon | Pharmacognosie | 86 |
| M. | BOSC | Damien | Chimie thérapeutique | 86 |
| M. | BRIAND | Olivier | Biochimie | 87 |
| Mme | CARON-HOUDE | Sandrine | Biologie cellulaire | 87 |
| Mme | CARRIÉ | Hélène | Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique | 86 |
| Mme | CHABÉ | Magali | Parasitologie - Biologie animale | 87 |
| Mme | CHARTON | Julie | Chimie organique | 86 |
| M. | CHEVALIER | Dany | Toxicologie et Santé publique | 86 |
| Mme | DANEL | Cécile | Chimie analytique | 85 |
| Mme | DEMANCHE | Christine | Parasitologie - Biologie animale | 87 |
| Mme | DEMARQUILLY | Catherine | Biomathématiques | 85 |
| M. | DHIFLI | Wajdi | Biomathématiques | 27 |
| Mme | DUMONT | Julie | Biologie cellulaire | 87 |
| M. | EL BAKALI | Jamal | Chimie thérapeutique | 86 |
| M. | FARCE | Amaury | Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol | 86 |

| | | | | |
|-----|-----------------------|-----------------|---|----|
| M. | FLIPO | Marion | Chimie organique | 86 |
| M. | FURMAN | Christophe | Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol | 86 |
| M. | GERVOIS | Philippe | Biochimie | 87 |
| Mme | GOOSSENS | Laurence | Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol | 86 |
| Mme | GRAVE | Béatrice | Toxicologie et Santé publique | 86 |
| Mme | GROSS | Barbara | Biochimie | 87 |
| M. | HAMONIER | Julien | Biomathématiques | 26 |
| Mme | HAMOUDI-BEN YELLES | Chérifa-Mounira | Pharmacotechnie industrielle | 85 |
| Mme | HANNOThIAUX | Marie-Hélène | Toxicologie et Santé publique | 86 |
| Mme | HELLEBOID | Audrey | Physiologie | 86 |
| M. | HERMANN | Emmanuel | Immunologie | 87 |
| M. | KAMBIA KPAKPAGA | Nicolas | Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique | 86 |
| M. | KARROUT | Younes | Pharmacotechnie industrielle | 85 |
| Mme | LALLOYER | Fanny | Biochimie | 87 |
| Mme | LECOEUR | Marie | Chimie analytique | 85 |
| Mme | LEHMANN | Hélène | Droit et Economie pharmaceutique | 86 |
| Mme | LELEU | Natascha | Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol | 86 |
| Mme | LIPKA | Emmanuelle | Chimie analytique | 85 |
| Mme | LOINGEVILLE | Florence | Biomathématiques | 26 |
| Mme | MARTIN | Françoise | Physiologie | 86 |
| M. | MOREAU | Pierre-Arthur | Sciences végétales et fongiques | 87 |
| M. | MORGENROTH | Thomas | Droit et Economie pharmaceutique | 86 |
| Mme | MUSCHERT | Susanne | Pharmacotechnie industrielle | 85 |
| Mme | NIKASINOVIC | Lydia | Toxicologie et Santé publique | 86 |
| Mme | PINÇON | Claire | Biomathématiques | 85 |
| M. | PIVA | Frank | Biochimie | 85 |
| Mme | PLATEL | Anne | Toxicologie et Santé publique | 86 |
| M. | POURCET | Benoît | Biochimie | 87 |

| | | | | |
|-----|------------|-----------|---|----|
| M. | RAVAUX | Pierre | Biomathématiques / Innovations pédagogiques | 85 |
| Mme | RAVEZ | Séverine | Chimie thérapeutique | 86 |
| Mme | RIVIÈRE | Céline | Pharmacognosie | 86 |
| M. | ROUMY | Vincent | Pharmacognosie | 86 |
| Mme | SEBTI | Yasmine | Biochimie | 87 |
| Mme | SINGER | Elisabeth | Bactériologie - Virologie | 87 |
| Mme | STANDAERT | Annie | Parasitologie - Biologie animale | 87 |
| M. | TAGZIRT | Madjid | Hématologie | 87 |
| M. | VILLEMAGNE | Baptiste | Chimie organique | 86 |
| M. | WELTI | Stéphane | Sciences végétales et fongiques | 87 |
| M. | YOUS | Saïd | Chimie thérapeutique | 86 |
| M. | ZITOUNI | Djamel | Biomathématiques | 85 |

Professeurs certifiés

| Civ. | Nom | Prénom | Service d'enseignement |
|------|----------|-----------|------------------------|
| Mme | FAUQUANT | Soline | Anglais |
| M. | HUGES | Dominique | Anglais |
| M. | OSTYN | Gaël | Anglais |

Professeurs Associés

| Civ. | Nom | Prénom | Service d'enseignement | Section CNU |
|------|----------|------------|----------------------------------|-------------|
| M. | DAO PHAN | Haï Pascal | Chimie thérapeutique | 86 |
| M. | DHANANI | Alban | Droit et Economie pharmaceutique | 86 |

Maîtres de Conférences Associés

| Civ. | Nom | Prénom | Service d'enseignement | Section CNU |
|------|-----------|------------|--|-------------|
| Mme | CUCCHI | Malgorzata | Biomathématiques | 85 |
| M. | DUFOSSEZ | François | Biomathématiques | 85 |
| M. | FRIMAT | Bruno | Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique | 85 |
| M. | GILLOT | François | Droit et Economie pharmaceutique | 86 |
| M. | MASCAUT | Daniel | Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique | 86 |
| M. | MITOUMBA | Fabrice | Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière | 86 |
| M. | PELLETIER | Franck | Droit et Economie pharmaceutique | 86 |
| M. | ZANETTI | Sébastien | Biomathématiques | 85 |

Assistants Hospitalo-Universitaire (AHU)

| Civ. | Nom | Prénom | Service d'enseignement | Section CNU |
|------|----------|-----------|--|-------------|
| Mme | CUVELIER | Élodie | Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique | 81 |
| M. | GRZYCH | Guillaume | Biochimie | 82 |
| Mme | LENSKI | Marie | Toxicologie et Santé publique | 81 |
| Mme | HENRY | Héloïse | Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière | 80 |
| Mme | MASSE | Morgane | Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière | 81 |

Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherche (ATER)

| Civ. | Nom | Prénom | Service d'enseignement | Section CNU |
|------|-----------|---------|---|-------------|
| Mme | GEORGE | Fanny | Bactériologie - Virologie / Immunologie | 87 |
| Mme | N'GUESSAN | Cécilia | Parasitologie - Biologie animale | 87 |
| M. | RUEZ | Richard | Hématologie | 87 |
| M. | SAIED | Tarak | Biophysique - RMN | 85 |
| M. | SIEROCKI | Pierre | Chimie bioinorganique | 85 |

Enseignant contractuel

| Civ. | Nom | Prénom | Service d'enseignement |
|------|-------------|---------|---|
| M. | MARTIN MENA | Anthony | Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière |

Faculté de Pharmacie de Lille

3 Rue du Professeur Laguesse – 59000 Lille
03 20 96 40 40
<https://pharmacie.univ-lille.fr>

L'Université n'entend donner aucune approbation aux opinions émises dans les thèses ; celles-ci sont propres à leurs auteurs

Remerciements

Par l'intermédiaire de ces quelques mots, je souhaite vivement remercier l'ensemble des personnes m'ayant soutenue et encouragée durant mes 9 années d'études de pharmacie et plus particulièrement durant mes années d'internat.

En premier lieu, je tiens à remercier chaleureusement mon directeur de thèse, le Pr. Guillaume Garçon, sans qui rien n'aurait été possible. Merci de m'avoir transmis votre passion pour la recherche et d'avoir su entretenir mon intérêt pour la toxicologie. Merci pour votre disponibilité, votre pédagogie, votre bienveillance et pour toute la confiance que vous avez pu m'accorder. Enfin, merci pour vos plaisanteries quotidiennes et votre bonne humeur !

Merci également au Dr. Jean-Marc Lo Guidice, directeur du laboratoire de recherche, pour son accueil, sa gentillesse et ses conseils avisés lors des essais toxicologiques.

Un immense merci à l'ensemble des mes collègues et amis de la « team Luck » : Jessica Carpentier, Eva Guilloteau, Florence Jacob, Ophélie Simonin, Emma Theerens, Stephan Gabet et Gianni Zarcone, ainsi qu'à Céline et Djamal Achour pour votre bienveillance et tous les moments de complicité que nous avons pu partager au quotidien. Si je suis autant épanouie professionnellement, c'est en grande partie grâce à vous !

Merci également à toute l'équipe pédagogique de la faculté de Pharmacie de Lille ainsi qu'à tous les intervenants professionnels responsables de ma formation, pour avoir assuré la partie théorique de celle-ci. Une pensée toute particulière pour l'ensemble du corps enseignant de toxicologie qui a su susciter en moi un vif intérêt pour cette discipline, notamment les Pr Delphine Allorge, Anne Garat, Sébastien Anthérieu et Guillaume Garçon (encore et toujours !).

Merci aux Dr Pierre Gosset, Esperanza Perdrix, Laurent Alleman ainsi qu'à l'ensemble des collaborateurs pour avoir apporté votre expertise dans ce projet.

Je souhaite également remercier chaleureusement mon père, ma mère, mon frère Charles et ma belle-sœur Alisson, pour m'avoir soutenue et épaulée durant toutes ces années notamment durant les périodes de révisions parfois interminables... Merci papa pour ta présence au quotidien et tes encouragements.

Merci à ma cousine Nadia pour m'avoir tant inspirée et dont le parcours n'a pu que me motiver à tenter la première année commune aux études de santé !

Merci à ma belle-famille pour vos encouragements durant toutes ces années d'« étudiante professionnelle ».

Un grand merci à ma fidèle amie Imelda Armando-Soba pour sa joie de vivre, sa bonne humeur et les fous rires partagés. Une dose de bonheur et de bonne humeur au quotidien !! Nos séances de rugby me manquent !!! ... Tu me manques !!

Enfin, je terminerai par remercier Gauthier, ma moitié, qui me soutenait déjà lorsque je stressais pour le baccalauréat... et qui a continué de croire en moi durant toutes ces années d'études supérieures. Jamais tu n'as douté de moi, merci pour ton soutien sans failles. Je t'aime.

Sommaire

| | |
|--|----|
| Liste des figures | 19 |
| Liste des tableaux | 20 |
| Avant-propos | 21 |
| PARTIE I : ÉTAT DE L'ART | 23 |
| I. LA POLLUTION ATMOSPHERIQUE | 23 |
| 1) Généralités..... | 23 |
| 2) Les principaux polluants de l'air..... | 23 |
| II. LA POLLUTION ATMOSPHERIQUE PARTICULAIRE | 24 |
| 1) Définition | 24 |
| 2) Classifications..... | 24 |
| a) En fonction de leur taille | 24 |
| b) En fonction de leur nature primaire ou secondaire | 25 |
| c) En fonction de leur processus de formation | 26 |
| d) En fonction de leur source | 27 |
| i. Sources naturelles..... | 27 |
| ii. Sources anthropiques | 28 |
| 3) Caractéristiques physiques et composition chimique..... | 29 |
| a) Fraction carbonée | 30 |
| b) Fraction métallique..... | 31 |
| c) Fraction inorganique..... | 32 |
| d) Fraction biologique | 32 |
| 4) Réglementations et normes internationales et nationales | 33 |
| 5) Niveaux d'exposition des populations..... | 34 |
| III. APPAREIL RESPIRATOIRE : PORTE D'ENTRÉE ET CIBLE PRINCIPALE DES PARTICULES FINES | 35 |
| 1) Physiologie de l'appareil respiratoire | 35 |
| 2) Histologie de l'épithélium bronchique | 36 |
| 3) Interactions des particules avec l'appareil respiratoire | 37 |
| IV. MÉCANISMES DE TOXICITÉ PULMONAIRE DES PARTICULES FINES | 40 |
| 1) Potentiel oxydant des PM _{2,5} et stress oxydant..... | 40 |
| 2) Inflammation..... | 44 |
| 3) Remodelage tissulaire et Cancérogénèse | 47 |
| 4) Altérations épigénétiques..... | 49 |
| PARTIE II : MATÉRIELS ET MÉTHODES..... | 53 |
| I. MATÉRIELS CHIMIQUES..... | 53 |
| 1) Prélèvement des particules..... | 53 |
| 2) Caractérisation physico-chimique et biologique des PM _{2,5} | 53 |

| | | |
|--------------|---|----|
| a) | Granulométrie | 53 |
| b) | Caractérisation physico-chimique | 54 |
| c) | Quantification des endotoxines | 54 |
| 3) | Évaluation du potentiel oxydant des particules | 54 |
| a) | Test de déplétion d'un agent réducteur, le Dithiothréitol (DTT) | 55 |
| b) | Test d'oxydation de la sonde CM-H ₂ DCFDA..... | 55 |
| c) | Test de déplétion d'une molécule antioxydante, le glutathion réduit | 55 |
| d) | Test de déplétion d'une molécule antioxydante, l'ascorbate | 56 |
| II. | MODÈLE MURIN | 56 |
| III. | PROTOCOLE D'EXPOSITION ET PRÉLÈVEMENTS PULMONAIRES..... | 57 |
| IV. | ÉTUDE DE LA TOXICITÉ PULMONAIRE | 58 |
| 1) | Mesure de marqueurs biologiques du stress oxydant | 58 |
| a) | Étude des défenses antioxydantes..... | 58 |
| i. | Étude de la voie de signalisation NRF2 | 58 |
| ii. | Étude de l'altération de l'homéostasie du glutathion | 59 |
| b) | Recherche de lésions oxydatives | 60 |
| i. | Marqueur d'oxydation de l'ADN : 8-OHdG..... | 60 |
| ii. | Marqueurs de peroxydation lipidique : 4-HNE et 8-IsoP | 60 |
| iii. | Marqueur d'oxydation protéique : Protéines carbonylées | 61 |
| 2) | Mesure de la réponse inflammatoire | 61 |
| a) | Numération cellulaire du LBA..... | 61 |
| b) | Analyses histologiques des tissus pulmonaires..... | 62 |
| c) | Mesure de l'activité de fixation à l'ADN du facteur de transcription NFκB par le système TransAM (Active Motif) | 62 |
| d) | Dosage des cytokines (Luminex) | 62 |
| 3) | Analyses transcriptomiques..... | 63 |
| a) | Analyses de l'expression des ARNm par Microarray | 63 |
| b) | Analyse de l'expression des miARN par OpenArray | 63 |
| 4) | Analyses statistiques | 64 |
| PARTIE III : | RÉSULTATS | 65 |
| I. | CARACTÉRISATION PHYSICO-CHIMIQUE ET BIOLOGIQUE DES PM _{2,5} | 65 |
| 1) | Distribution granulométrique | 65 |
| 2) | Caractérisation physico-chimique | 65 |
| 3) | Quantification des endotoxines | 66 |
| II. | MESURE DU POTENTIEL OXYDANT DES PM _{2,5} | 66 |
| III. | DÉROULEMENT DU PROTOCOLE D'EXPOSITION DES SOURIS..... | 67 |
| IV. | ÉTUDE DU STRESS OXYDANT..... | 67 |
| 1) | Étude des défenses antioxydantes..... | 67 |

| | | |
|---------------------------------|---|----|
| a) | La voie de signalisation NRF2 | 67 |
| i. | Mesure de l'activité de fixation à l'ADN du facteur de transcription Nrf2 | 67 |
| ii. | Étude de l'expression génique de NRF2 et de ses gènes cibles | 68 |
| iii. | Analyse d'activités enzymatiques (CAT et SOD) | 70 |
| b) | Étude de l'altération de l'homéostasie du glutathion | 70 |
| i. | Mesure du ratio GSSG/GSH | 70 |
| ii. | Analyse d'activités enzymatiques (GPx et GR) | 71 |
| 2) | Recherche de lésions oxydatives..... | 71 |
| V. | ÉTUDE DE L'INFLAMMATION | 72 |
| 1) | Numération cellulaire du LBA | 72 |
| 2) | Analyses histologiques des tissus pulmonaires..... | 73 |
| 3) | Mesure de l'activité de fixation à l'ADN du facteur de transcription NFκB..... | 75 |
| 4) | Dosage des cytokines (Luminex) | 75 |
| VI. | ÉTUDE DU TRANSCRIPTOME | 77 |
| 1) | Analyse des ARN messagers..... | 77 |
| 2) | Analyse des miARN | 80 |
| PARTIE IV : DISCUSSION | | 82 |
| Conclusion et perspectives..... | | 92 |
| Bibliographie | | 94 |

Liste des figures

| | |
|---|----|
| Figure 1 : Gamme de taille des particules atmosphériques, selon ATMO Grand Est - 2021 (8). | 25 |
| Figure 2 : Mécanismes de formation des particules secondaires (9). | 26 |
| Figure 3 : Répartition en nombre (concentration) et en taille des particules en fonction de leur mode de formation (10)..... | 27 |
| Figure 4 : Évolution des émissions dans l'air de PM _{2,5} depuis 1990 en France (Métropole), selon CITEPA - 2022. | 28 |
| Figure 5 : Composition relative moyenne des PM _{2,5} observées aux stations du réseau EMEP entre 2011 et 2019 (18)..... | 30 |
| Figure 6 : Exposition moyenne de la population aux PM _{2,5} , en µg/m ³ , en 2019 (43). | 34 |
| Figure 7 : Exposition annuelle moyenne de la population aux PM _{2,5} , en µg/m ³ en 1990 et en 2015 (42)..... | 34 |
| Figure 8 : Pourcentage de la population exposé à des concentrations de PM _{2,5} supérieures aux valeurs recommandées par l’OMS (10 µg/m ³), 2019 (43). | 35 |
| Figure 9 : Anatomie de l'appareil respiratoire..... | 36 |
| Figure 10 : Structure de l'épithélium des voies respiratoires, adaptée de Adam.D – 2014 (46)..... | 37 |
| Figure 11 : Pénétration, dépôt et principaux mécanismes pulmonaires d'élimination des particules atmosphériques, adaptée de l'INRS (48) | 38 |
| Figure 12 : Mécanismes de dépôt des particules inhalées dans les voies respiratoires (49)..... | 39 |
| Figure 13 : Déséquilibre de la balance pro-oxydants et antioxydants (55)..... | 41 |
| Figure 14 : Voie de signalisation NRF2 et transcription des gènes codant pour des enzymes de détoxification (53)..... | 42 |
| Figure 15 : Hiérarchisation des processus biologiques en fonction du rapport GSH/GSSG (74)..... | 43 |
| Figure 16 : Altération intracellulaire du rapport GSH/GSSG et régulation redox des maladies pro-inflammatoires et anti-inflammatoires (72)..... | 44 |
| Figure 17 : Réponse inflammatoire au sein des voies respiratoires (76). | 45 |
| Figure 18 : Mécanismes de défense de l'épithélium respiratoire (89). | 47 |
| Figure 19 : Processus de transition épithélio-mésenchymateuse et de transition mésenchymo-épithéliale (98)..... | 48 |
| Figure 20 : Voies d'induction potentielle de la transition épithélio-mésenchymateuse par les PM _{2,5} (95)..... | 49 |
| Figure 21 : Modifications épigénétiques modulant l'expression génique (104). | 50 |
| Figure 22 : Biogénèse des miARN et dégradation de l'ARNm cible (107). | 51 |
| Figure 23 : Situation géographique du site de prélèvements des particules fines..... | 53 |
| Figure 24 : Protocoles d'exposition aiguë et subchronique des souris, avec ou sans période de recouvrement (S: Sacrifice). | 57 |
| Figure 25 : Arbre décisionnelle pour l'analyse transcriptomique..... | 63 |
| Figure 26 : Distribution granulométrique des PM _{2,5} | 65 |
| Figure 27 : Composition chimique surfacique élémentaire des PM _{2,5} (%)..... | 65 |
| Figure 28 : Quantification des endotoxines dans les PM _{2,5} | 66 |
| Figure 29 : Étude du potentiel oxydant des PM _{2,5} par les tests du DTT (a), du CM-H ₂ DCFDA (b), du glutathion (c) et de l'acide ascorbique (d). | 66 |
| Figure 30 : Courbes de suivis de poids des souris..... | 67 |
| Figure 31 : Mesure de la capacité de liaison à l'ADN du facteur de transcription NRF2. | 68 |
| Figure 32 : Différentiel d'expression génique de NRF2 et des gènes et de ses gènes cibles entre les groupes exposés aux PM _{2,5} et contrôles..... | 69 |
| Figure 33 : Mesure de l'activité enzymatique de la catalase (CAT) et de la Superoxyde Dismutase (SOD) chez les souris exposées et contrôles. | 70 |
| Figure 34 : Mesure du ratio GSSG/GSH chez les groupes exposés et contrôles. | 70 |

| | |
|---|----|
| Figure 35 : Mesure de l'activité enzymatique de Glutathion Peroxydase (GPx) et de la Glutathion Réductase (GR) chez les souris exposées et contrôles. | 71 |
| Figure 36 : Recherche de lésions oxydatives chez les souris exposées et contrôles. | 71 |
| Figure 37 : Numération cellulaire des LBA des souris exposées aux PM _{2,5} et contrôles après 24h, 28 jours ou 28 jours d'exposition + recouvrement. | 72 |
| Figure 38: Marquage immunohistochimique de coupes histologiques pulmonaires de souris contrôles (a et c) et exposées durant 28 jours (b et d), avec l'anticorps DMBT1 (a et b) et Ki-67 (c et d), en marron (grossissement x200). | 73 |
| Figure 39 : Comptages cellulaires de cellules pulmonaires marquées au DMBT1, sur une échelle de 1 à 4, chez les souris contrôles et exposées pendant 28 jours avec (a) ou sans (b) période de recouvrement ($p \leq 0,01^{**}$; $p \leq 0,001^{***}$ vs Contrôles). | 74 |
| Figure 40 : Comptages cellulaires de cellules pulmonaires marquées au Ki-67, exprimés en %, chez les souris contrôles et exposées pendant 28 jours avec (a) ou sans (b) période de recouvrement ($p \leq 0,01^{**}$; $p \leq 0,001^{***}$ vs Contrôles). | 74 |
| Figure 41 : Mesure de la capacité de liaison à l'ADN des sous-unités p52 et p65 du facteur de transcription NFkB. | 75 |
| Figure 42 : Mesure de l'expression de 12 cytokines. | 76 |
| Figure 43 : Nombre d'ARNm pulmonaires dérégulés chez les souris exposées aux PM _{2,5} par rapport aux souris contrôles. | 78 |
| Figure 44 : Diagramme de Venn présentant le nombre d'ARNm dérégulés spécifiques et communs entre les différents protocoles d'exposition. | 78 |
| Figure 45 : Corrélations des résultats obtenus par MicroArray et Rt-qPCR. | 80 |
| Figure 46 : Nombre de miARN pulmonaires dérégulés chez les souris exposées aux PM _{2,5} par rapport aux souris contrôles. (1M = 28 jours d'exposition, 1 MR = 28 jours d'exposition + recouvrement) ; (surexpression : FC ≥ 2 ; sous-expression : FC $\leq 0,5$). | 81 |
| Figure 47 : Diagramme de Venn présentant le nombre de miARN dérégulés spécifiques et communs entre les différents protocoles d'exposition. (1M = 28 jours d'exposition, 1 MR = 28 jours d'exposition + recouvrement). | 81 |

Liste des tableaux

| | |
|---|----|
| Tableau 1 : Valeurs guides préconisées par l'OMS et valeurs limites réglementaires pour la qualité de l'air extérieur. | 33 |
| Tableau 2 : Tissus, matrices, stockage et volets d'étude utilisés pour les approches toxicologiques. | 58 |
| Tableau 3 : Identification des gènes dérégulés en fonction du protocole d'exposition aux PM _{2,5} | 78 |
| Tableau 4 : Principales fonctions cellulaires et moléculaires identifiées par le logiciel IPA, chez les souris exposées 28 jours aux PM _{2,5} | 79 |
| Tableau 5 : Principales fonctions cellulaires et moléculaires identifiées par le logiciel IPA, chez les souris exposées 28 jours aux PM _{2,5} , suivie d'une période de recouvrement de 2 mois. | 79 |
| Tableau 6 : Identification des miARN dérégulés en fonction du protocole d'exposition aux PM _{2,5} | 81 |

Avant-propos

La pollution atmosphérique, pourtant réduite par rapport aux situations qui prévalaient il y a quelques décennies, exerce encore aujourd'hui des effets néfastes pour la santé de chacun, l'ensemble de la population humaine étant indéniablement sujette aux conséquences délétères d'une exposition à long terme. Même si, à ce jour, il reste très difficile de discerner avec certitude le(s) polluant(s) majoritairement impliqué(s) dans l'impact sanitaire de la pollution atmosphérique, les résultats des nombreuses études expérimentales et épidémiologiques supportent le rôle clé joué par la matière particulaire (ou particulate matter, PM), et plus particulièrement par les particules fines (PM_{2,5}). Il s'agit d'un mélange complexe de substances solides ou liquides, d'origine naturelle ou anthropique, dispersées dans l'atmosphère et dont l'exposition à des concentrations faibles ou modérées peut avoir des conséquences néfastes sur la santé à plus ou moins long terme. Les PM_{2,5} sont capables de pénétrer dans l'arbre respiratoire et de s'y déposer plus ou moins profondément après avoir été inhalées. Leur interaction avec l'épithélium bronchique est à l'origine de divers processus physiopathologiques ayant pour conséquences le développement et/ou l'exacerbation de pathologies respiratoires telles que des maladies inflammatoires chroniques ou des cancers. Le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC) a en effet classé la pollution de l'air extérieur, et plus particulièrement les PM, comme cancérigène pour l'homme (groupe 1), en raison d'une incidence accrue de cancers du poumon (CIRC, 2013). Bien que les préoccupations sanitaires soient désormais axées sur les PM_{2,5}, les mécanismes sous-jacents de toxicité restent encore mal élucidés. À ce jour, le stress oxydant et l'inflammation sont les deux principaux mécanismes physiopathologiques clairement identifiés comme impliqués dans la toxicité des PM_{2,5}, et activant des voies de signalisation et des facteurs de transcription nucléaires qui régulent l'expression de nombreux gènes impliqués dans d'autres mécanismes tels que la prolifération cellulaire, la mort cellulaire, et le remodelage tissulaire. Néanmoins, la persistance de ces mécanismes et des effets toxiques qui en résultent, même après l'arrêt de l'exposition aux particules, reste peu étudiée. C'est dans cette problématique que s'est inscrit mon projet de Diplôme d'Études Spécialisées de pharmacie, dont l'objectif général était d'apporter des éléments novateurs, nécessaires à l'amélioration des connaissances scientifiques, de même qu'à l'instauration et/ou à l'actualisation de mesures de prévention ayant pour finalité la protection des populations les plus exposées aux particules atmosphériques. La première partie de ce mémoire présentera un état de l'art sur le sujet ainsi que la problématique émergente de ce projet, la deuxième partie décrira les matériels et les méthodes employés tandis que la troisième partie exposera les résultats obtenus. Une dernière partie mettra en lumière les éléments novateurs apportés par ce projet ainsi que les perspectives envisagées.

PARTIE I : ÉTAT DE L'ART

I. LA POLLUTION ATMOSPHÉRIQUE

1) Généralités

La pollution de l'air, définie en 2011 par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) comme étant la contamination de l'environnement intérieur ou extérieur par tout agent chimique, physique ou biologique qui modifie les caractéristiques naturelles de l'atmosphère, constitue à l'heure actuelle un enjeu majeur de santé publique. En effet, l'OMS estimait en 2018 que 9 personnes sur 10 respiraient un air pollué dans le monde et que ceci était à l'origine de près de 7 millions de décès prématurés par an. Cette estimation a récemment été revue à la hausse dans une étude allemande, évaluant ce nombre à plus de 8,8 millions (1). Par ailleurs, l'Agence Européenne de l'Environnement (AEE) estimait en 2018 qu'en Europe 800 000 décès prématurés étaient annuellement imputables à la pollution de l'air. Dans un rapport plus récent datant de 2021, l'AEE a estimé qu'en 2019, les particules fines étaient responsables de 307 000 décès prématurés en Europe, contre respectivement 40 400 et 16 800 pour le dioxyde d'azote (NO₂) et l'ozone troposphérique (2). Au niveau national, Santé Publique France estimait en 2021 que chaque année près de 40 000 décès étaient attribuables à une exposition aux particules fines des personnes âgées de 30 ans et plus, représentant 7% de la mortalité en France et que cette dernière serait également responsable d'une diminution de l'espérance de vie de près de 8 mois (3). Il a ainsi été estimé en 2017 par le « Health Effects Institute » que la pollution de l'air était le 5^{ème} facteur de risque de mortalité dans le monde après les risques alimentaires, l'hypertension artérielle, le tabagisme et la glycémie à jeun élevée (4,5). En outre, il s'agit du premier facteur de risque environnemental pour la santé selon l'OMS.

Cette problématique n'est pourtant pas récente puisque des traces de pollution datant de l'époque Romaine ont été retrouvées dans les Alpes, par analyses au carbone 14. Cette pollution par des métaux tels que le plomb et l'antimoine s'explique par les émissions issues de l'activité minière intense de l'époque, nécessaire à la fabrication des pièces de monnaie et des canalisations alimentant les villes (6). Il faudra néanmoins attendre le milieu du 20^{ème} siècle et l'épisode dramatique du Grand smog de 1952 qui coûta la vie à plus de 12 000 londoniens, pour qu'une prise de conscience des effets sanitaires de la pollution atmosphérique ait lieu et que des législations soient mises en place.

2) Les principaux polluants de l'air

Les aérosols constituant la pollution atmosphérique se divisent en deux phases : l'une gazeuse, l'autre particulaire. Les principaux polluants constituant la phase gazeuse sont l'ozone (O₃), le dioxyde d'azote (NO₂), le dioxyde de soufre (SO₂), l'ammoniac (NH₃), le monoxyde de carbone, les composés organiques volatils (COV) et certains hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) composés de 2 ou 3 cycles aromatiques. La phase particulaire, quant à elle, est constituée de métaux lourds et de matières particulaires, plus souvent désignées par le terme anglais « particulate matter ».

II. LA POLLUTION ATMOSPHÉRIQUE PARTICULAIRE

1) Définition

Le terme « particule » désigne toute unité continue de solide ou de liquide, constituée de molécules maintenues entre elles par des forces intermoléculaires, et d'une taille supérieure à 1 nm ; une particule peut également désigner l'association de deux ou plusieurs unités de ce type, maintenues par des forces d'adhésion interparticulaires de telle sorte qu'elles agissent comme une seule unité en termes de suspension ou de déposition (7). Dans la littérature, ces dernières sont parfois retrouvées, de manière inappropriée, sous le terme d'« aérosols » qui englobe à la fois les particules mais également les gaz dans lesquels elles sont en suspension.

2) Classifications

a) En fonction de leur taille

Cette première classification est celle qui est la plus communément employée afin de distinguer les particules en suspension dans l'air. Ces dernières comprennent à la fois des particules solides et liquides pouvant rester dans l'air durant un temps de résidence variable. Il s'agit donc d'un mélange complexe de particules ayant des tailles et des formes géométriques différentes, mais également des masses et des densités distinctes. C'est pourquoi les matières particulaires sont, à l'heure actuelle, définies par leur diamètre aérodynamique équivalent (D_{ae}) qui correspond au diamètre d'une particule sphérique de masse volumique 1 g/cm^3 et dont la vitesse de chute est égale à celle de la particule considérée, en absence de turbulences et de vent. Cette notion permet ainsi de comparer des particules ayant des caractéristiques hétérogènes et de différencier 3 groupes de particules (figure 1) (8):

- Les **particules grossières** ou **PM_{10-2,5}** dont le D_{ae} est compris entre 10 et 2,5 μm et généralement issues de procédés mécaniques. Elles peuvent ainsi provenir aussi bien de phénomènes naturels tels que l'érosion minérale ou la génération d'embruns marins, ou avoir une origine anthropique par la remise en suspension de poussières présentes au niveau des sols, l'usure de la chaussée et des pneus ou la génération de poussières lors des chantiers de construction.
- Les **particules fines** ou **PM_{2,5}** dont le D_{ae} est égal ou inférieur à 2,5 μm et majoritairement liées aux activités anthropiques telles que les émissions des moteurs diesel ou les résidus de processus de combustion.
- Les **particules ultrafines** ou **PM_{0,1}** dont le D_{ae} est égal ou inférieur à 0,1 μm et essentiellement liées aux déchets de combustion de biomasse et de combustibles fossiles inhérents aux activités humaines.

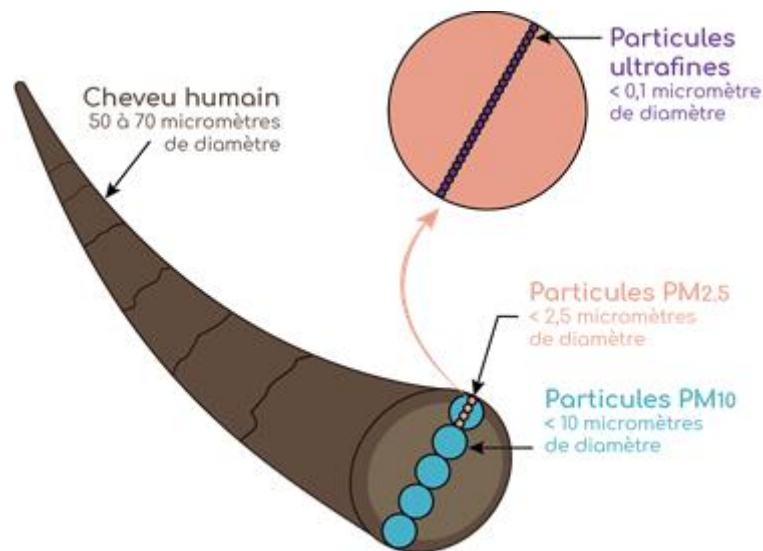


Figure 1 : Gamme de taille des particules atmosphériques, selon ATMO Grand Est - 2021 (8).

b) En fonction de leur nature primaire ou secondaire

Cette deuxième classification permet de classer les particules en aérosols primaires et secondaires.

- Les **particules primaires** sont directement rejetées dans l'atmosphère et peuvent être d'origine naturelle ou anthropique. Les principales sources naturelles sont les embruns marins, les cendres volcaniques, les particules de feux de forêt, le sable désertique et les dépôts terrigènes. Les particules primaires d'origine anthropique, quant à elles, proviennent principalement du secteur des transports automobiles (particules d'usure de freins et des pneus, combustion du carburant automobile...), du secteur industriel et énergétique (chantiers, traitement des déchets, raffineries...), du secteur résidentiel et tertiaire (combustion des énergies fossiles pour les chauffages domestiques au fioul ou au charbon...) et du secteur agricole.
- Les **particules secondaires** sont issues de transformations chimiques (nucléation, condensation puis coagulation) à partir de polluants gazeux déjà présents dans l'atmosphère et peuvent également être d'origine naturelle ou anthropique (figure 2) (9). Elles découlent principalement de la conversion des oxydes d'azote issus du trafic routier et des activités industrielles en nitrates ; du dioxyde de soufre issu des combustibles domestiques soufrés (charbon, gazole, lignite...), en sulfates ; mais également de l'ammoniac et des composés organiques volatils non méthaniques issus du secteur tertiaire et résidentiel (utilisation de solvants, combustion de bois...).

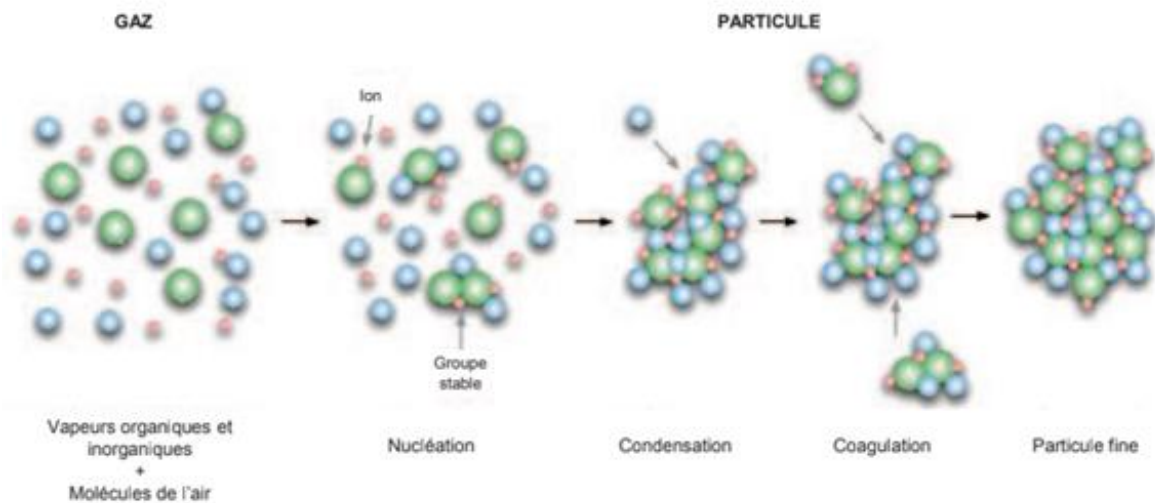


Figure 2 : Mécanismes de formation des particules secondaires (9).

c) En fonction de leur processus de formation

Cette troisième classification permet de distinguer les particules en fonction de leur processus de formation et de leur distribution granulométrique (figure 3) (10). Il est ainsi possible de classer les particules selon 3 modes (Whitby, 1977) :

- Le mode **nucléation** : composé des particules ultrafines, ayant un diamètre inférieur à $0,1 \mu\text{m}$, également appelées « noyaux d'Aitken ». Leur formation se fait par condensation de vapeurs chaudes au cours de phénomènes de combustion et dépend de la concentration en précurseurs gazeux, de la température et de l'humidité. Leur taille minimale explique le fait qu'elles ne contribuent que faiblement à la masse des aérosols de l'atmosphère bien qu'elles soient en nombre très important.
- Le mode **accumulation** : composé de particules ayant un diamètre compris entre $0,1$ et $2 \mu\text{m}$, formées par condensation de vapeurs sur les particules issues du mode nucléation ou par coagulation de ces dernières. Du fait de leur taille plus importante, ces particules contribuent considérablement à la masse des aérosols atmosphériques et peuvent rester plusieurs semaines en suspension dans l'air avant d'être éliminées par dépôts secs et humides dits de lessivages par précipitations.
- Le mode **sédimentation** : composé de particules ayant un diamètre supérieur à $2 \mu\text{m}$, issues de procédés mécaniques d'origine naturelle (mise en suspension de poussières volcaniques ou désertiques, soulèvement d'embruns marins...) ou anthropique (érosion éolienne, pollution industrielle...). Cette catégorie de particules ne contribue que faiblement à la concentration en nombre des aérosols atmosphériques mais participe activement à leur masse totale. Du fait de leur taille importante, leur durée de vie dans l'atmosphère n'est que de quelques heures à quelques jours.

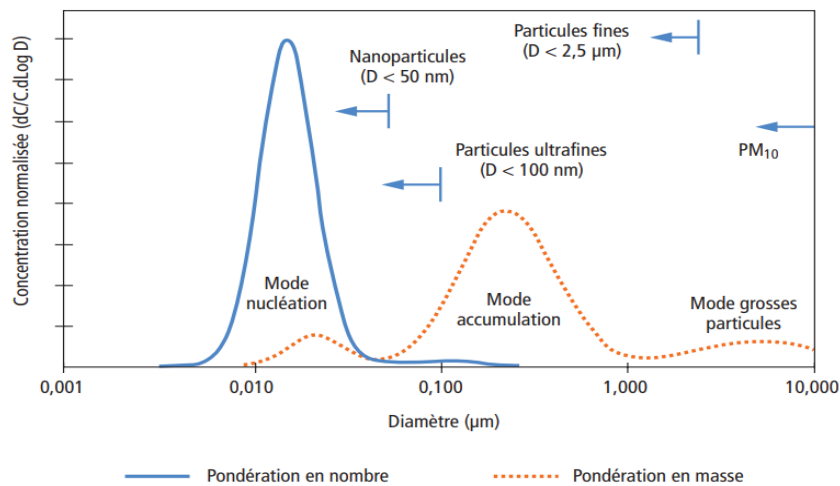


Figure 3 : Répartition en nombre (concentration) et en taille des particules en fonction de leur mode de formation (10).

d) En fonction de leur source

i. Sources naturelles

Les émissions de particules naturelles, n'étant pas liées aux activités humaines, ne peuvent pas être contrôlées contrairement aux émissions de particules anthropogéniques. Ces particules naturelles sont issues de 3 sources principales : terrigène, marine et biogénique. Outre ces sources majoritaires, des sources épisodiques sont également décrites.

- La source **terrigène** : L'érosion éolienne des sols est le phénomène contribuant le plus à cette source terrigène. Ces particules minérales sont majoritairement constituées de silicates, de carbonates, de sulfates de calcium et d'oxydes de fer. Leur composition peut néanmoins varier en fonction de leur provenance géographique et de la géologie de leur milieu d'origine. Ce processus concerne également les sables désertiques qui ont la capacité de migrer sur de longues distances. En effet, plusieurs études épidémiologiques ont montré un lien entre les épisodes de pollution aux poussières sahariennes et une élévation du nombre de personnes souffrant de troubles respiratoires ainsi qu'une augmentation du taux de mortalité journalier dans plusieurs pays européens (11–14).
- La source **marine** : Les sels et embruns marins, issus de l'assèchement de gouttelettes d'eau de mer éjectées dans l'atmosphère suite aux déferlements des vagues, contribuent également de manière importante au pool de particules naturelles. Ces aérosols marins sont principalement composés de chlorure de sodium (NaCl), de sulfates de sodium (Na₂SO₄), de magnésium (MgSO₄) ou de potassium (K₂SO₄) (15).
- La source **biogénique** : Ces particules sont émises directement dans l'atmosphère par les végétaux. Il s'agit notamment des spores, des pollens, des terpènes et de divers débris végétaux.
- Les sources **épisodiques** : Feux de forêt, éruptions volcaniques...

ii. Sources anthropiques

Les sources anthropiques, qu'elles soient fixes ou mobiles, constituent la principale source des particules atmosphériques. Entre 1990 et 2020, une diminution de 65 % des émissions de PM₁₀ et de 73 % des émissions de PM_{2,5} a été observé (figure 4) (16). Cela s'explique l'amélioration des chauffages au bois, l'optimisation du parc automobile avec notamment l'utilisation de filtres à particules, le développement des normes Euro et l'apparition des certificats de qualité de l'air, l'utilisation de dépoussiéreurs sur les sites de production minérale et la diminution des chantiers de construction à la suite de la crise économique de 2008 (17).

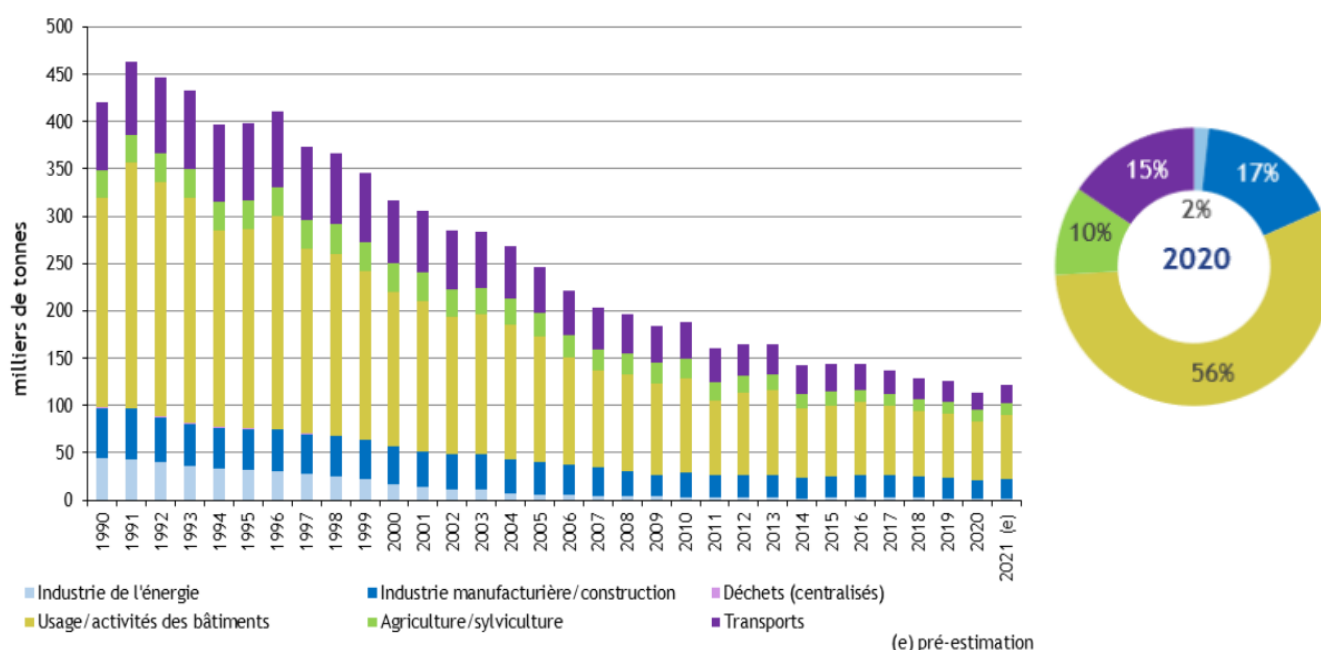


Figure 4 : Évolution des émissions dans l'air de PM_{2,5} depuis 1990 en France (Métropole), selon CITEPA - 2022.

Les principaux secteurs responsables de ces émissions sont :

- Le secteur des **bâtiments** et activités **tertiaires et résidentielles** : représenté par les émissions liées aux activités dans les bâtiments d'habitation et d'entreprises, commerces, institutions et services publics. Il comprend les produits de combustion des appareils de chauffage (i.e, bois, fioul et charbon), l'utilisation de solvants, de l'air conditionné ou encore la consommation de tabac. En 2020, ces émissions représentaient respectivement 71 %, 56 % et 34 % des PM₁, des PM_{2,5} et des PM₁₀.
- Le secteur de l'**industrie manufacturière** : représenté majoritairement par les activités métallurgiques et de cimenterie, les chantiers de construction et par le traitement des déchets et des eaux usées. En 2020, ces émissions représentaient respectivement 13 %, 17 % et 25 % des PM₁, des PM_{2,5} et des PM₁₀.

- Le secteur **agricole et sylvicole** : représenté majoritairement par les émissions liées aux élevages, aux cultures et aux engins/moteurs agricoles (e.g., labours des sols, fermentation des fourrages, consommation de combustibles fossiles). En 2020, les particules issues de l'agriculture représentaient 3 %, 10 % et 27 % des PM₁, des PM_{2,5} et des PM₁₀, respectivement.
- Le secteur du **transport** de marchandises et de personnes : représenté majoritairement par le transport routier mais également par les activités ferroviaires, maritimes et aériennes. Il comprend à la fois les émissions liées à la combustion des combustibles et à l'évaporation de l'essence mais aussi aux abrasions des pneus et freins. En 2020, ces émissions représentaient respectivement 11 %, 15 % et 13 % des PM₁, des PM_{2,5} et des PM₁₀.
- Le secteur de l'**énergie** : représenté par les émissions liées à l'extraction, la production et la distribution de l'énergie. En 2020, ces émissions représentaient 2 %, 2 % et 1 % des PM₁, des PM_{2,5} et des PM₁₀, respectivement.

3) Caractéristiques physiques et composition chimique

La composition chimique des particules est difficile à définir avec précision de par sa grande hétérogénéité et complexité. En effet, celle-ci est variable en fonction de leurs sources d'émissions, qu'elles soient naturelles ou anthropiques et est également évolutive d'un point de vue physico-chimique puisqu'en constante évolution dans l'atmosphère du fait des conditions météorologiques et géographiques. C'est pourquoi la composition des particules détermine leurs propriétés physico-chimiques et notamment leur devenir dans l'organisme (i.e., distribution et persistance), de même que leur potentiel oxydant, allergisant et cancérigène. La composition chimique des particules est donc un élément majeur conditionnant la toxicité et l'impact sanitaire de ces dernières.

À titre d'exemple, l'évaluation de la composition chimique moyenne des PM_{2,5} réalisée au sein de plusieurs zones rurales européennes par le réseau « European Monitoring and Evaluation Programme » (EMEP) entre 2011 et 2019 montre une variation de la composition chimique en fonction du lieu de prélèvement bien que les composants majoritaires soient similaires (18) (figure 5). Cela avait également été démontré en milieu urbain dans une étude menée en 2010 dans plusieurs dizaines de villes européennes (19).

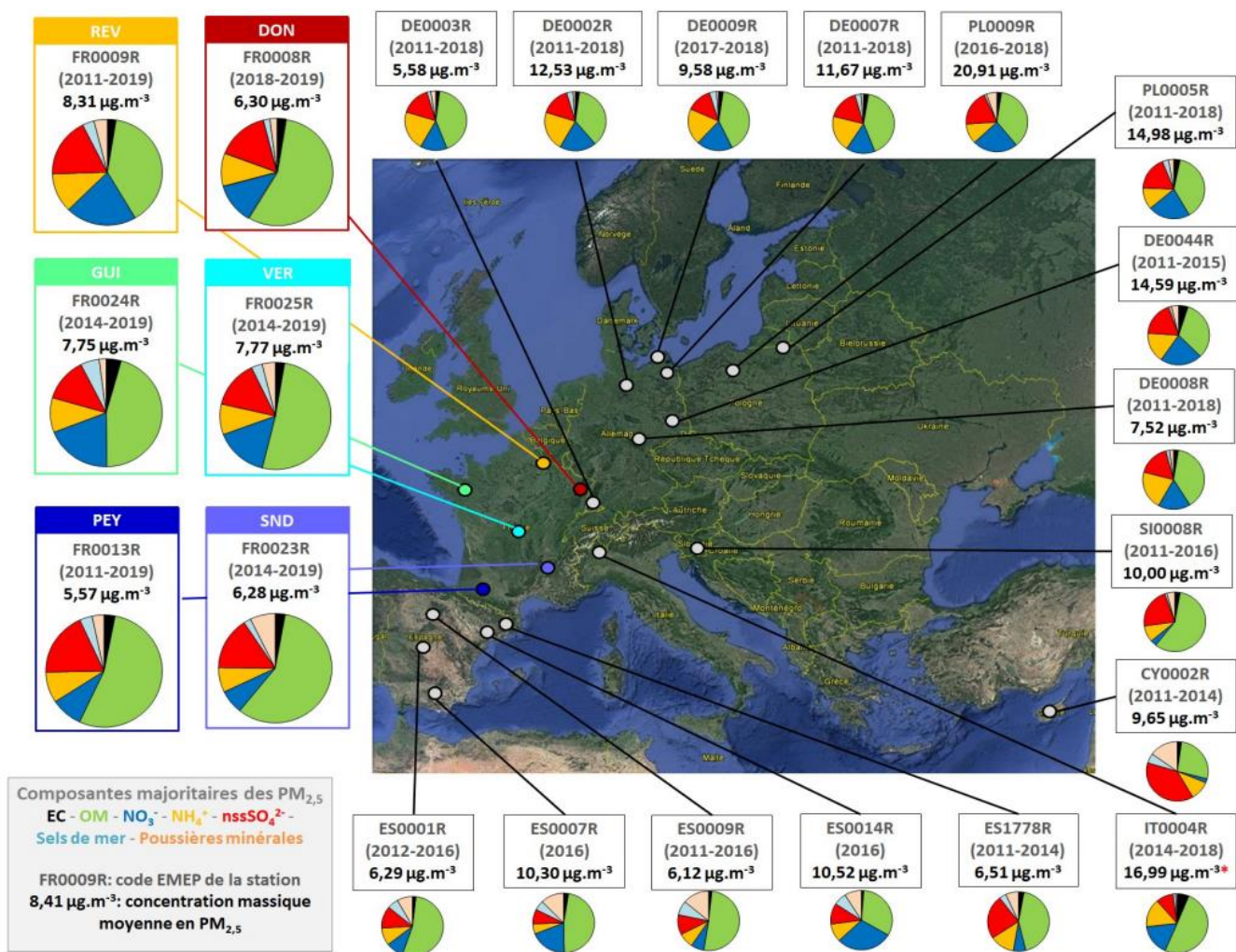


Figure 5 : Composition relative moyenne des PM_{2,5} observées aux stations du réseau EMEP entre 2011 et 2019 (18).

a) Fraction carbonée

Cette fraction carbonée qui constitue 20 à 50 % de la masse totale des particules atmosphériques, est constituée d'une composante organique et d'une composante élémentaire également désignée par le terme de « carbone noir » (« black carbon ») ou « carbone suie » (20). Il a également été estimé que cette fraction carbonée constituerait 25 à 40 % de la masse totale des PM₁₀ en Europe et 30 à 50% de celle des PM_{2,5}, en faisant l'un des composants majeurs des particules atmosphériques (19).

- Le **carbone élémentaire** (CE), principalement d'origine primaire, est issu de sources anthropiques à la suite de processus de combustion incomplète de combustibles fossiles (e.g., gaz, charbon, fioul) ou de biomasse (e.g., bois, matières végétales). Cet élément, qui constitue le cœur des particules, peut donc provenir de différentes sources, notamment du trafic routier (e.g., utilisation de moteurs diesels, abrasion des pneus), des émissions industrielles ou encore des chauffages domestiques. A la surface de ce noyau carboné, sont capables de se condenser des xénobiotiques, notamment des composés

organiques semi-volatils tels que des HAP ou des pesticides, pouvant avoir des effets délétères sur l'organisme. Cette capacité d'absorption est directement liée à la surface spécifique de la particule. Cette dernière est une mesure s'appliquant aux solides granulaires ou particulaires et qui correspond à la surface totale par unité de masse d'un solide divisé. Elle prend en compte la surface individuelle de chaque grain ainsi que la surface présentée par les pores entre les grains. Elle s'oppose donc à la notion de surface apparente d'un solide puisqu'il s'agit donc de considérer toute la surface de chaque particule, porosité ouverte comprise. Elle est déterminée à partir de la quantité de molécules de gaz pouvant être adsorbée à la surface du solide et s'exprime en m^2/g . Ainsi, les particules les plus petites ($\text{PM}_{2,5}$ et $\text{PM}_{0,1}$) possèdent une surface spécifique élevée, de l'ordre de quelques m^2/g pour les $\text{PM}_{2,5}$ à quelques centaines de m^2/g pour les $\text{PM}_{0,1}$ (e.g, dioxyde de titane : 10 à 300 m^2/g), faisant d'elles des entités sur lesquelles des molécules organiques gazeuses pourront s'adsorber et pouvant être à l'origine de multiples réactions physico-chimiques au niveau de l'interface entre les particules et le milieu ambiant. Ce phénomène est appelé « réactivité de surface ». La surface spécifique et la porosité influencent à la fois la pénétration, la rétention et l'excrétion dans l'arbre respiratoire de ces composés gazeux, et sont donc responsables de leurs effets sur la santé.

- Le **carbone organique** (CO), d'origine primaire ou secondaire, peut quant à lui être issu de sources anthropiques (combustion) ou naturelles (e.g., émissions biogéniques, sels marins). Il s'agit d'un mélange complexe de centaines de composés aux propriétés physico-chimiques variées. Parmi eux sont retrouvés des alcanes, des alcènes, des aldéhydes, des cétones, des quinones, des acides carboxyliques mais aussi des HAP, des COV et des polychlorobiphényles (PCB), connus pour leur capacité à induire des effets cancérogènes et mutagènes (7). En effet, parmi les centaines d'HAP connus à ce jour, 16 ont été classés parmi les polluants prioritaires en matière d'exposition potentielle et d'effets néfastes sur la santé humaine par l'Agence américaine de Protection de l'Environnement (US-EPA). Or, il a été estimé que 59 à 97 % des HAP présents dans l'air étaient adsorbés par les particules atmosphériques (21).

b) Fraction métallique

Les éléments métalliques, présents en très faible proportion au sein des particules, proviennent de sources multiples (22). Les métaux provenant de sources anthropiques (e.g., As, Cd, Cr, Cu, Ni, Pb, V, Zn) telles que les activités métallurgiques (e.g., sidérurgie, raffinerie), de combustion (e.g. incinération des déchets) ou le trafic routier (e.g., abrasion des pneus, usure des freins), sont retrouvés en plus grande proportion dans la fraction fine des particules. A contrario, les métaux issus de sources naturelles (e.g., Al, Ca, Fe, K, Mn, Mg, Si) notamment des éruptions volcaniques, de l'érosion des roches ou de la croûte terrestre, sont majoritairement retrouvés dans la fraction grossières des particules. Bien que les concentrations en métaux composant

les particules soient faibles, ceux-ci ont un impact sanitaire important. Cela s'explique par la capacité de certains métaux de transition (e.g., Cr, Cu, Fe, Ni, V) à générer des espèces radicalaires, notamment des radicaux hydroxyles ($^{\circ}\text{OH}$) par l'intermédiaire de la réaction de Fenton (23–27). Cette dernière consiste en la décomposition d'un oxydant puissant, le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , par les oxydes de fer, aboutissant à la formation d'un radical hydroxyle, espèce radicalaire très réactive. Ce radical est capable de réagir avec l'ensemble des macromolécules cellulaires (e.g., protéines, lipides, ADN) et d'induire un stress oxydant (28,29). Des études expérimentales ont ainsi montré que les métaux de transition composant les particules avaient des conséquences cardiovasculaires et pulmonaires néfastes telles qu'une augmentation de la fréquence cardiaque et/ou une diminution de la fonction pulmonaire, responsables d'une augmentation du nombre d'hospitalisations et de la mortalité (30–33).

c) Fraction inorganique

Cette fraction est l'une des fractions majoritaires des particules atmosphériques, pouvant atteindre en Europe, 43 % de la masse totale des $\text{PM}_{2,5}$ prélevées dans un site rural (34) et jusqu'à 56 % des PM_{10} prélevées dans un site urbain (35). Elle regroupe l'ensemble des espèces ioniques dont principalement les ions hydrosolubles de sulfate (SO_4^{2-}), nitrate (NO_3^-) et ammonium (NH_4^+) dont la somme des concentrations peut atteindre 40 à 65 % du poids total des particules fines (36). Ces derniers sont retrouvés en proportion importante sous forme de sels (sulfates d'ammonium $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, nitrate d'ammonium (NH_4NO_3) formés dans l'atmosphère à partir de précurseurs gazeux tels que l'ammoniac (NH_3), l'acide nitrique (HNO_3) et l'acide sulfurique (H_2SO_4). On parle alors d'« aérosols inorganiques secondaires ». Les ions chlorure (Cl^-), sodium (Na^+), calcium (Ca^{2+}), magnésium (Mg^{2+}) et potassium (K^+) sont également retrouvés de manière importante au sein de cette fraction. L'origine de ces derniers est multiple, pouvant être naturelle (e.g., crustale ou marine) ou anthropique (e.g., engrais, sidérurgie). En effet, les embruns marins sont majoritairement composés des ions Cl^- , Mg^{2+} et Na^+ (37) tandis que les poussières crustales renferment plutôt des ions Ca^{2+} , Mg^{2+} et K^+ (38). Ce dernier est également associé à la combustion de biomasse et de charbon (39).

d) Fraction biologique

La fraction biologique, bien que pouvant contribuer jusqu'à 5% de la composition des $\text{PM}_{10-2,5}$, est souvent négligée dans la caractérisation chimique des particules (40). Elle présente une importante hétérogénéité, puisque constituée de nombreux microorganismes tels que des bactéries dont le diamètre est compris entre 2 et 5 μm , des virus dont le diamètre est inférieur à 2 μm , des champignons et des protozoaires, mais également des spores fongiques, des pollens, des algues, des débris organiques et des constituants membranaires des bactéries à Gram négatif, appelées endotoxines. C'est pourquoi les PM constituent un vecteur considérable pour le transport d'allergènes et de microorganismes potentiellement pathogènes. Ceci est le cas, par exemple, pour *Pseudomonas aeruginosa* et SARS-COV-2 (41).

4) Réglementations et normes internationales et nationales

C'est à la suite du grand smog de Londres de 1952 que sont apparues les premières réglementations visant à améliorer la qualité de l'air au Royaume-Uni, avec la publication de la loi du « clean air act » en 1956. Cette problématique deviendra une préoccupation politique européenne majeure dans les années qui suivirent.

La réglementation européenne actuelle impose, par l'intermédiaire de la directive 2008/50/CE, des valeurs réglementaires de concentration des polluants atmosphériques et notamment des particules (tableau 1), qui se doivent d'être respectées par l'ensemble des états membres sous peine de sanction. Cette directive, qui a par la suite été transposée au droit français par le biais de l'article R 221-1 du code de l'environnement, intègre des normes de qualité de l'air qui diffèrent selon les polluants. Ces normes sont basées sur la masse totale de particules et ne prennent pas en compte la source et la composition physico-chimique de ces dernières. En ce qui concerne les particules atmosphériques, la réglementation française actuelle ne prend en compte que les PM₁₀ et PM_{2,5}, et n'inclut donc pas les PM_{0,1} du fait des connaissances encore limitées les concernant à ce jour. Ainsi, pour les PM₁₀, la valeur limite pour la protection de la santé est de 40 µg/m³ en moyenne annuelle tandis qu'elle est de 25 µg/m³ pour les PM_{2,5}. La moyenne journalière de 50 µg/m³ ne doit également pas être dépassée plus de 35 jours par an pour les PM₁₀. Néanmoins, cette limite de 35 dépassements annuels est fréquemment observée dans les grandes agglomérations françaises.

En 1987, l'OMS a également publié des lignes directrices relatives à la qualité de l'air concernant 28 polluants atmosphériques. Ces dernières ont fait l'objet d'une mise à jour en 2005 puis plus récemment en 2021 (tableau 1) et visent à « *informer les responsables de l'élaboration des politiques et à fournir des cibles appropriées à toute une série d'actions à mener pour la prévention de la pollution atmosphérique dans les différentes parties du monde. Elles constituent l'évaluation la plus largement reconnue et la plus actuelle des effets de la pollution aérienne sur la santé. Elles préconisent des objectifs de qualité de l'air qui réduisent fortement les risques sanitaires.* » Elles recommandent ainsi de respecter les limites de 15 µg/m³ en moyenne annuelle et 45 µg/m³ en moyenne journalière pour les PM₁₀ et de 5 µg/m³ en moyenne annuelle et 15 µg/m³ en moyenne journalière pour les PM_{2,5}.

Tableau 1 : Valeurs guides préconisées par l'OMS et valeurs limites réglementaires pour la qualité de l'air extérieur.

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

5) Niveaux d'exposition des populations

Bien qu'une diminution conséquente des concentrations moyennes annuelles en $PM_{2,5}$ au sein des pays membres de l'Organisation de Coopération et de Développement Économique (OCDE) soit observée depuis 1990, passant de $18,2 \mu\text{g}/\text{m}^3$ en 1990 à $15,1 \mu\text{g}/\text{m}^3$ en 2015, l'exposition moyenne aux $PM_{2,5}$ de la population demeure élevée (figure 6) (42). En effet, en 2019, cette dernière était supérieure au niveau préconisé par l'OMS, qui était alors de $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$, dans la moitié des pays de l'OCDE (figure 7) (43). À l'heure actuelle, l'OMS estime que 92 % de la population mondiale vit dans des endroits où les niveaux de qualité de l'air dépassent ses valeurs guides (figure 8) ; ces niveaux étant exceptionnellement élevés dans certains pays d'Asie, du Moyen-Orient et d'Afrique du fait de la concentration des populations en milieu urbain et de l'utilisation intensive de la voiture. En 2021, l'OMS a revu à la baisse la valeur indicative pour les $PM_{2,5}$, évoluant de 10 à $5 \mu\text{g}/\text{m}^3$ afin de refléter les preuves croissantes des effets sur la santé de l'exposition à de très faibles niveaux de particules fines.

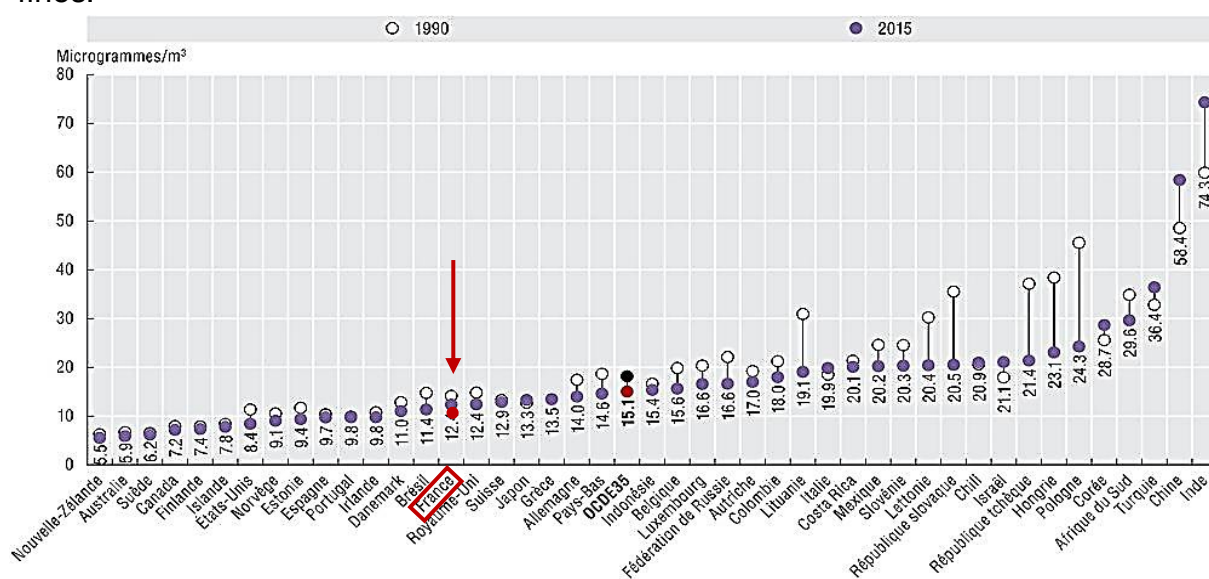


Figure 7 : Exposition annuelle moyenne de la population aux $PM_{2,5}$, en $\mu\text{g}/\text{m}^3$ en 1990 et en 2015 (42).

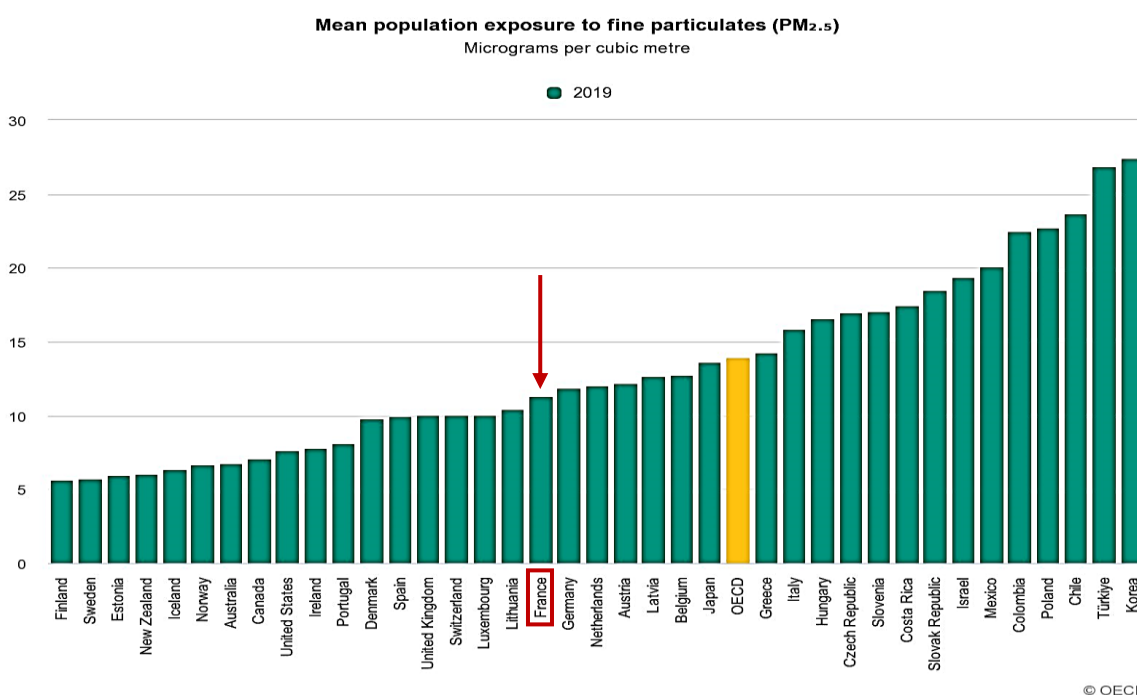


Figure 6 : Exposition moyenne de la population aux $PM_{2,5}$, en $\mu\text{g}/\text{m}^3$, en 2019 (43).

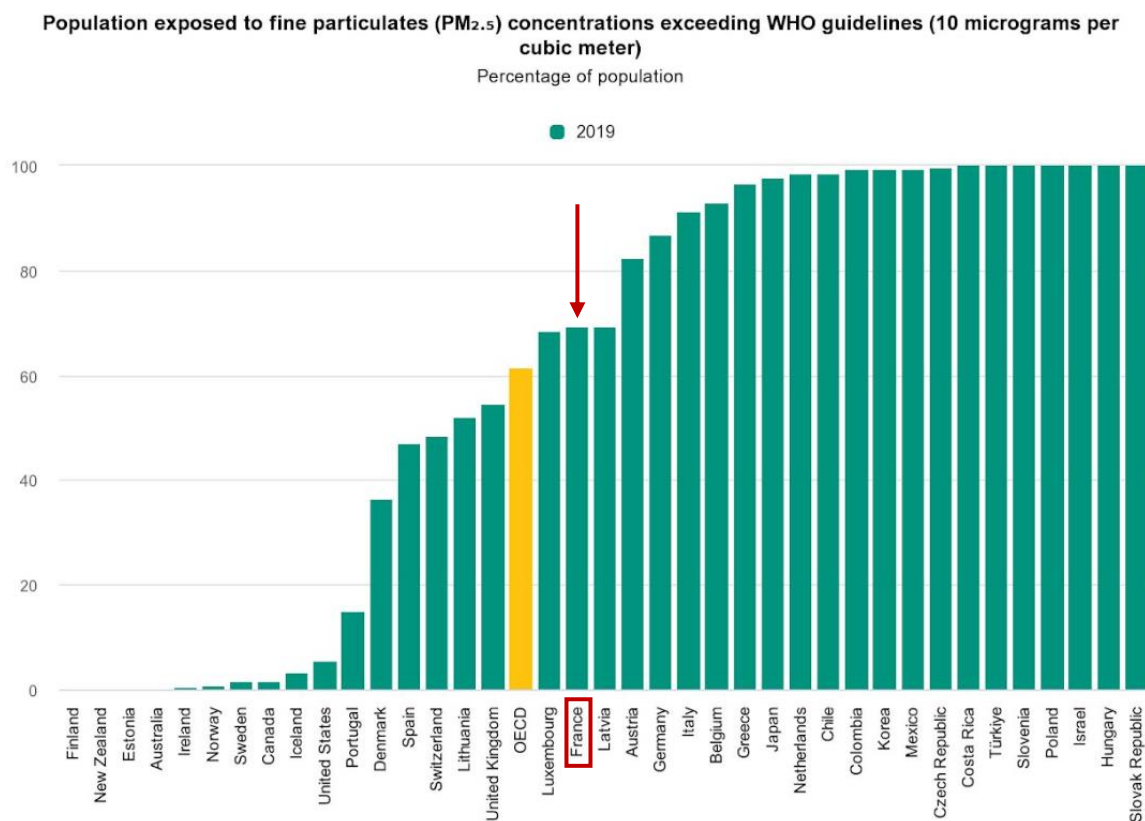


Figure 8 : Pourcentage de la population exposé à des concentrations de PM_{2,5} supérieures aux valeurs recommandées par l'OMS (10 µg/m³), 2019 (43).

III. APPAREIL RESPIRATOIRE : PORTE D'ENTRÉE ET CIBLE PRINCIPALE DES PARTICULES FINES

1) Physiologie de l'appareil respiratoire

L'appareil respiratoire constitue une zone d'échanges gazeux entre le sang de l'organisme et l'environnement extérieur et contribue plus précisément à l'absorption du dioxygène O₂ et au rejet du dioxyde de carbone CO₂ au niveau alvéolaire (figure 9). Il s'agit d'un organe très complexe riche en capillaires, comprenant une quarantaine de types cellulaires chez l'Homme et constituant une large surface d'échange allant de 75 à 100 m². De par sa fonction, il représente une cible privilégiée pour les polluants particulaires et divers agents toxiques présents dans l'air. Deux types de voies sont distinguées :

- Les **voies aériennes supérieures** comprenant : les fosses nasales, le pharynx et le larynx. Ce sont des structures tubulaires flexibles qui filtrent, humidifient et règlent la température de l'air inspiré.
- Les **voies aériennes inférieures** (ou appareil broncho-pulmonaire) comprenant la trachée, les bronches, les bronchioles et alvéoles.

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

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

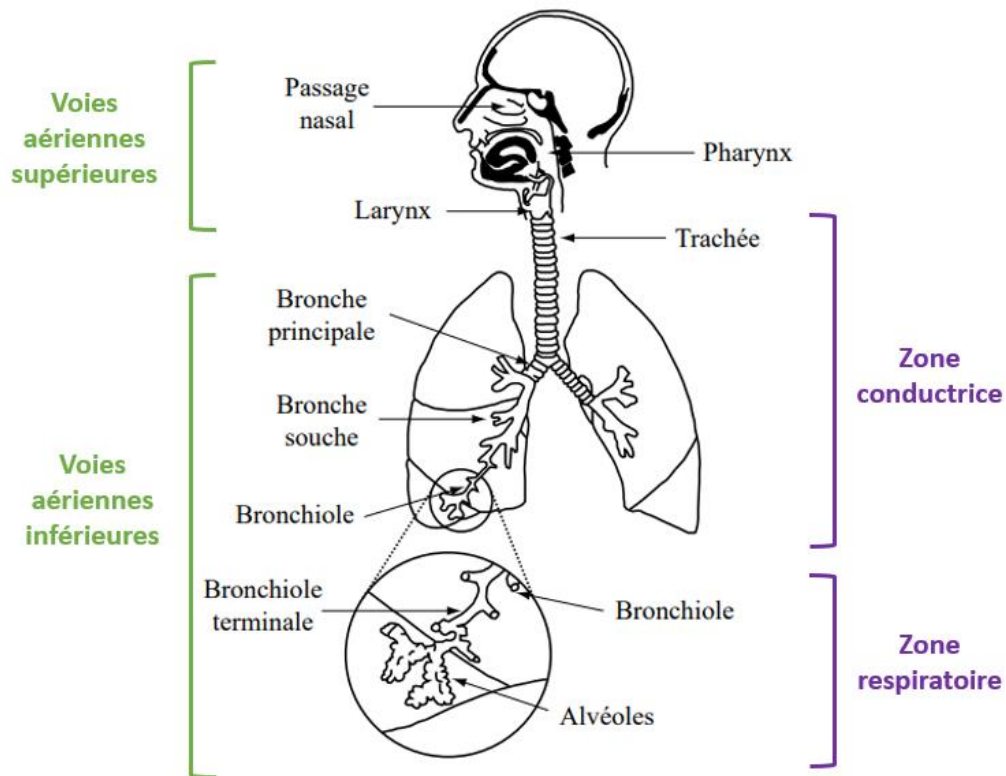


Figure 9 : Anatomie de l'appareil respiratoire.

2) Histologie de l'épithélium bronchique

Afin d'assurer les fonctions spécifiques aux différentes régions des voies aériennes inférieures, les types cellulaires évoluent tout au long du parcours respiratoire (figure 10). Ainsi, l'**épithélium bronchique**, qui constitue la première ligne de défense face aux agressions extérieures, est prismatique pseudostratifié et comprend un épithélium de revêtement composé de cellules ciliées participant à la clairance mucociliaire, de cellules caliciformes sécrétant du mucus recouvrant cette formation ciliaire et formant un tapis muqueux ainsi que des cellules basales constituant une population de réserve et de renouvellement cellulaire (44). Cet ascenseur muco-ciliaire permet de faire remonter 90 % des particules inhalées vers le carrefour aéro-digestif où elles seront dégluties ou expectorées, constituant ainsi la première ligne de défense des voies aériennes (45). En plus des cellules ciliées et basales, l'**épithélium bronchiolaire**, quant à lui, comprend également des cellules de Clara, cellules sécrétoires prismatiques non ciliées. Ces dernières sont les uniques cellules présentes dans les bronchioles les plus distales et constituent ainsi des cellules de transition entre la zone conductrice de l'air et la zone respiratoire servant aux échanges gazeux (46). Enfin, l'**épithélium alvéolaire** est un épithélium non cilié constitué de pneumocytes de type 1, cellules aplaties et incapables de se diviser et ayant une fonction de fine barrière à travers laquelle s'effectuent les échanges gazeux entre le sang et l'air, et de pneumocytes de type 2 qui produisent et sécrètent le surfactant qui possède des propriétés tensio-actives permettant le maintien de la structure de l'alvéole. Le tapis mucociliaire n'étant plus effectif à cet étage, ceux sont les macrophages alvéolaires qui vont prendre le relais face aux agents extérieurs par l'intermédiaire du mécanisme de phagocytose, constituant la seconde ligne de défense

de l'appareil respiratoire. Ces macrophages sentinelles sont majoritairement éliminés par l'ascenseur mucociliaire au niveau bronchiolaire ou par le système lymphatique. Ainsi, tout au long des voies respiratoires inférieures, la structure de l'épithélium varie, passant progressivement d'un épithélium prismatique pseudostratifié à un épithélium cylindrique unistratifié puis cubique simple. La troisième ligne de défense est assurée par la présence de jonctions serrées qui jouent le rôle de barrière physique et assurent l'imperméabilité de l'épithélium vis-à-vis des agents extérieurs.

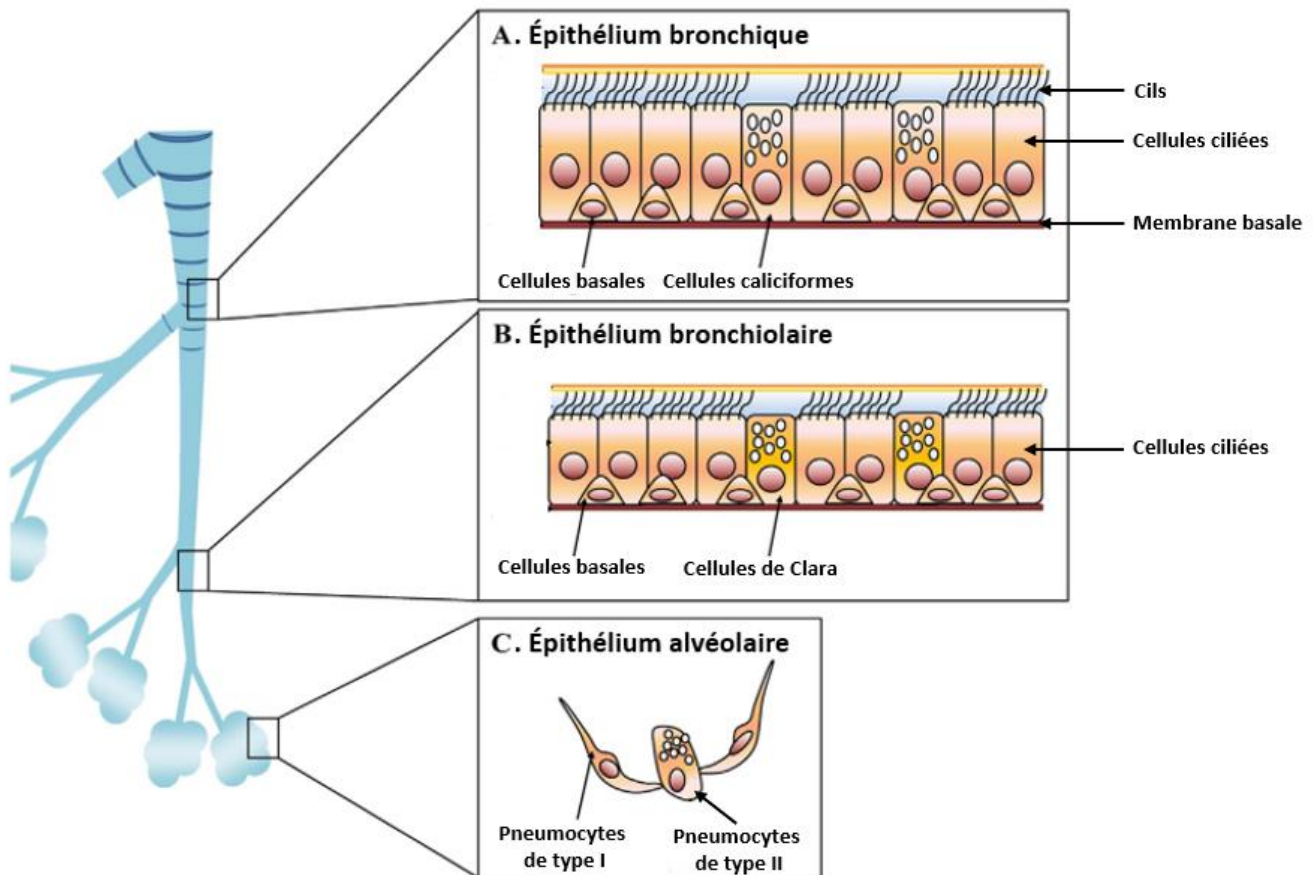


Figure 10 : Structure de l'épithélium des voies respiratoires, adaptée de Adam.D – 2014

3) Interactions des particules avec l'appareil respiratoire

Les principales voies d'entrée des particules atmosphériques sont le nez et la bouche, faisant de l'appareil respiratoire la cible principale de ces dernières. La toxicité des particules ne dépend pas uniquement de leur composition chimique mais aussi de leur niveau de pénétrance au niveau pulmonaire et de la localisation de leur dépôt. Ces derniers peuvent être influencés par différents facteurs dont (47) :

- Leurs **caractéristiques intrinsèques** telles que la densité, la charge, la granulométrie, la forme, la capacité hygroscopique qui conditionnent leur comportement aérodynamique et physicochimique.
- La **morphologie pulmonaire** qui est propre à chaque individu, la température et l'humidité de l'arbre bronchique.
- La **physiologie respiratoire** : fréquence respiratoire, débit et la turbulence résultante du flux d'air.

- Les **paramètres individuels** tels que l'âge, le sexe et les antécédents médicaux, notamment la présence de pathologies sous-jacentes de type asthme et bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO).

Après inhalation, les particules vont se déposer tout au long du tractus respiratoire principalement en fonction de leur Dae (figure 11) (48). Plus leur taille est faible, plus leur pénétration se fera en profondeur au sein de l'appareil respiratoire. Ainsi, les particules dont le Dae est supérieur à 10 μm sont évacuées au niveau du nasopharynx après s'être déposées par impaction au niveau de l'épithélium et sont éliminées par déglutition ou expectoration. Les PM_{10} , quant à elles, pénètrent jusqu'à l'étage trachéobronchique, se déposent préférentiellement par sédimentation et sont rapidement éliminées par clairance mucociliaire. Les $\text{PM}_{2,5}$ migrent jusqu'aux alvéoles, se déposent par diffusion et sont éliminées par la clairance macrophagique. Cette dernière se déroule beaucoup plus lentement que la clairance mucociliaire, ayant pour conséquence une possible rétention des particules durant plusieurs semaines et un remodelage bronchique. Enfin, les $\text{PM}_{0,1}$ se déposent tout au long de l'arbre respiratoire et sont capables d'atteindre d'autres organes cibles par translocation systémique.

Il est ainsi possible de distinguer 3 régions principales de dépôt des particules : les régions **nasopharyngées**, **trachéobronchique** et **alvéolaire**. Les particules ultrafines se déposent essentiellement au niveau des régions trachéobronchique et alvéolaire, de façon plus importante que les particules fines. Dans ces deux régions de l'arbre respiratoire, le dépôt est idéal pour les particules ayant un diamètre compris entre 1 et 100 nm. En dessous de 1 nm, les particules sont soumises au mouvement brownien et ont une pénétrance moindre. A contrario, les particules ayant un diamètre supérieur à 100 nm se déposent majoritairement dans la région nasopharyngée, étant soumises aux phénomènes d'impaction et d'interception.

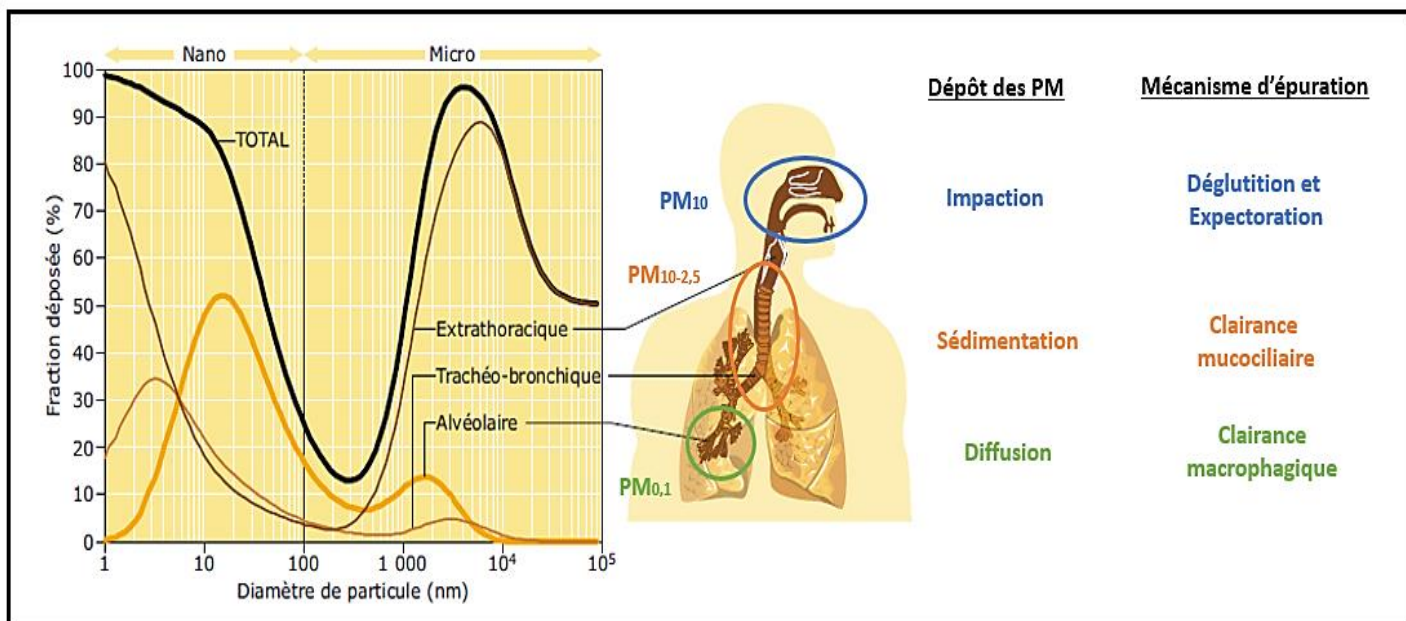


Figure 11 : Pénétration, dépôt et principaux mécanismes pulmonaires d'élimination des particules atmosphériques, adaptée de l'INRS (48)

Le dépôt de ces particules dans l'appareil respiratoire dépend de 5 mécanismes principaux (figure 12) (49) :

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

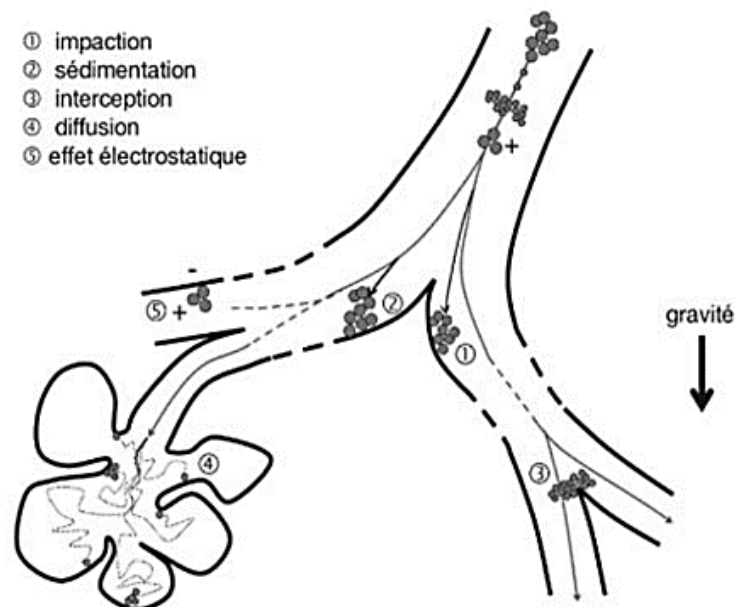


Figure 12 : Mécanismes de dépôt des particules inhalées dans les voies respiratoires (49).

IV. MÉCANISMES DE TOXICITÉ PULMONAIRE DES PARTICULES FINES

1) Potentiel oxydant des PM_{2,5} et stress oxydant

L'oxygène est un élément indispensable à la production d'énergie (adénosine triphosphate, ATP) de nombreux organismes vivants. Ce processus, nommé phosphorylation oxydative, se fait par l'intermédiaire de chaînes de transport d'électrons dans la membrane interne mitochondriale et génère des espèces réactives de l'oxygène (ERO) indispensables au métabolisme physiologique en intervenant dans la défense anti-infectieuse, les voies de signalisation intra-cellulaires ou la division cellulaire (50,51). Ces ERO sont des molécules instables et réactives possédant un électron libre (e.g., $O_2^{\cdot-}$, RO_2^{\cdot} , $^{\cdot}OH$), pouvant intervenir sur différents composants cellulaires et induire d'importantes modifications fonctionnelles généralement définitives, à l'origine de dommages biologiques irréversibles. Au niveau des phospholipides membranaires, elles peuvent être impliquées dans des phénomènes de peroxydation lipidique, à l'origine d'une perturbation de l'intégrité membranaire et d'une altération fonctionnelle des récepteurs de cette dernière, pouvant conduire à la mort cellulaire. Ce processus génère de nombreux produits d'oxydation pouvant être dosés dans les fluides biologiques, tels que le 8-isoprostane (8-IsoP), le 4-Hydroxynonanal (4-HNE) ou le malondialdéhyde (MDA). Les ERO peuvent également agir au niveau des acides aminés constitutifs des protéines, induisant une altération fonctionnelle de ces dernières et parfois une détérioration de l'activité des enzymes (52). Il est ainsi possible qu'un récepteur ne soit plus reconnu par son ligand naturel. Les acides nucléiques constituent également une cible préférentielle des ERO et notamment du radical hydroxyle qui est formé lors de l'oxydation des métaux de transition par le peroxyde d'hydrogène en suivant la réaction de Fenton. En effet, leur oxydation conduit à une altération des gènes par cassures et/ou mutations et à la génération d'adduits mutagènes et cancérigènes. À titre d'exemple, l'oxydation de la guanosine induit la formation de la 8-hydroxy-2'-déoxyguanosine (8-OHdG) ou de la 8-hydroxyguanosine (8-OHG) (51). Afin de maintenir un état d'homéostasie redox et éviter l'apparition de ces lésions oxydatives, la cellule contrôle la concentration en ERO à l'aide, notamment, de systèmes de défenses antioxydantes de nature enzymatique tels que les enzymes de détoxification (e.g., Hème Oxygénase 1 (HO-1), NAD(P)H Quinone Dehydrogenase 1 (NQO1), Superoxyde Dismutase (SOD), Glutathione peroxidase (GPX), Glutathione reductase, catalase (CAT)) étant sous la dépendance de la voie de signalisation du nuclear factor erythroid-2-related factor 2 (NRF2), ou de nature non enzymatique tels que le glutathion réduit (GSH), les flavonoïdes ou les vitamines A, C et E (53,54) (figure 13).

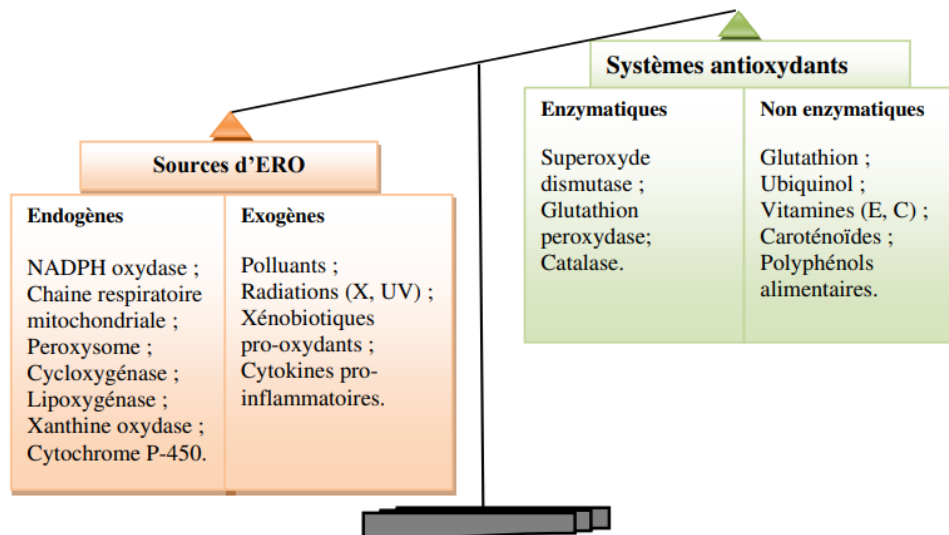


Figure 13 : Déséquilibre de la balance pro-oxydants et antioxydants (55).

Les particules participent activement à l'oxydation de ces molécules antioxydantes, mais aussi à la production excessive d'ERO, qui peuvent être générées directement à partir de molécules adsorbées par les PM ou constitutrices de leur « cœur » (e.g., métaux, HAP...) ou être produites dans l'organisme par l'intermédiaire de diverses réactions cellulaires catalysées par les constituants inorganiques et organiques des PM (56,57). Cette capacité des PM à générer des ERO et/ou à oxyder les molécules antioxydantes est définie comme « potentiel oxydant ». Ce paramètre est mesuré par l'intermédiaire de tests acellulaires utilisant des méthodes chimiques dont le principe peut varier. Il est ainsi possible de distinguer les approches directes quantifiant les ERO présents au sein des particules (e.g., CM-H₂DCFDA), des approches indirectes qui suivent et quantifient la consommation d'une espèce antioxydante (e.g., acide ascorbique ou glutathion réduit) ou d'un réducteur (e.g., dithiothréitol) en présence de PM. L'utilisation de ces techniques est intéressante afin d'étudier la réactivité des particules et de prédire le stress oxydant. Ce dernier correspond à la rupture de l'état d'homéostasie redox cellulaire, par un excès d'ERO associé à l'oxydation des molécules antioxydantes qui ne sont alors plus assez efficaces pour faire face aux dommages générés. De nombreuses études expérimentales et épidémiologiques ont démontré l'induction de ce processus à la suite d'une exposition aux PM (58–61). Ce stress oxydant mène à l'activation de diverses voies de signalisation dont celle du facteur de transcription NRF2. Ce dernier, ubiquitaire au niveau pulmonaire et principalement exprimé par les cellules épithéliales et les macrophages alvéolaires, est capable d'activer la séquence régulatrice ARE située dans la région promotrice de gènes antioxydants et anti-inflammatoires (62,63). Il s'agit d'une protéine codée par le gène *NFE2L2* qui, en l'absence d'oxydants, est séquestrée dans le cytoplasme, fixée au cytosquelette par la Kelch-like ECH-associated protein 1 (KEAP1) et dégradée par le protéasome (figure 14) (53). A contrario, en présence d'oxydants, NRF2 est dissociée de son inhibiteur endogène KEAP1, lui permettant de transloquer au niveau nucléaire afin de former un hétérodimère avec des petites protéines telles que Maf, Jun, Fos ou l'Activating Transcription Factor (ATF), ce qui lui permet d'interagir avec l'ARE pour induire

l'expression de gènes codant pour des enzymes de détoxification qui ont une activité antioxydante, détoxifiante et cytoprotectrice (64,65). Les résultats de nombreuses études expérimentales *in vitro* et *in vivo* ont démontrés que les particules atmosphériques et plus particulièrement les PM_{2,5} étaient capables d'activer l'expression de NRF2, lui permettant de réguler le stress oxydant et l'inflammation induits par ces dernières (66–70).

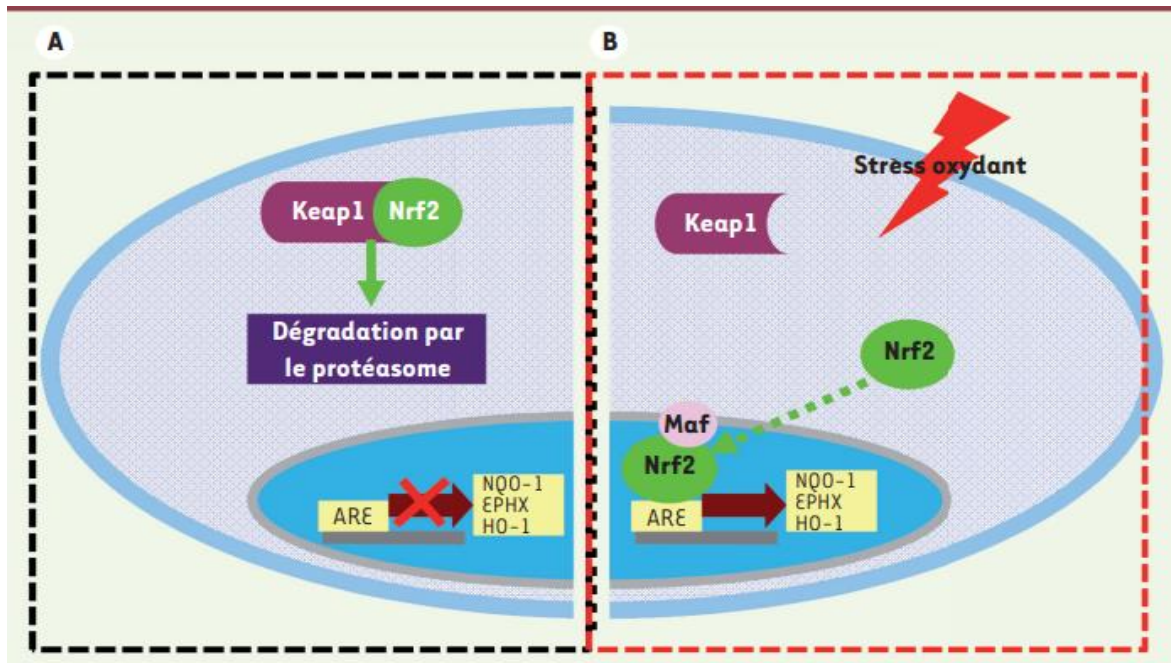


Figure 14 : Voie de signalisation NRF2 et transcription des gènes codant pour des enzymes de détoxification (53).

Outre ces défenses enzymatiques, des moyens de défenses de nature non enzymatique existent parmi lesquels le glutathion. Il s'agit d'une molécule antioxydante retrouvé majoritairement sous forme réduite GSH et synthétisée dans les hépatocytes par l'addition séquentielle de cystéine au glutamate suivie de l'ajout d'une glycine sous l'action de 2 enzymes : la glutamate cystéine ligase et la GSH synthétase. Des réactions de réduction et de conjugaison peuvent se produire au niveau du groupement thiol (-SH) nucléophile de la cystéine, permettant l'élimination des peroxydes et de nombreux xénobiotiques électrophiles (71). Dans le poumon, le GSH est indispensable à la protection de l'épithélium aérien face aux ERO et aux molécules inflammatoires. Il est, de plus, impliqué dans d'autres fonctions telles que : la régulation du cycle cellulaire, l'apoptose et la transcription de gènes. La présence de glutathion oxydé GSSG, dont le taux physiologique n'excède pas 1 % du glutathion total présent dans l'organisme, constitue un bon indicateur du stress oxydant. Ainsi, des modifications du ratio glutathion oxydé / glutathion réduit (GSSG/GSH) peuvent être à l'origine de modifications de nombreuses voies de signalisation impliquées dans la prolifération cellulaire, l'autophagie et l'apoptose (72). Une diminution du taux de GSH est d'ailleurs observée dans de nombreuses pathologies respiratoires telles que la fibrose pulmonaire idiopathique, l'asthme, le syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA) ou la BPCO (73). Le rapport GSSG/GSH constitue donc un indicateur approprié du degré de stress oxydant cellulaire. C'est pourquoi, ce ratio est actuellement utilisé afin de hiérarchiser les phénomènes biologiques (74,75) (figure 15).

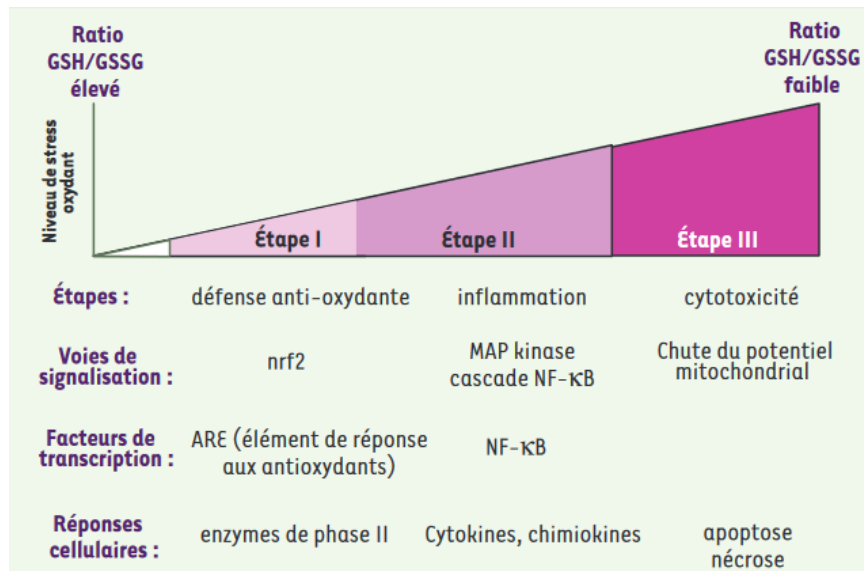


Figure 15 : Hiérarchisation des processus biologiques en fonction du rapport GSH/GSSG

Ainsi, lors d'un faible niveau de stress oxydant, l'activité antioxydante est induite, principalement via la voie de signalisation NRF2-ARE, restaurant l'homéostasie rédox de la cellule par l'intermédiaire de l'expression des enzymes de détoxification. Lorsque le déséquilibre est plus important, les voies de signalisation du nuclear factor-kappa B (NFκB) et des Mitogen-activated protein kinases (MAPK) sont activées, initiant la transcription de gènes pro-inflammatoires (e.g, Tumor Necrosis Factor (TNF α), Interleukine-1 β (IL-1 β)) participant à l'initiation de la réponse pro-inflammatoire par l'intermédiaire de l'expression des cytokines et molécules d'adhésion. Enfin, si le stress oxydant est trop élevé, un déséquilibre dans l'expression des gènes antioxydants d'une part, et pro-inflammatoires d'autre part, peut se produire, conduisant au développement d'un environnement inflammatoire chronique. Dans ce contexte, la perméabilité mitochondriale est perturbée, menant à une désorganisation de la chaîne de transport des électrons, ayant pour conséquence l'apoptose ou la nécrose de la cellule par relargage de facteurs pro-apoptotiques par les mitochondries et le développement ou l'exacerbation de diverses pathologies respiratoires (72,74,75) (figure 16).

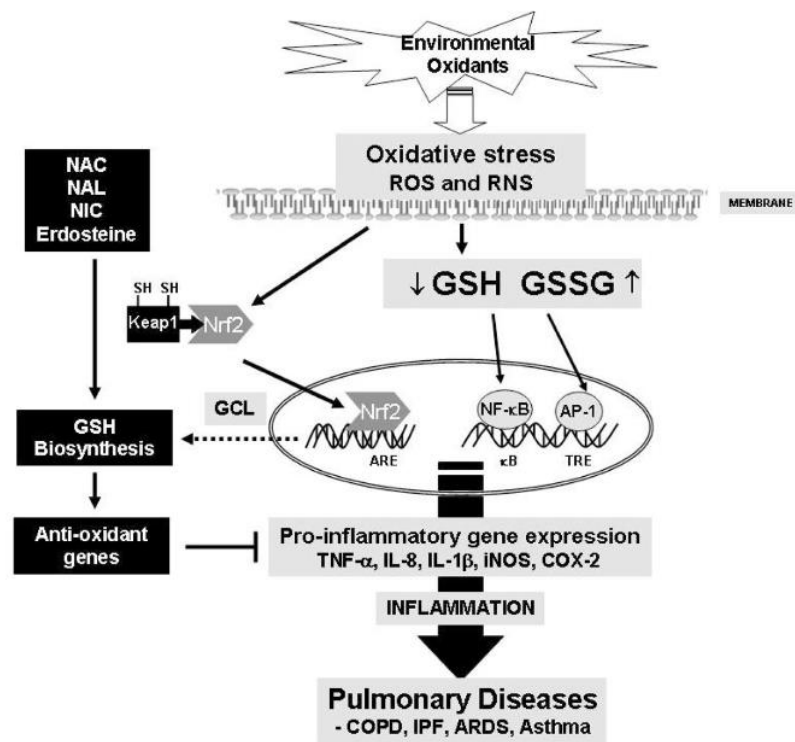


Figure 16 : Altération intracellulaire du rapport GSH/GSSG et régulation redox des maladies pro-inflammatoires et anti-inflammatoires (72).

2) Inflammation

La réaction inflammatoire est une réponse immunitaire innée, non-spécifique, immédiate et temporaire de l'organisme à toute agression altérant l'intégrité de l'organisme et dont l'objectif est la reconnaissance et l'élimination de tout élément pouvant déséquilibrer l'homéostasie tissulaire ainsi que le déclenchement des processus de réparation et restauration tissulaires. Il s'agit donc d'un mécanisme de défense et de protection vis-à-vis des perturbations d'origine physique, microbienne, traumatique, environnementale ou chimique. Ce signal de danger est détecté par les cellules sentinelles résidentes (i.e., macrophages, mastocytes, cellules dendritiques) par l'intermédiaire de récepteurs membranaires, induisant la sécrétion de médiateurs chimiques (i.e., histamine, prostaglandines, cytokines) qui facilitent la migration des cellules immunitaires (i.e., granulocytes et monocytes) de la circulation sanguine vers le tissu lésé et l'élimination du corps étranger par phagocytose (76) (figure 17).

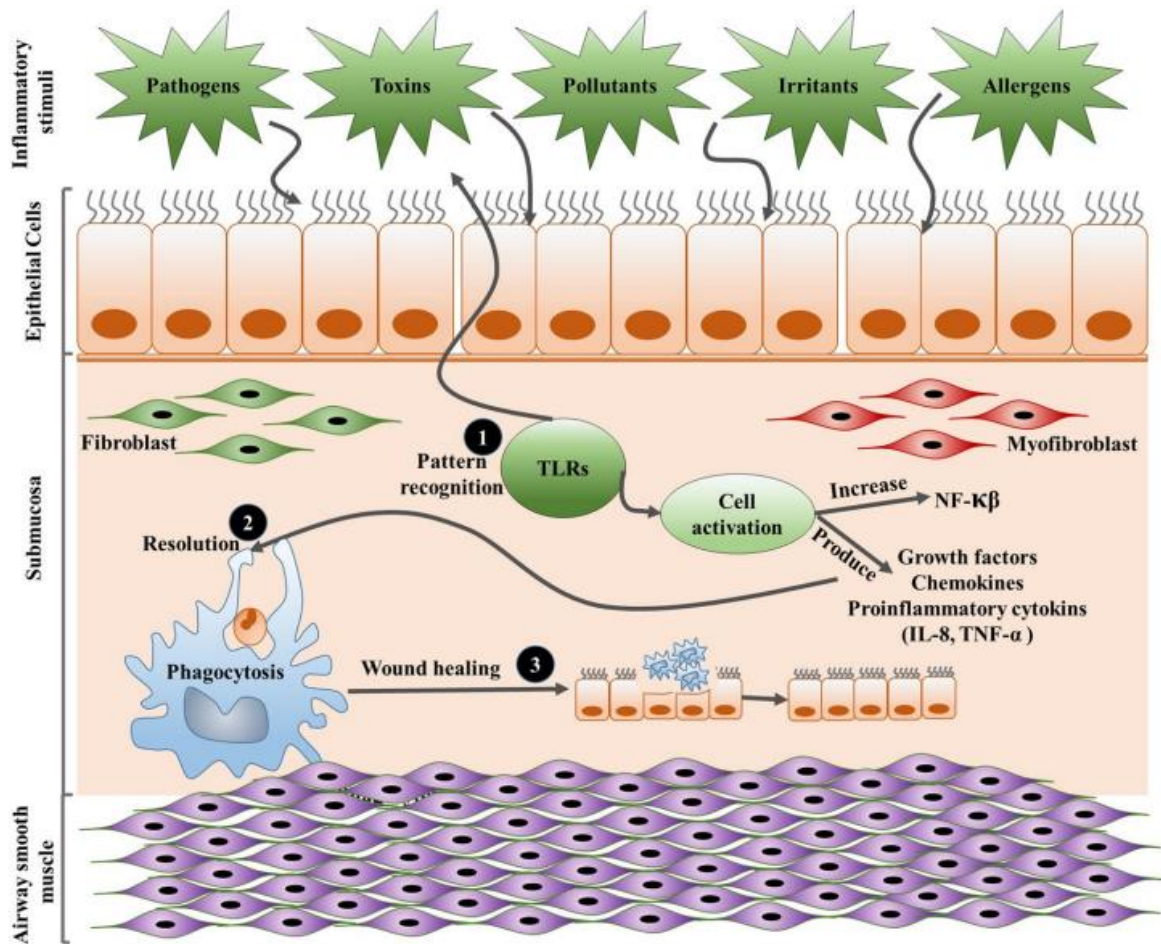


Figure 17 : Réponse inflammatoire au sein des voies respiratoires

La réponse inflammatoire aiguë a une durée approximative de 48 heures. Cependant, en cas de dysfonctionnement de ce dernier et/ou de concentration en agents pathogènes trop importante, cela peut entraîner une inflammation chronique locale, pouvant potentiellement s'étendre au niveau systémique et entraîner le développement ou l'exacerbation de pathologies à composante inflammatoire. De nombreuses études ont démontré que l'exposition particulaire pouvait entraîner une réaction inflammatoire pulmonaire locale, pouvant être aiguë ou chronique. En effet, une exposition à court terme, même à de faibles doses de particules, est capable d'induire le développement d'une inflammation aiguë (47,77–79). Il a, en effet, été démontré qu'à la suite d'une exposition aiguë aux particules atmosphériques, une activation de la voie de signalisation NFκB ainsi qu'une augmentation de la concentration en cytokines inflammatoires de type IL-6, IL-8, IL-1β, TNF-α, interféron gamma (IFNγ) dans le lavage bronchoalvéolaire (LBA) et dans le sang étaient retrouvées (80–82). Une exposition prolongée peut, quant à elle, aboutir à une inflammation chronique pouvant induire le développement ou l'exacerbation de pathologies inflammatoires chroniques de type BPCO ou asthme (60,83).

Les cellules épithéliales constitutives du tissu pulmonaire interviennent également dans l'immunité innée par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques « Pattern Recognition Receptor » (PRRs), qui permettent la lutte contre les agents extérieurs. Ces récepteurs, dont la famille la plus connue est celle des « Toll-Like

Recepteurs » (TLRs), sont capables de reconnaître des motifs associés aux micro-organismes, « Pathogen Associated Molecular Patterns » (PAMPs), ainsi que des signaux endogènes dérivés de cellules endommagées, les « Damage Associated Molecular Patterns » (DAMPs) (84). La fraction biologique des particules (i.e, bactéries, champignons, allergènes) joue donc un rôle non négligeable dans le déclenchement et l'entretien de cette réaction inflammatoire. En effet, lorsque les PRRs des cellules épithéliales pulmonaires reconnaissent des PAMPs ou DAMPs, cela induit la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (e.g., $\text{TNF}\alpha$, IL-1 β , IL-6), chemokines (e.g, monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1), IL-8, RANTES) et de molécules aux propriétés anti-microbiennes telles que la lysozyme qui est capable d'attaquer le peptidoglycane des bactéries à Gram négatif, la lactoferrine qui peut chélater le fer indispensable à la multiplication des bactéries et les défensines α et β qui perméabilisent les membranes des agents infectieux (figure 18) (85–89). Ces cytokines induisent le recrutement, la prolifération et l'activation de cellules immunitaires qui vont-elles-mêmes sécréter des protéases responsables de la destruction de l'agent pathogène mais également d'effets délétères au niveau tissulaire. C'est pourquoi les cellules épithéliales et environnantes sécrètent également des cytokines anti-inflammatoires (e.g., IL-10, transforming growth factor (TGF- β)) et des médiateurs prorésolutifs tels que les lipoxines, résolvines, protectines et marésines (89). Ces molécules induisent ainsi la phagocytose, la diminution du recrutement des cellules immunitaires et la régénération tissulaire. Malgré la présence de ces différents moyens de lutte contre les xénobiotiques et notamment les particules atmosphériques, il arrive que des particules non phagocytées, notamment des $\text{PM}_{0,1}$, ou certains de leurs composants, persistent, se dissolvent dans le surfactant et transloquent dans la circulation systémique par passage à travers la barrière alvéolo-capillaire via des phénomènes de transcytose ou d'internalisation, les rendant susceptibles d'agir sur d'autres organes (90,91). De la même façon, les macrophages ayant phagocyté les PM ainsi que les médiateurs chimiques inflammatoires sécrétés au niveau alvéolaire peuvent avoir des conséquences au niveau périphérique. À cela s'ajoute la capacité propre à chaque organe à sécréter ses propres médiateurs inflammatoires. Il a ainsi été démontré que les $\text{PM}_{2,5}$ pouvaient agir au niveau du système cardiovasculaire, du foie, des reins ou encore du cerveau. À titre d'exemple, plusieurs études épidémiologiques suggèrent une corrélation positive entre l'exposition à long terme aux $\text{PM}_{2,5}$ et une élévation de la concentration sanguine en protéine C réactive (CRP), associée à un risque accru de maladies cardiovasculaires (92,93).

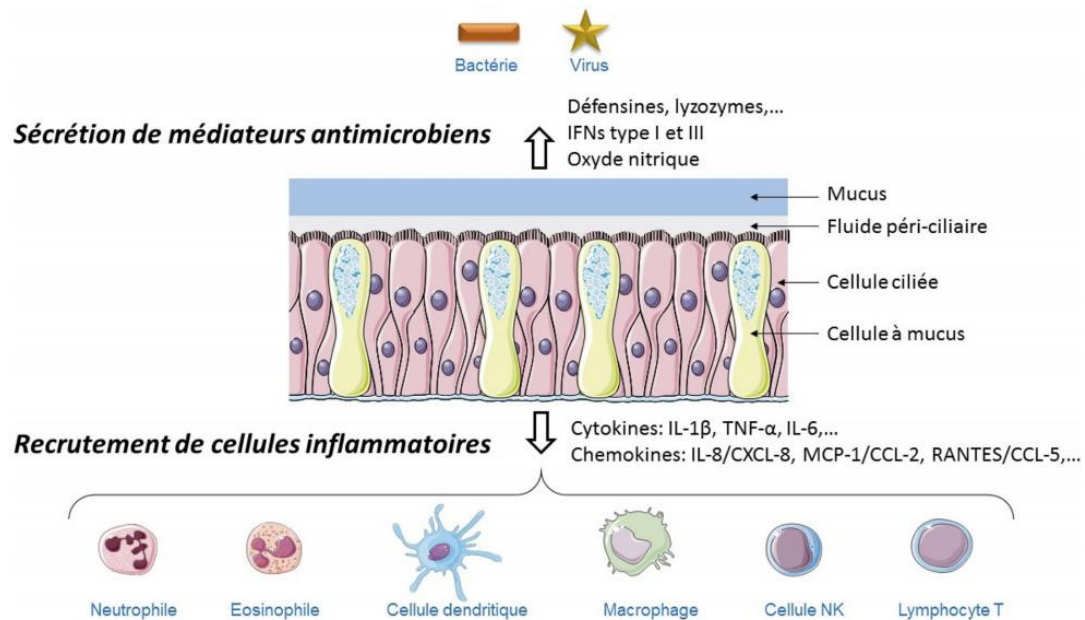


Figure 18 : Mécanismes de défense de l'épithélium respiratoire (89).

3) Remodelage tissulaire et Cancérogénèse

La muqueuse respiratoire constitue le premier mécanisme de défense pulmonaire vis-à-vis des menaces extérieures. En plus d'être une barrière physique et dynamique, sa composition riche en cellules épithéliales lui confère des fonctions immunitaires indispensables à la protection de l'organisme. L'activation des récepteurs présents à leur surface (e.g, PPR, Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)) entraîne une réponse inflammatoire d'intensité variable, avec sécrétion de médiateurs chimiques tels que des cytokines ou des facteurs de croissance, conduisant au recrutement massif de cellules immunitaires. Le dérèglement et/ou l'exacerbation des fonctions épithéliales peut léser l'épithélium de façon répétée et conduire à une inflammation chronique couplée une altération du processus de réparation tissulaire et d'élimination/remplacement des cellules anormales, ayant pour conséquence un remodelage tissulaire progressif de l'épithélium bronchique. Ce dernier est caractérisé par un épaississement du tissu musculaire lisse, une métaplasie de la muqueuse avec augmentation du nombre de cellules à mucus et une raréfaction des cellules ciliées ainsi qu'une fibrose péribronchique (74,89). En outre, il est le résultat d'un déséquilibre entre les mécanismes d'apoptose et/ou de nécrose d'une part, et ceux de prolifération et de différenciation des cellules inflammatoires et structurales de la paroi bronchique telles que les cellules épithéliales, mésenchymateuses et musculaires lisses, d'autre part (94). Les conséquences sont variées avec une rigidification des bronchioles, une hyperréactivité bronchique, une hypersécrétion de mucus et une altération de la clairance mucociliaire. Ce mécanisme de pathogénicité pulmonaire est par ailleurs une caractéristique distinctive des pathologies pulmonaires chroniques à composante inflammatoire de type asthme et BPCO, observé notamment dans le cadre de la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) (94–96). Cette dernière correspond à un processus dynamique de dédifférenciation durant lequel les cellules épithéliales perdent leurs caractéristiques spécifiques et acquièrent des propriétés propres aux cellules mésenchymateuses. Elle est caractérisée par une dissolution des jonctions

intercellulaires ainsi que par une dégradation de la matrice extracellulaire et de la lame basale bordant l'épithélium par des protéases conduisant à une altération de l'adhésion cellulaire. Elle est également définie par une réorganisation du cytosquelette d'actine avec formation de fibres de stress et conversion des filaments intermédiaires d'un type épithélial riche en cytokératine à un type mésenchymateux riche en vimentine ainsi qu'une perte de la polarité cellulaire, qui confère aux cellules une grande plasticité et une capacité d'invasion/migration vers les tissus périphériques (97,98). Ces propriétés expliquent le rôle essentiel de ce mécanisme au cours du développement embryonnaire, de la régénération tissulaire et de la cicatrisation des épithéliums mais aussi son implication dans la progression tumorale (98). En effet, par l'intermédiaire de la TEM, les cellules cancéreuses sont capables d'acquérir un phénotype invasif leur permettant de se dissocier de la tumeur primaire et de migrer dans la circulation sanguine en plus de développer une capacité de survie et une résistance accrues vis-à-vis des cellules immunitaires (99). De nombreux signaux extracellulaires participent de façon active à la promotion de la TEM. Ceci est particulièrement le cas de certaines métalloprotéases (e.g., MMP-3, MMP-9, MMP-11), des facteurs de croissances libérés par l'épithélium lésé (e.g., Epidermal Growth Factor (EGF), Keratinocyte Growth Factor (KGF), Fibroblast Growth Factor (FGF), TGF- α/β) et des protéines sécrétées Wnt, Hedgehog et Notch qui vont induire l'expression de facteurs de transcription (e.g., Snail/Slug, Twist, Zeb). Ces derniers contrôlent l'expression de protéines spécifiques du profil mésenchymateux tels que la N-cadhérine, la fibronectine, la vimentine, l'Alpha Smooth Muscle Actin (α -SMA) ou encore la Fibroblast-specific protein (FSP1) (figure 19) (98,100).

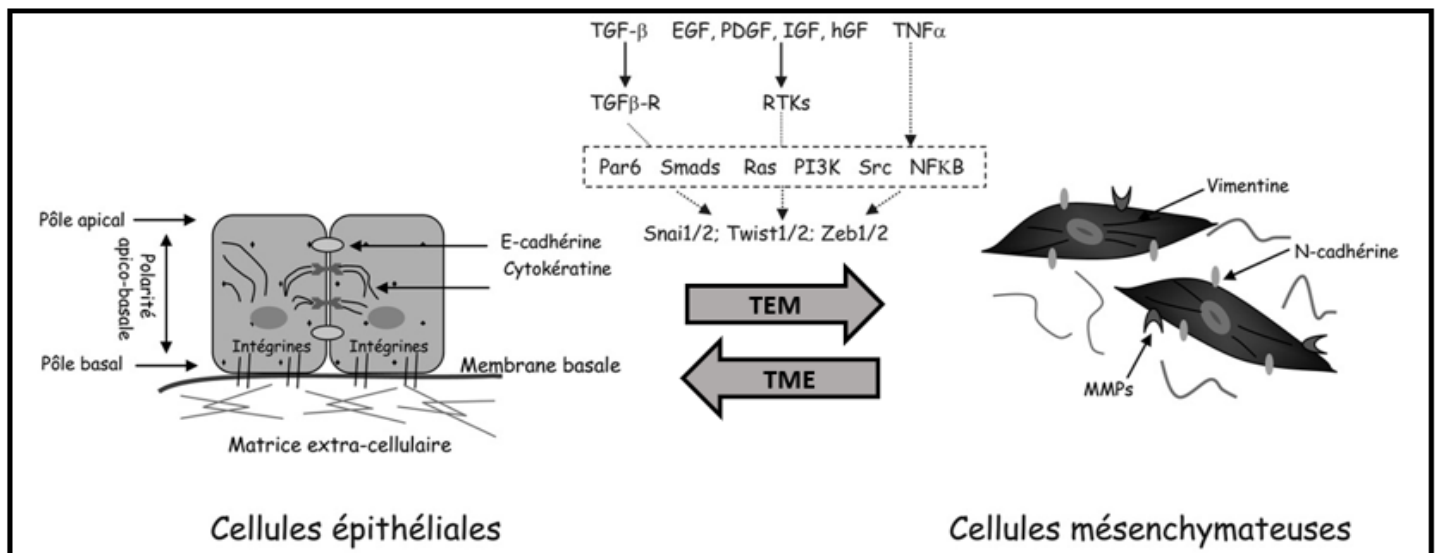


Figure 19 : Processus de transition épithélio-mésenchymateuse et de transition mésenchymo-épithéliale (98).

Des études récentes ont démontré que les $PM_{2,5}$ jouaient un rôle de promoteurs exogènes de fibrose et de cancer en induisant l'expression des biomarqueurs caractéristiques de la TEM (figure 20) (101). En effet, l'excès d'ERO générées par ces dernières serait capable d'activer des voies de signalisation impliquées dans l'initiation de la TEM. Au niveau pulmonaire, des études expérimentales ont ainsi montré qu'une exposition chronique aux $PM_{2,5}$ induisait la voie de signalisation TGF- β 1/SMAD2/3, ce qui avait pour conséquence une accumulation de fibres de collagène et une TEM profibrotique (102,103). De la même manière, d'autres cascades de signalisation telles que NF κ B, JAK/STAT3, Extracellular signal-regulated kinase (ERK), Akt, Notch ou Wnt/ β -cathénine seraient également activées sous la dépendance, ou non, des ERO, initiant le processus de TEM (101). En parallèle, des composants spécifiques des $PM_{2,5}$ et notamment les HAP, seraient également impliqués dans la promotion de ce mécanisme par l'intermédiaire de la voie de signalisation AhR/CYP1A1 (récepteur d'aryl hydrocarbure/cytochrome 1A1).

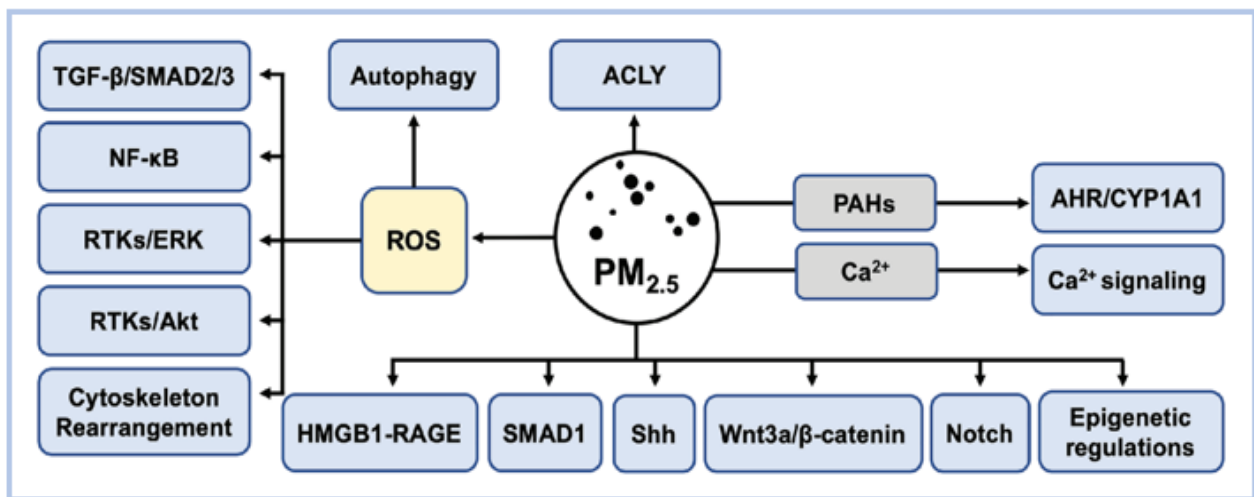


Figure 20 : Voies d'induction potentielle de la transition épithélio-mésenchymateuse par les $PM_{2,5}$

4) Altérations épigénétiques

La régulation de l'expression des gènes est cruciale pour le maintien de l'homéostasie tissulaire ainsi que pour le développement des phénomènes pathologiques. Les modifications épigénétiques jouent un rôle prépondérant dans cette régulation du transcriptome. Il s'agit de changement dans l'expression génique, n'impliquant pas de modifications de la séquence codante du génome mais pouvant être transmis lors de divisions cellulaires. Il en existe majoritairement trois : la méthylation de l'ADN et les modifications des histones qui influent toutes deux sur la structure de la chromatine, et la modification dans l'expression des microARN (miARN) (figure 21).

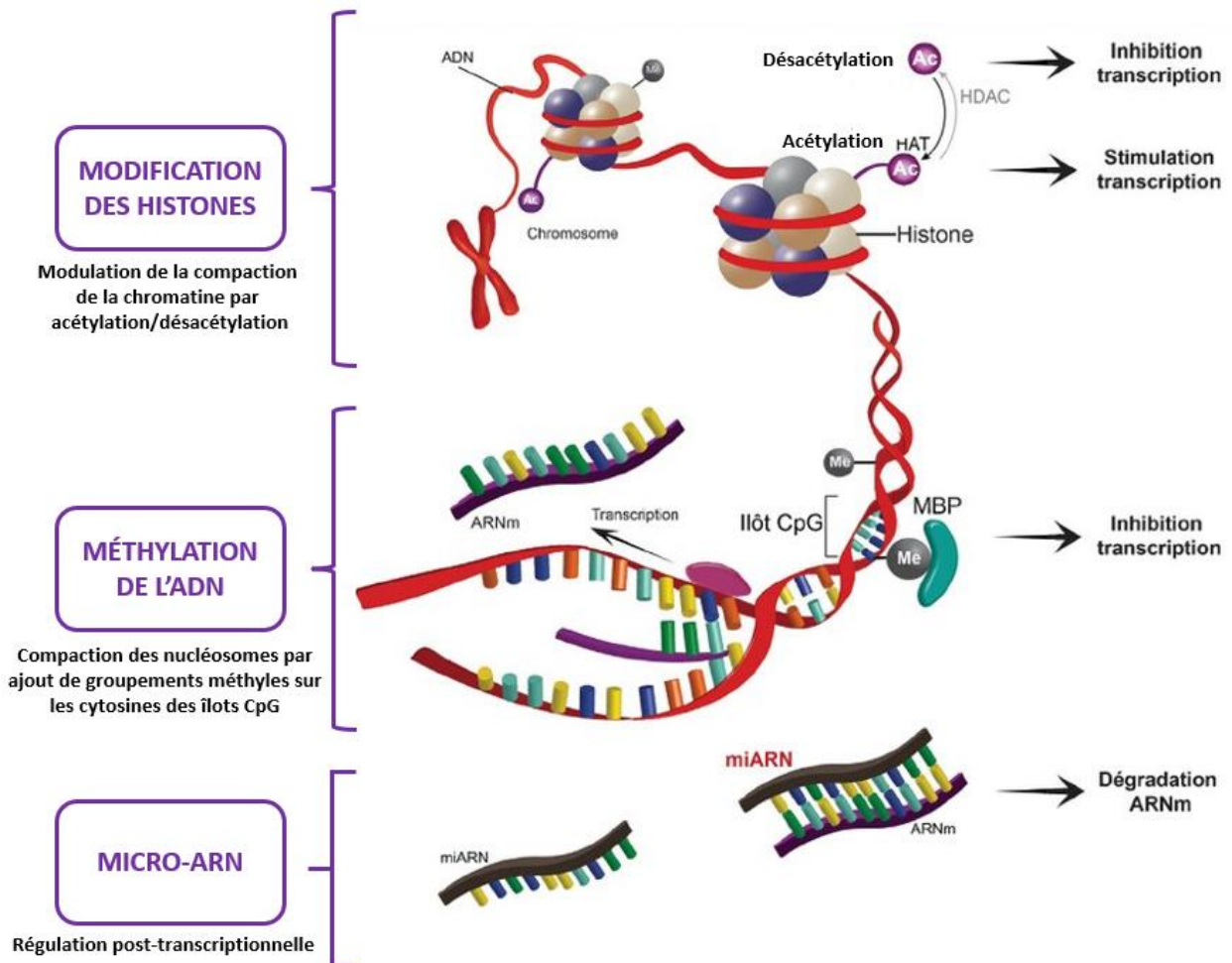


Figure 21 : Modifications épigénétiques modulant l'expression génique (104).

Ces derniers sont des petits ARN non codants de 19 à 22 nucléotides ayant une activité transcriptionnelle ou post-transcriptionnelle et capables de réguler négativement l'expression de certains gènes en se liant sur la région 3' non traduite (3'UTR) des ARN messagers (ARNm). Ce processus régulateur du transcriptome hautement conservé chez les eucaryotes est souvent retrouvé sous le terme anglais de « RNA silencing ». Une fois arrivés à maturité, ces miARN vont s'associer au complexe ribonucléique RISC (RNA Induced Silencing Complex) pour lui permettre de reconnaître spécifiquement les ARNm présentant une séquence complémentaire et induire leur répression (105) (figure 22). Les études fonctionnelles réalisées sur les miARN indiquent que ces derniers participent à la régulation de quasiment tous les processus cellulaires essentiels (e.g., prolifération et différenciation cellulaires, apoptose, inflammation, signalisation hormonale, protection antivirale). En effet toute altération dans leur niveau d'expression est associée à des pathologies chez l'Homme (cancers, maladies inflammatoires chroniques, pathologies cardiovasculaires, etc.). Il a été par ailleurs estimé que plus de 60% des gènes humains codant pour des protéines sont régulés par des miARN et que chaque miARN possède plusieurs centaines de gènes cibles (106).

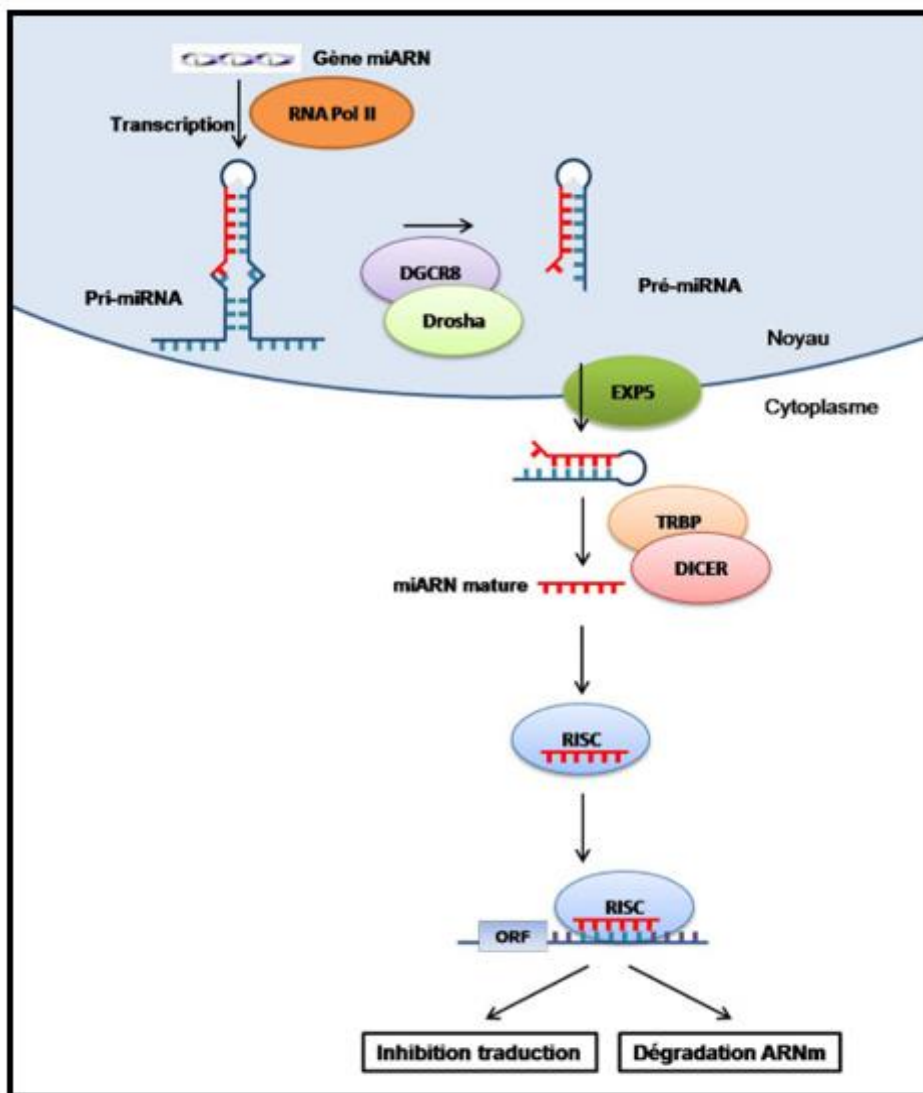


Figure 22 : Biogénèse des miARN et dégradation de l'ARNm cible (107).

Le rôle des miARN dans la réponse de l'organisme face aux xénobiotiques et plus spécifiquement aux substances toxiques environnementales est un sujet qui commence à être évoqué dans la littérature scientifique depuis une quinzaine d'années. Aujourd'hui, des liens directs entre l'exposition environnementale et le développement de certaines pathologies lié à la dérégulation de miARN spécifiques ont été décrits (108–110). La présence de miARN circulants et présentant une stabilité importante dans les fluides biologiques (e.g., plasma, urine, lait maternel, lavage broncho-alvéolaire) est aujourd'hui avérée. À l'heure actuelle, peu d'études ont mis en évidence l'impact de la pollution atmosphérique sur les profils d'expression des miARN, qu'ils soient organo-spécifiques ou circulants. Les mécanismes exacts par lesquels les facteurs environnementaux modifient l'expression de ces miRNA restent, de plus, peu élucidés. Néanmoins, en 2020, Cheng et ses collaborateurs ont rédigé une revue regroupant 37 études et montrant que suite à l'exposition à différentes tailles et sources de particules, de nombreuses modulations dans l'expression de miARN ciblant des gènes impliqués dans la régulation de l'inflammation (e.g., miR-146a, miR-

21, miR-155, miR-9), dans la prolifération cellulaire et la cancérogénèse (e.g., miR 222, miR-331) ou dans la régulation de l'angiogenèse (e.g., miR 29a) étaient observées (111). Une revue datant de 2021 a quant à elle identifié plusieurs miARN pouvant potentiellement être utilisés comme biomarqueurs afin de déterminer les populations exposées aux particules atmosphériques et ayant un risque significatif de développer un cancer pulmonaire (112). Parmi eux, sont retrouvés les miR-222 et miR-21, mais également les miR-223, miR-93, miR-425, miR-126 ou encore let-7a-5p, pour la plupart impliqués dans les processus inflammatoires et fonctionnant comme des oncogènes. Ces données suggèrent que la dérégulation de ces miARN serait potentiellement impliquée dans la toxicité des particules mais des études plus approfondies s'avèrent nécessaires afin d'établir le rôle des miRNA dans l'initiation et l'exacerbation de pathologies induites par les PM. Il apparaît également que des études longitudinales supplémentaires sont nécessaires pour voir s'il s'agit d'une altération transitoire ou d'une altération à long terme.

PARTIE II : MATÉRIELS ET MÉTHODES

I. MATÉRIELS CHIMIQUES

1) Prélèvement des particules

Les particules fines utilisées dans le cadre de ce projet ont été prélevées par l'équipe "Sciences de l'Atmosphère et Génie de l'Environnement" (SAGE) de l'Institut Mines Télécom (IMT) Nord-Europe au cours de l'Automne 2013/Hiver 2014. Le site de prélèvement, situé au centre de Lille (figure 23), est représentatif d'une pollution atmosphérique particulaire urbaine incluant des sources liées aux transports, au secteur résidentiel et aux activités tertiaires. Ces prélèvements ont été effectués par filtration à l'aide d'un impacteur à cascade Tisch Environmental Inc. à haut débit (35 m³/h) et à 6 étages permettant d'accéder à des diamètres de coupure adaptés. Une quantité suffisante de 808 milligrammes de PM_{2,5} ont ainsi pu être échantillonnés afin de réaliser leur caractérisation physico-chimique et le développement des approches toxicologiques.



Figure 23 : Situation géographique du site de prélèvements des particules fines.

2) Caractérisation physico-chimique et biologique des PM_{2,5}

a) Granulométrie

Afin d'analyser la distribution granulométrique des particules fines collectées dans le cadre de ce projet, celles-ci ont été diluées dans du sérum physiologique stérile à une concentration de 1 mg/mL. Ces particules ont ensuite été soumises aux ultrasons durant 10 minutes puis agitées afin d'éviter l'agglomération et la sédimentation de ces dernières. Une technique de granulométrie laser, basée sur la mesure de la diffusion dynamique de la lumière par le mouvement brownien des particules, a ensuite été employée. Pour cela, la relation de Stokes-Einstein qui établit

une relation proportionnelle entre la vitesse des particules et leur taille, est utilisée. Les petites particules diffuseront ainsi plus vite que les grosses particules. La quantité de lumière diffusée est mesurée à deux reprises durant un intervalle de temps très faible de l'ordre de 100 μ s, permettant l'analyse de l'intensité du mouvement brownien et la déduction de la taille des particules. L'appareil employé pour effectuer ces analyses est le Zetasizer Nano ZS (Malvern©, Worcestershire, Angleterre).

b) Caractérisation physico-chimique

La caractérisation physico-chimique des PM_{2,5} (i.e. métaux, HAP ; anions, cations, carbone élémentaire, carbone organique) prélevées dans le cadre de cette étude a été réalisée par l'équipe SAGE de l'IMT Nord-Europe. La concentration massique atmosphérique moyenne en PM_{2,5} était de $16,8 \pm 10,1 \mu\text{g}/\text{m}^3$. L'analyse des métaux a été effectuée par spectroscopie d'émission atomique par plasma à couplage inductif (Iris Intrepid, Thermo-Scientific) et spectrométrie de masse (NeXion 300x, Perkin Elmer, Villebon-sur-Yvette, France) (ICP-MS). Les analyses des HAP ont été réalisées à l'aide d'un système de chromatographie liquide haute pression (HPLC) Waters 2695 Alliance (Waters SA, Saint-Quentin-en-Yvelines, France) couplé à un réseau de photodiodes 996 et un détecteur fluorimétrique 2475. Les polychlorodibenzo-p-dioxines, les furanes (PCDD/F) et les dioxines ont été quantifiés par chromatographie en phase gazeuse à haute résolution/spectrométrie de masse à haute résolution après extraction accélérée par solvant. Les anions et cations ont été dosés par chromatographie ionique. Enfin, le carbone organique et le carbone élémentaire ont été quantifiés par analyses thermiques, respectivement sous atmosphère inerte et sous atmosphère oxydante, avec détection colorimétrique.

c) Quantification des endotoxines

Ce test quantitatif utilise des lysats d'améboocytes dérivés du sang de limule pour quantifier l'endotoxine lipopolysaccharide (composant membranaire des bactéries à gram-négatif) dans nos échantillons de particules (113). Lorsque l'endotoxine rencontre le lysat d'améboocyte, une série de réactions enzymatiques entraîne l'activation du facteur C, du facteur B et de l'enzyme pro-coagulante. L'enzyme activée catalyse la libération de p-nitroaniline (pNA), produisant une couleur jaune. Après avoir arrêté la réaction, la pNA libérée est mesurée par photométrie à 405 nm. L'intensité de la couleur est proportionnelle à la quantité d'endotoxine présente dans l'échantillon de particules.

3) Évaluation du potentiel oxydant des particules

Le développement récent d'essais acellulaires rapides et peu coûteux en ressources a grandement facilité les mesures du potentiel oxydant. Parmi les tests acellulaires les plus courants sont retrouvées :

- Le test de déplétion d'un agent réducteur, le **dithiothréitol** (DTT) dont le taux d'épuisement est proportionnel aux taux de génération d'ERO.
- Le test d'oxydation de la sonde **diacétate de 6-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescéine** (CM-H₂DCFDA) par les ERO.

- Les tests de déplétion de molécules anti-oxydantes, l'**acide ascorbique** et le **glutathion réduit** (GSH), qui sont proportionnelles au taux de génération d'ERO.

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

Principe : Ce test mesure quantitativement l'oxydation progressive du DTT par les particules. Le reste du DTT non oxydée est ensuite ajouté à du DTNB qui est converti en acide 5- mercapto-2-nitrobenzoïque qui pourra être mesuré par spectrophotométrie (114).

Protocole : Dans une plaque 96 puits, 100 µL d'échantillons de particules (20, 100 et 200 µg/mL AH et PE, en triplicas) sont incubés pendant 1 h à 37°C avec un volume égal de DTT (400 µM) dilué dans du tampon HEPES dégazé de 30 mM. La plaque est ensuite centrifugée pendant 15 min à 3500 g à 4°C. 100 µL de surnageant de chaque échantillon sont ensuite mélangés à un volume égal de 2,5 mM de DTNB. Pour finir, l'absorbance est mesurée à 405 nm avec un lecteur de plaque (Técan®) en utilisant le logiciel "Sparkcontrol Magellan 2.2". Le pourcentage de déplétion du DTT est calculé de la manière suivante : $100 - (\text{concentration en DTT dans l'échantillon} / \text{concentration en DTT dans le blanc}) \times 100$.

b) Test d'oxydation de la sonde CM-H₂DCFDA

Principe : Ce test est basé sur l'oxydation du diacétate de 6-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescéine (CM-H₂DCFDA) par les ERO produits par les particules. Il s'agit d'une molécule non fluorescente facilement transformée en forme fluorescente verte 20, 7'-dichlorofluorescéine (DCF) lorsque les groupes d'acétate sont éliminés tandis que des phénomènes d'oxydation se produisent dans la cellule (114).

Protocole : La sonde CM-H₂DCFDA est dissoute à 0,33 mM dans de l'éthanol absolu, puis activé par incubation avec 10 mM de solution d'hydroxyde de sodium (NaOH) pendant 30 min dans l'obscurité à température ambiante. La solution est neutralisée avec une solution saline tamponnée de DPBS 10 X exempt de magnésium et calcium. 100 µL de cette solution diluée au 1/64^{ème} ont ensuite été ajoutés à un volume égal de chaque échantillon de particules AH et PE de concentrations 20, 100 et 200 µg/mL (en triplicas) à tester dans une plaque de 96 puits. La fluorescence générée par la sonde est lue toutes les 5 min pendant 1h à une longueur d'onde d'excitation de 485 nm et d'émission de 520 nm, à 37°C avec le lecteur de plaque Técan® en utilisant le logiciel "Sparkcontrol Magellan 2.2". Les résultats ont ensuite été exprimés sous la forme du rapport de fluorescence entre les valeurs obtenues pour les échantillons de particules et les échantillons contrôles pour chaque point temporel.

c) Test de déplétion d'une molécule antioxydante, le glutathion réduit

Principe : Le test GSSG/GSH est un système basé sur la luminescence permettant de détecter et quantifier le glutathion total (GSH + GSSG), le GSSG et de calculer le ratio GSSG/GSH (115). Les déterminations du GSH et du GSSG sont basées sur la conversion dépendante du GSH d'une sonde, la luciférine-NT, en luciférine par

l'enzyme glutathion S-transférase qui est couplée à une luciférase. La lumière émise par la luciférase dépend de la quantité de luciférine formée, qui à son tour dépend de la quantité de GSH présente initialement. Ainsi, le signal luminescent est proportionnel à la quantité de GSH présent dans l'échantillon. Dans un premier temps, cette réaction est utilisée pour mesurer le glutathion total. Pour cela, un agent réducteur est ajouté pour convertir le GSSG en GSH. Dans un second temps, la réaction est utilisée pour mesurer uniquement la forme oxydée GSSG. Dans ce cas, on ajoute un réactif qui bloque l'ensemble du GSH initialement présent tout en laissant le GSSG intact. Cette étape de blocage est suivie d'une étape de réduction qui convertit le GSSG en GSH pour en permettre la quantification.

Protocole : Dans une plaque 96 puits, 25 µL d'échantillon (particules aux doses de 10, 50 et 100 µg/mL) sont incubés avec 25 µL de réactif ("réactif de lyse du glutathion total" ou "réactif de lyse du glutathion oxydé") durant 5 minutes. Ensuite, 50 µL de "réactif de génération de luciférine" sont ajoutés et la plaque est laissée à température ambiante durant 30 minutes. Enfin, 100 µL de réactif de détection de la luciférine sont additionnés. La mesure de la luminescence est effectuée par un lecteur de plaque (Técan®) en utilisant le logiciel "Sparkcontrol Magellan 2.2". Il est ainsi possible de calculer le ratio GSSG/GSH à partir de la formule suivante : formule

d) Test de déplétion d'une molécule antioxydante, l'ascorbate

Principe : Ce test consiste à mesurer la concentration en ascorbate en présence de PM_{2,5} sur une cinétique de 30 min (116). Si les particules sont oxydantes, alors la concentration en ascorbate diminuera dans le temps au fur et à mesure de son oxydation. Cette cinétique de diminution est suivie par mesure de l'absorbance à 265 nm. C'est donc la vitesse initiale d'oxydation qui est suivie, cette dernière correspondant à la pente de la droite « concentration en AA en fonction du temps ».

Protocole : Dans une plaque 96 puits transparente aux ultraviolets, déposer 180 µL d'échantillons puis y ajouter 20 µL d'acide ascorbique à 2 mM. L'absorbance est ensuite lue à 265 nm toutes les 5 min pendant 1h, à 37°C avec le lecteur de plaque Técan® en utilisant le logiciel "Sparkcontrol Magellan 2.2".

II. MODÈLE MURIN

Des souris A/J mâles (n = 6/groupe) initialement âgées de 10 semaines, pesant en moyenne 20 grammes et de statut sanitaire « specific opportunistic and pathogen free » (SOPF) selon la liste proposée par la « Federation of European Laboratory Science Associations » (FELASA) ont été utilisées dans le cadre de ce projet. Ce modèle murin, fourni par la société HARLAN laboratories (The Netherlands), a été décrit comme étant un modèle très sensible aux tumeurs pulmonaires chimiquement induites par des mutations de l'oncogène KRAS, qui code pour une GTPase. Cette spécificité explique pourquoi ce modèle est très largement utilisé pour les études de cancérogénèse. Il est également utilisé dans d'autres domaines d'applications tels que l'immunologie, la recherche cardiovasculaire et neurobiologique. Cette fréquence d'utilisation est un avantage pour les comparaisons des études toxicologiques. Ces

animaux ont été hébergés au nombre de 6 par cage, dans l'animalerie high-tech exempte d'organismes pathogènes spécifiques (EOPS) de la faculté de médecine de Lille - Pôle recherche. Un cycle jour/nuit comprenant 12 heures de luminosité et 12h d'obscurité et une alimentation ad libitum ont été initiés. Après avoir laissé les souris s'acclimater à leur nouvel environnement durant une semaine, les expositions ont débutées. Un examen clinique quotidien ainsi qu'une surveillance pondérale hebdomadaire des animaux furent réalisés durant toute la période de traitement ; une attention particulière a notamment été portée à l'apparition de signes de douleur chez les animaux. Toutes les procédures d'expérimentation animale ont été approuvées par le comité d'éthique local (approval number : 1A 089 899 3593 1) et autorisées par le ministère en charge de l'enseignement supérieur et de la recherche.

III. PROCOLE D'EXPOSITION ET PRÉLÈVEMENTS PULMONAIRES

Après une anesthésie légère à l'isoflurane (induction à 2,5%, maintien à 1%), des souris A/J (6 souris/groupe) ont reçu par instillation intranasale 30 μ L de PBS (groupe témoin), ou différentes doses (10, 50 ou 100 μ g) de PM_{2,5} urbaines en suspension dans 30 μ L de PBS selon 3 protocoles d'exposition (figure 24) : exposition aiguë (24h) avec une instillation intranasale unique ; exposition subchronique de 28 jours (1M) à raison de 3 instillations intranasales par semaine, suivie (1MR) ou non (1M) d'une période de recouvrement (i.e., sans exposition) de 8 semaines.

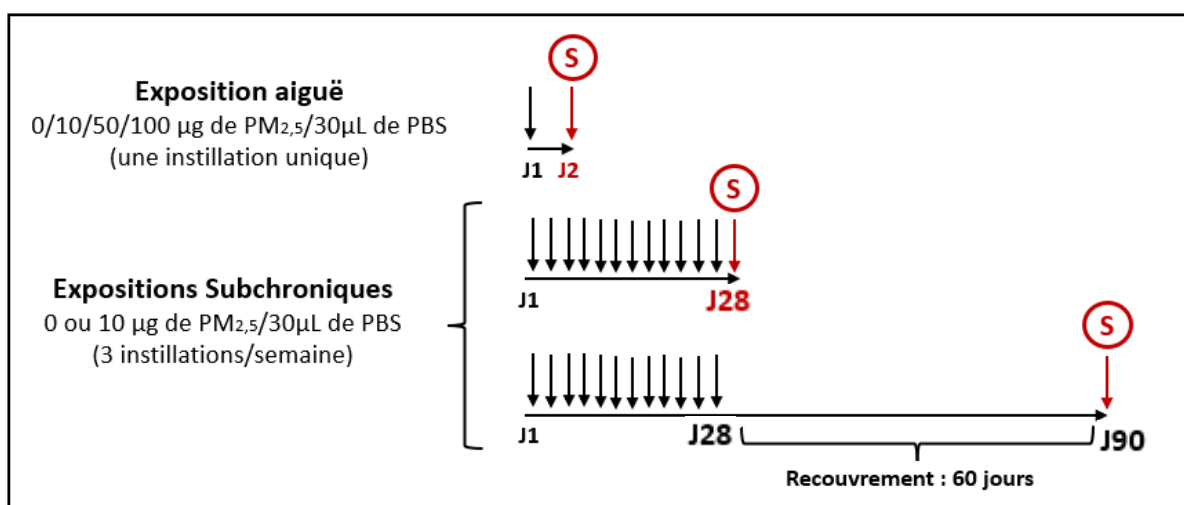


Figure 24 : Protocoles d'exposition aiguë et subchronique des souris, avec ou sans période de recouvrement (S: Sacrifice).

Le protocole d'exposition aiguë a été réalisé en exposant ce modèle murin à des doses croissantes (10 μ g, 50 μ g ou 100 μ g PM_{2,5}/ 30 μ L de PBS) de PM_{2,5} afin de s'assurer que la dose à utiliser pour le protocole d'exposition subchronique n'induirait pas une toxicité ou une réponse inflammatoire trop importante. L'évaluation de la cytotoxicité pulmonaire et systémique, d'une part, et de la réponse inflammatoire pulmonaire et systémique, d'autre part, a suggéré d'utiliser la dose la plus faible (10 μ g / 30 μ L PBS) pour les protocoles d'exposition subchronique du modèle murin aux PM_{2,5}. Un lavage bronchoalvéolaire a été réalisé avant de procéder aux sacrifices des souris. Pour cela, 1 mL de PBS stérile (ThermoFisher Scientific, Illkirch, France) a été injecté dans leurs poumons puis réaspiré à deux reprises avant d'être centrifugé. Les

souris ont ensuite été rapidement sacrifiées par injection intrapéritonéale d'une dose de Xylazine/Kétamine adaptée aux poids de chaque animal (100 mg/kg et 16 mg/kg, respectivement) et leurs poumons ont été prélevés. Afin de pouvoir réaliser des extractions d'acides nucléiques, une partie de chaque poumon a été conservée dans du RNA later (Ambion, ThermoFisher Scientific, Illkirch, France), conservée 48h à 4°C puis congelés à -20°C selon les instructions du fournisseur. Une autre partie destinée aux extractions protéiques a, quant à elle, été congelée à sec dans de l'azote liquide avant d'être conservée à -80°C (tableau 2). Des souris supplémentaires ont également été utilisées afin de réaliser des analyses histologiques. Les poumons ont été fixés par immersion dans une solution de Formalin 4 % pendant une nuit et ont ensuite été enrobés dans de la paraffine afin de pouvoir réaliser des coupes fines et régulières à l'aide d'un microtome.

Tableau 2 : Tissus, matrices, stockage et volets d'étude utilisés pour les approches toxicologiques.

| Tissus | Matrices | Stockage | Paramètres d'études |
|---------|------------------------|----------|------------------------------|
| LBA | Fluide | -80°C | Inflammation |
| | Culots | +4°C | Cellularité |
| Poumons | Tissus fixés et inclus | + 4°C | Histo- et cytopathologies |
| | Tissus | -80°C | Stress oxydant, inflammation |
| | Tissus (RNAlater™) | -20°C | miARN, ARNm |

IV. ÉTUDE DE LA TOXICITÉ PULMONAIRE

1) Mesure de marqueurs biologiques du stress oxydant

a) Étude des défenses antioxydantes

i. Étude de la voie de signalisation NRF2

➤ Mesure de l'activité de fixation à l'ADN du facteur de transcription Nrf2 par le système TransAM (Active Motif) (117) : Il s'agit d'un test ELISA qui cherche à étudier la liaison des facteurs de transcription à une séquence consensus immobilisée sur une plaque 96 puits. Pour cela, un extrait nucléaire activé est ajouté à chaque puit et le facteur de transcription d'intérêt se lie spécifiquement à cet oligonucléotide lié. Un anticorps primaire spécifique d'un épitope sur la forme liée et active du facteur de transcription est ensuite ajouté, puis incubé avec un anticorps secondaire pour obtenir une lecture colorimétrique sensible et facilement quantifiable.

➤ Étude de l'expression génique de NRF2 et de ses gènes cibles par RT-qPCR (118) : La méthode de Real-time Quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR) permet de déterminer le niveau d'expression de gènes cibles et leur comparaison en fonction des paramètres d'exposition testés. Plusieurs étapes sont nécessaires :

- Extraction des ARN (AllPrep DNA/RNA/miRNA Universal Kit, QIAGEN)
- Rétrotranscription (RT) des ARNm en ADN complémentaire (ADNc)
- Amplification et quantification des ADNc

La chimie TaqMan® utilisée repose sur l'utilisation d'un couple d'amorces et d'une sonde fluorogénique spécifiques de chaque gène cible.

Protocole : Les ARN pulmonaires ont été extraits à partir des tissus pulmonaires conservés dans le RNA later. Une masse de 20 à 25 mg de chaque poumon a été broyée dans 600 µL de tampon RLT Plus supplémenté par du β-mercaptoéthanol, à l'aide du GentleMACS Dissociator (Miltenyi Biotec). Les ARN totaux ont ensuite été extraits à l'aide de l'automate QIAcube (Qiagen) en suivant les instructions du kit « AllPrep DNA/RNA/miRNA Universal kit » (Qiagen). Ce protocole contient une étape de digestion à la protéinase K qui permet d'optimiser le rendement d'extraction et de purifier des acides nucléiques ainsi qu'une étape de digestion à la Dnase I éliminant toute trace d'ADN génomique résiduel lors de l'extraction des ARN. Les ARN totaux ont ensuite été dosés par analyse spectrophotométrique sur le lecteur Spark (Tecan, Männedorf, Suisse). Puis, la rétrotranscription (RT) des ARNm en ADNc a été réalisée en suivant les instructions du kit « high capacity cDNA reverse transcription » (Applied Biosystems). Des qPCR en temps réel ont ensuite été réalisées en employant le TaqMan Fast advanced Master MIX (Applied Biosystems) ainsi que des sondes et des amorces Taqman le dans le but de quantifier l'expression de gènes d'intérêt. Le gène de ménage *PPIA* (Mm02342430_g1) a été utilisé afin de normaliser les résultats obtenus.

➤ Analyse d'activités enzymatiques par colorimétrie :

- Mesure de l'activité enzymatique de la **catalase** (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) (119) : Cette enzyme est capable de catalyser la dégradation du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) en eau et dioxygène. Ce test est ainsi basé sur la mesure à 520 nm du H₂O₂ restant après action de la catalase présente dans nos échantillons.
- Mesure de l'activité de la **superoxyde dismutase (SOD)** (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) (120) : Cette enzyme catalyse la réduction des anions superoxydes en oxygène et peroxyde d'hydrogène. Ce test utilise un sel de tétrazolium, le WST-1, qui produit un colorant formazan par réduction avec un anion superoxyde. Ce taux de réduction est linéairement lié à l'activité de la xanthine oxydase (XO) qui est inhibée par la SOD. Ainsi, l'activité d'inhibition de la SOD est déterminée mesure de l'absorbance à 450 nm.

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

➤ Mesure du ratio GSSG/GSH par luminescence (115) :

Le protocole utilisé dans le cadre de l'étude du potentiel oxydant des particules (figure 18) est une nouvelle fois utilisé mais cette fois-ci les échantillons de particules sont remplacées par les échantillons de lysats pulmonaires, c'est-à-dire des biopsies de poumons lysées dans 500 µL de tampon RIPA supplémenté en inhibiteurs de protéases et phosphatases (ThermoFisher Scientific, Illkirch, France) permettant d'en extraire les protéines.

➤ Analyse d'activités enzymatiques par colorimétrie :

- Mesure de l'activité de la **glutathion peroxydase (GPx)** (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) (121) : Cette enzyme catalyse la réduction des peroxydes en alcools en utilisant du GSH comme agent réducteur. Le GSSG produit est ensuite réduit en GSH par la glutathion réductase (GR) en utilisant du NADPH comme cofacteur. Il est ainsi possible de mesurer la décroissance de l'absorbance à 340 nm durant l'oxydation du NADPH en NAD⁺, reflétant l'activité de la GPx.
- Mesure de l'activité de la **glutathion réductase (GR)** (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) (122) : Cette enzyme catalyse la réduction du GSSG en GSH en utilisant du NADPH comme cofacteur. Ce test est ainsi basé sur la mesure de l'augmentation de l'absorbance à 340 nm, causée par la réduction du 5,5-dithio-bis-(acide 2-nitrobenzoïque) (DTNB) préalablement ajouté, par le GSH formé.

b) Recherche de lésions oxydatives

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

L'ADN a été extrait des biopsies de tissus pulmonaires en utilisant le kit DNeasy TM (Qiagen, Courtaboeuf, France). Ensuite, 10 µg d'ADN, mesurés par un spectrophotomètre ont été dissous dans de l'eau (10 µl volume final). La suspension a été incubée à 100°C pendant 2 min, traitée avec 1 µl de tampon d'acétate de potassium 250 mM (pH 5,4), 1 µl de sulfate de zinc 10 mM et 2 µl de nucléase P1 (6,25 U / µl) à 37 ° C pendant une nuit, puis traitée avec 2 µl de Tris-HCl 0,5 M (pH 8,3) et 2 µl de phosphatase alcaline (0,31 U / µl), à 37 ° C pendant 2 heures. La formation de 8-OHdG a été déterminée en utilisant le kit « OxiSelect™ Oxidative DNA Damage ELISA kit 8-OHdG quantification » (Cell Biolabs, Inc, San Diego, USA) (123). Ce kit fournit un immunodosage compétitif pour la mesure quantitative de l'adduit d'ADN oxydant 8-OHdG.

ii. Marqueurs de peroxydation lipidique : 4-HNE et 8-IsoP

➤ Dosage du 4-HNE par électrochimiluminescence (technologie Meso Scale Discovery (MSD)) : Le dosage du 4-HNE est effectué grâce à un test immunoenzymatique, réalisé sur une plaque 96 puits. Le fond de chacun des puits, dans lequel se trouve des électrodes, est revêtu de 30 µL/puits d'une solution de coating de 4-HNE-BSA à 2 µg/mL avec BSA 1% (v/v). Après l'avoir laissée incuber durant une nuit, la plaque est lavée à 3 reprises à l'aide de 150 µL/puits de tampon PBS Tween puis 150 µL d'une solution de blocage (BSA 3%, v/v) sont ajoutés à chaque puit. Après avoir laissé incuber durant 1 heure à température ambiante sous agitation orbitale à 500 rpm, l'ensemble des puits est à nouveau lavé. Les échantillons de lysats de poumons sont centrifugés et 25 µL de surnageant sont déposés dans chaque puits. Ensuite, 25 µL de solution de détection (anticorps polyclonaux de lapins anti-4-HNE) sont ajoutés dans l'ensemble des puits avant de laisser la plaque incubée

durant 2 heures à température ambiante sous agitation orbitale (500 rpm). Les puits sont à nouveau lavés et 25 µL de solution de détection sulfoTAG (anticorps de moutons anti-anticorps de lapins couplés à une sulfoTAG) sont ajoutés. Après une heure d'incubation à température ambiante, la plaque est de nouveau lavée. 150 µL de tampon de lecture sont ajoutés avant la détection du signal électrochimiluminescent par le lecteur de plaque MSD.

➤ Dosage du 8-IsoP par ELISA : La détection et la quantification rapides du 8-iso-PGF2α sont réalisées par immunodosage enzymatique compétitif (ELISA) à l'aide du kit « ELISA OxiSelect™ 8-iso- Prostaglandin F2α » (124). La quantité de 8-iso-PGF2α dans les échantillons est déterminée en comparant son absorbance à celle d'une courbe standard connue de 8-iso-PGF2α. Pour se faire, un anticorps spécifique du 8-iso-PGF2α est incubé dans une plaque 96 puits. Après lavage, les étalons 8-iso-PGF2α ou les lysats de poumons sont mélangés à un conjugué 8-iso-PGF2α-HRP. Le 8-iso-PGF2α libre et le conjugué 8-iso-PGF2α-HRP vont ainsi entrer en compétition pour se fixer à l'anticorps lié à la plaque. Un substrat est ajouté ensuite à la HRP, entraînant un développement de la couleur qui est directement proportionnel à la quantité de conjugué 8-iso-PGF2α lié à la plaque et inversement proportionnel à la quantité de 8-iso-PGF2α libre dans les échantillons ou les étalons.

iii. Marqueur d'oxydation protéique : Protéines carbonylées

Lors de ce test, la quantité de protéines carbonylées dans l'échantillon de protéines est déterminée à l'aide du kit « OxiSelect™ Protein Carbonyl ELISA kit », en comparant son absorbance avec celle d'une courbe standard de d'albumine de sérum bovin (ASB) réduite/oxydée connue (125). Pour cela, les étalons d'ASB ou les échantillons de protéines (10 µg/mL) sont incubés sur une plaque de 96 puits pendant 2 heures à 37°C. Les carbonyles de protéines présents dans l'échantillon ou l'étalon sont dérivés en DNP hydrazone et sondés avec un anticorps anti-DNP, suivi d'un anticorps secondaire conjugué à la HRP. La teneur en protéines carbonylées de l'échantillon inconnu est déterminée par comparaison avec une courbe standard préparée à partir d'étalons ASB réduits et oxydés prédéterminés.

2) Mesure de la réponse inflammatoire

a) Numération cellulaire du LBA

Le LBA recueilli a aussitôt été conservé dans de la glace, puis centrifugé à 4000 g pendant 10 min à 4°C. Le culot cellulaire a été remis en suspension dans 500 µL de PBS puis conservés à 4°C. Puis, les cellules du LBA ont été déposées par cyto-centrifugation (cytospin-2, Shandon Products Ltd., ThermoScientific) sur des lames superfrost et colorées par le May-Grünwald-Giemsa (Sigma Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France). Le pourcentage de macrophages ayant internalisé des PM_{2,5} a été estimé à partir de 4 champs sélectionnés de manière aléatoire dans

lesquels 200 macrophages ont été comptabilisé. Le pourcentage de PNN et de macrophages a ensuite été calculé de la même manière.

b) Analyses histologiques des tissus pulmonaires

Des coupes histologiques de 5 µm ont été réalisées à partir des échantillons de tissus pulmonaires inclus en paraffine. Afin d'évaluer quantitativement et qualitativement l'impact des particules sur la morphologie des voies aériennes, une coloration à l'Hématoxyline-Éosine-Safran (HES) d'une première série de lames a été effectuée. Dans l'optique de rechercher d'éventuelles lésions fibrotiques, d'autres coupes de poumons ont également été colorées par le rouge Sirius (Sigma Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France). Des analyses immunohistochimiques ont également été réalisées sur les coupes pulmonaires à l'aide d'anticorps (Abcam, Paris, France) anti-DMBT1 (ab114867) et anti-Ki-67 (ab16667) et d'un anticorps secondaire conjugué à la peroxydase de raifort (HRP). Les lames ont été analysées à l'aveugle par un médecin anatomopathologiste de l'hôpital Saint-Vincent de Paul (Lille) au moyen d'un microscope optique Eclipse Ni muni d'une caméra DS-Ri2 (Nikon, Amsterdam, Netherlands).

c) Mesure de l'activité de fixation à l'ADN du facteur de transcription NFκB par le système TransAM (Active Motif)

Le principe de mesure de l'activité de fixation à l'ADN du facteur de transcription NFκB est identique à celui utilisé pour le facteur de transcription NRF2 (page 46) mais emploie une séquence consensus spécifique du facteur de transcription étudié (126).

d) Dosage des cytokines (Luminex)

La sécrétion de douze cytokines inflammatoires dans les LBA a été évaluée simultanément à l'aide du système MAGPIX® (Technologie Luminex®, Merck-Millipore, Guyancourt, France) (127). Cette technique immunologique utilise des microparticules (billes) magnétiques fluorescentes, spécifiques et pré-cotées avec des anticorps reconnaissant les analytes d'intérêt à doser : CCL5 (chemokine ligand 5 ou RANTES), GM-CSF (granulocyte macrophage colony stimulating factor), IL-1β (interleukine 1β), IL-6 (interleukine 6), IL-10 (interleukine 10), IL-13 (interleukine 13), IL-17A (interleukine 17A), Kc (keratinocytes-derived chemokine), MCP-1 (monocyte chemoattractant protein 1), MIP1α (mouse macrophage inflammatory protein 1 alpha), MIP1β (mouse macrophage inflammatory protein 1 beta) et TNF-α (tumor necrosis factor-α). Les cytokines sont ensuite révélées avec 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. Les analyses sont réalisées en dupliqua. Les concentrations en cytokines dans les différentes conditions d'exposition sont ensuite interprétées en se rapportant à la condition non exposée.

3) Analyses transcriptomiques

a) Analyses de l'expression des ARNm par Microarray

Des analyses pangénomiques ont été réalisées par la technologie des microarrays ou « puces à ADN », en collaboration avec la plateforme de génomique fonctionnelle et structurale du Centre de Biologie Pathologie du CHU de Lille. Afin de couvrir l'ensemble du génome murin, des lames 8x60k OneColor (Agilent Technologies, Les Ulis, France) couplées à des oligonucléotides de 60-mer (028005 slides) ont été utilisées. Les instructions du fabricant (Agilent Technologies) ont été respectées pour réaliser le marquage, l'hybridation, et la détection des ARNc. Pour chaque micropuce, l'utilisation du kit Low input QuickAmp a permis la synthèse des ARNc couplés à la Cyanine 3, à partir de 50 ng d'ARN total. Des contrôles positifs, les ARN Spike-In, ont été utilisés lors des étapes de marquage et d'amplification. Après purification, 600 ng de chaque ARNc ont été hybridés et lavés en suivant les recommandations du fournisseur. Après avoir scanné les micropuces, les données ont été exportées à l'aide du logiciel « Agilent Feature Extraction Software© » (FE version 10.7.3.1). L'analyse fonctionnelle des ARNm pulmonaires murins dérégulés à la suite des expositions particulières a ensuite été abordée *in silico* à l'aide du logiciel Ingenuity Pathway Analysis (Qiagen Bioinformatics, Aarhus, Danemark) permettant l'identification des fonctions cellulaires et moléculaires modulées par les gènes dérégulés, en se basant sur les données bibliographiques.

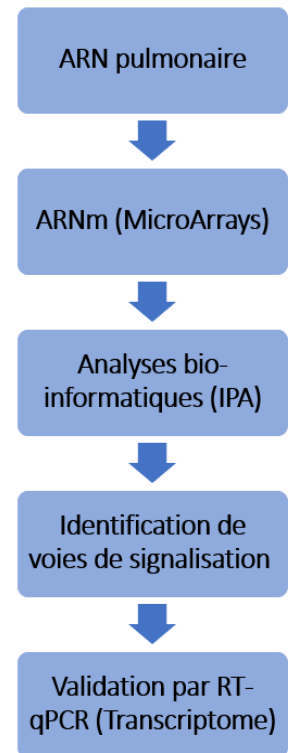


Figure 25 : Arbre décisionnelle pour l'analyse transcriptomique.

À partir de cette analyse bio-informatique, le différentiel d'expression génique ou Fold Change (FC) de chaque gène a pu être calculé entre les échantillons du groupe contrôle et ceux des groupes exposés aux PM_{2,5}, permettant ainsi d'extraire une liste d'ARNm d'intérêt significativement dérégulés à la suite des expositions aux PM_{2,5} (i.e, down-régulés : FC ≤ 0,5 ; up-régulés : FC ≥ 2, p < 0,01). Afin de valider ces résultats, l'expression de certains de ces gènes a ensuite été quantifiée par RT-qPCR. Le gène *PPIA* (Mm02342430_g1) a été utilisé comme contrôle endogène (figure 25).

b) Analyse de l'expression des miARN par OpenArray

L'expression des miARN a été analysé par OpenArrays à l'aide du système QuantStudio 12K Flex (Applied Biosystems) qui permet de réaliser des RT-qPCR à très haut débit avec la technologie Taqman sur des lames OpenArrays Rodent miRNA (Applied Biosystems) capables de quantifier l'expression de 754 miARN de façon

simultanée. 100 ng d'ARN total ont été utilisés afin d'effectuer la transcription inverse des miARN à l'aide du kit Megaplex™ RT Primers (Applied Biosystems). Une étape de préamplification a ensuite été réalisée à l'aide du kit Megaplex™ PreAmp (Applied Biosystems), permettant d'obtenir les ADNc préamplifiés qui subséquemment ont été dilués au 40^{ème} dans un tampon Tris EDTA à pH 8,0 selon les recommandations du fabricant. Ces derniers ont ensuite été déposés sur les lames OpenArrays grâce au robot Accufill (Applied Biosystems) puis l'analyse de l'expression des miARN a été réalisée. Enfin, l'analyse informatique n'a été effectuée que sur les miARN dont l'expression était au moins significativement 2 fois inférieure ou 2 fois supérieure à celle des souris contrôles non exposées aux particules (i.e, $-2 \leq FC \leq 2$; $p \leq 0,05$).

4) Analyses statistiques

Les résultats obtenus lors des différentes expérimentations ont été analysés avec le logiciel GraphPad PRISM® v8 et exprimés pour la plupart en fold change (FC), correspondant au rapport du niveau moyen d'expression du paramètre étudié dans une condition comparé à celui du contrôle négatif. Les groupes de souris (n = 6/groupe) exposées ont été comparées aux groupes contrôles par utilisation d'un test non paramétrique de Mann Whitney avec un risque de première espèce $p \leq 0,05$.

PARTIE III : RÉSULTATS

I. CARACTÉRISATION PHYSICO-CHIQUE ET BIOLOGIQUE DES PM_{2,5}

1) Distribution granulométrique

Les résultats de l'analyse de la distribution granulométrique des PM_{2,5} laissent apparaître une distribution bimodale (figure 26) avec un premier pic plus important de moyenne 178,3 +/- 32,82 nm et un second pic de moyenne 993,4 +/- 295,9 nm correspondant respectivement aux PM_{2,5} (73,9 %) et à la formation d'agrégats des PM_{2,5} qui ont naturellement tendance à s'agréger (26,1 %).

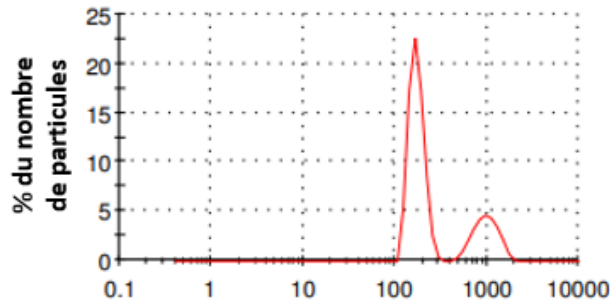


Figure 26 : Distribution granulométrique des PM_{2,5}.

2) Caractérisation physico-chimique

La figure 27 présente la caractérisation physico-chimique des PM_{2,5} (i.e. métaux, HAP ; anions, cations, carbone élémentaire (EC), carbone organique (OC)) prélevés au cours de l'étude. La composition chimique moyenne est globalement caractéristique d'un environnement urbain comme le souligne la présence de métaux de transition et de composés organiques et aromatiques. Ces PM_{2,5} sont majoritairement composées d'ions inorganiques secondaires dont le nitrate (NO₃⁻), l'ammonium (NH₄⁺) et le sulfate (SO₄²⁻) à hauteur de 32,46 %, 13,17 % et 10,17% respectivement, ainsi que d'une fraction carbonée organique à hauteur de 30,31 %. D'autres composés sont retrouvés dans une moindre mesure dont du carbone élémentaire (5,26 %) et divers éléments chimiques dont les concentrations varient entre 0,43 et 2,52 %.

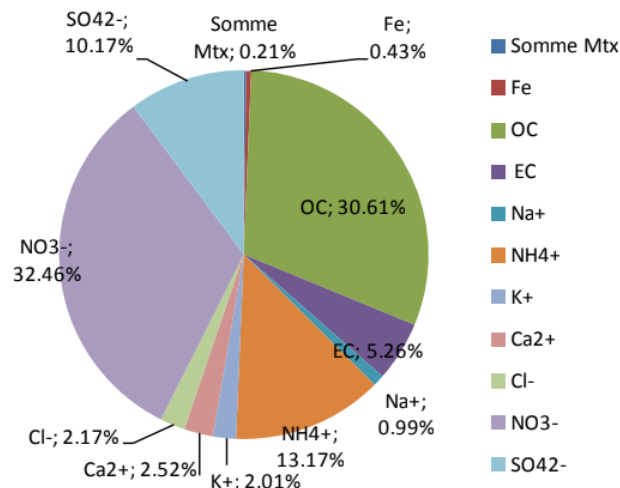


Figure 27 : Composition chimique surfacique élémentaire des PM_{2,5} (%).

3) Quantification des endotoxines

Les résultats de la quantification des endotoxines dans nos trois échantillons de PM_{2,5} aux concentrations de 10 µg, 50 µg et 100 µg de PM_{2,5} en suspension dans 30 µL de PBS, montrent une concentration en endotoxines par mL, exprimée en FC, en moyenne égale à 10,36 ; 15,32 et 34,47, respectivement (figure 28).

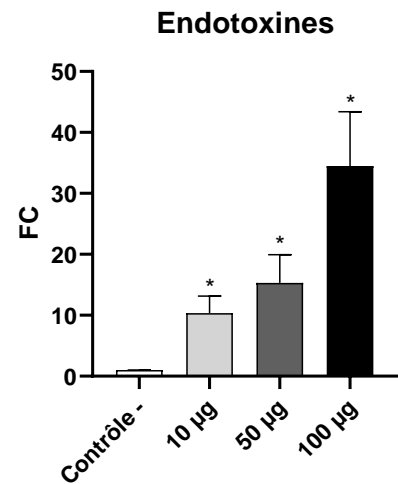


Figure 28 : Quantification des endotoxines dans les PM_{2,5}.

II. MESURE DU POTENTIEL OXYDANT DES PM_{2,5}

La figure 29 présente les résultats de la mesure du potentiel oxydant intrinsèque des particules fines par les tests du DTT (figure 29a), du CM-H₂DCFDA (figure 29b), du glutathion (figure 29c) et de l'acide ascorbique (figure 29d).

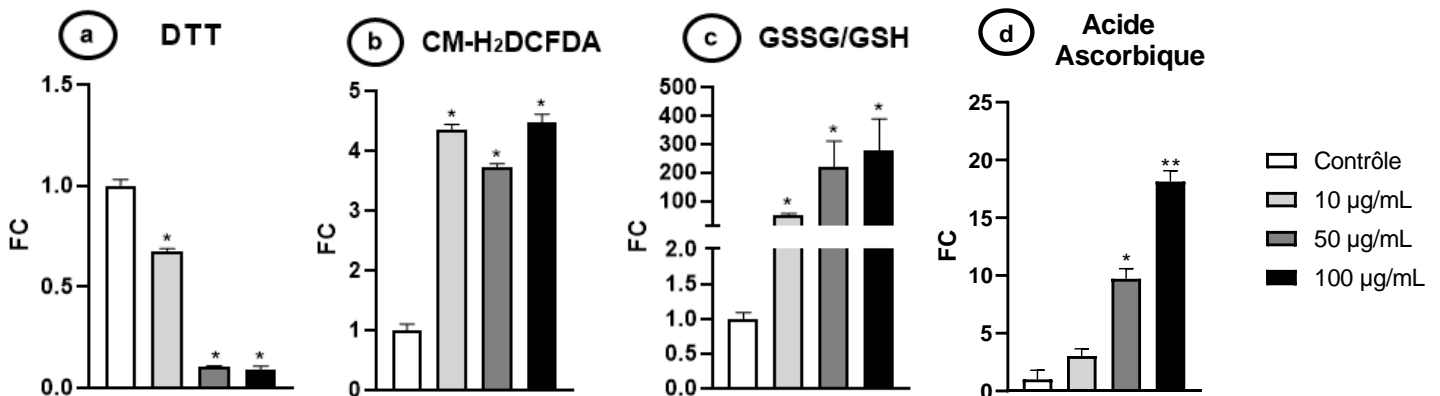


Figure 29 : Étude du potentiel oxydant des PM_{2,5} par les tests du DTT (a), du CM-H₂DCFDA (b), du glutathion (c) et de l'acide ascorbique (d). FC = Fold change, (n = 3, p ≤ 0,05* vs contrôle).

Les résultats obtenus avec le test du DTT montrent une déplétion progressive et significative du DTT présent dans les échantillons avec la dose testée, jusqu'à parvenir à un FC seuil de 0,1 qui est atteint dès la dose de 50 µg/mL de particules. Une augmentation significative de l'oxydation de la sonde CM-H₂DCFDA est observée en présence de particules comparativement au contrôle, atteignant un FC moyen qui ne varie que très peu avec la dose testée du fait d'un phénomène de saturation : 4,35 ; 3,72 ; 4,47 avec les doses de 10 µg/mL, 50 µg/mL et 100 µg/mL de particules, respectivement. Les données obtenues par le test du glutathion montrent, quant à elles, une augmentation significative et progressive du ratio GSSG/GSH avec la dose testée, jusqu'à atteindre un niveau de saturation aux alentours de 300. Enfin, les résultats du test de l'acide ascorbique montrent une augmentation significative et progressive de la consommation en ions ascorbate par les particules au sein des échantillons. Cet effet est d'autant plus important que la dose étudiée est élevée.

III. DÉROULEMENT DU PROTOCOLE D'EXPOSITION DES SOURIS

Les expérimentations animales nécessaires à l'exécution de ce projet de recherche se sont inscrites en conformité avec la Directive 2010/63/UE du Parlement Européen et du Conseil du 22 septembre 2010, relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques et la charte nationale portant sur l'éthique de l'expérimentation animale et avec la règle des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner). L'ensemble du protocole s'est déroulé dans des conditions optimales en veillant quotidiennement au bien-être animal. Une surveillance quotidienne des points limites préalablement établis ainsi qu'une mesure hebdomadaire du poids des animaux furent réalisées (figure 30). Les résultats obtenus montrent que durant le protocole d'exposition subchronique, la prise des poids des animaux était homogène. Une stagnation pondérale des souris exposées est cependant observée lors de la période de recouvrement, tandis que les souris du groupe contrôle continuent quant à elles de prendre du poids. Aucun des points limites initialement choisis (i.e., perte de poids rapide ; longue période de perte de poids conduisant à un état d'amaigrissement ; déficience respiratoire avérée ; présence de larges plaques d'alopécie provoquées par la maladie ; apparence avec poil hérissé, dos rond, abdomen distendu ou léthargie ; paralysie ; saignement par un des orifices ; automutilations persistantes ; lésions interférant avec l'abreuvement ou la prise de nourriture ; diarrhée associé ou si le signe est prolongé) n'a néanmoins été franchis.

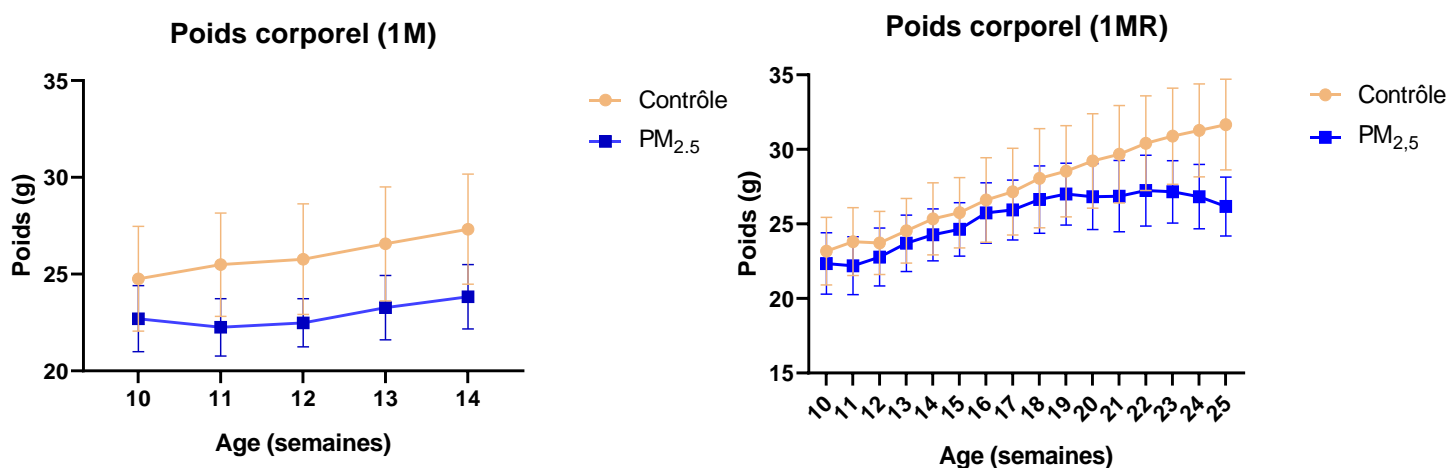


Figure 30 : Courbes de suivis de poids des souris.

(1M = souris exposées 28 jours, 1MR = souris exposées 28 jours avec une période de recouvrement de 2 mois, n = 57).

IV. ÉTUDE DU STRESS OXYDANT

1) Étude des défenses antioxydantes

a) La voie de signalisation NRF2

i. Mesure de l'activité de fixation à l'ADN du facteur de transcription Nrf2

La figure 31 présente les résultats obtenus pour l'étude de la capacité de liaison à l'ADN du facteur de transcription NRF2 par la méthode TransAM. Une exposition aiguë à une faible dose de 10 µg de PM_{2,5} induit une augmentation significative de la capacité de liaison de NRF2 à l'ADN par rapport aux contrôles. Cette augmentation

est d'autant plus importante que la dose testée est élevée. Cette capacité de liaison augmente encore jusqu'à 28 jours d'exposition et reste même visible, dans une moindre mesure, 2 mois après la dernière exposition aux particules.

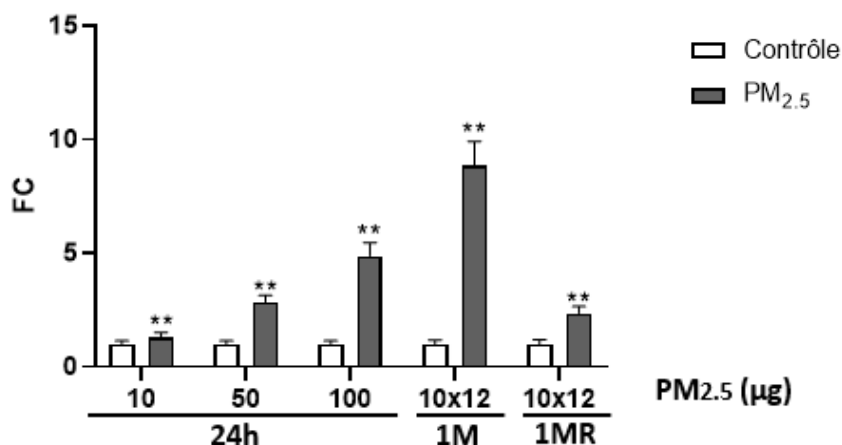


Figure 31 : Mesure de la capacité de liaison à l'ADN du facteur de transcription NRF2.

(FC = Fold Change, 1M = 28 jours d'exposition, 1MR = 28 jours d'exposition + recouvrement, n = 6/groupe, p ≤ 0,01** vs Contrôles)

ii. Étude de l'expression génique de NRF2 et de ses gènes cibles

Les niveaux d'expression du gène *NRF2* et de certains des gènes cibles sous sa dépendance (*GPX1*, *HMOX1*, *KEAP1*, *NF2I2*, *NQO1*, *SOD1* et *TXN1*) ont été mesurés par RT-qPCR dans les poumons des souris exposées aux PM_{2,5} (figure 32).

Dans un premier temps, les résultats obtenus pour *NRF2* montrent qu'une exposition aiguë aux PM_{2,5} induit une augmentation significative de son expression dès la dose de 10 µg. Son expression génique croît encore jusqu'à 28 jours d'exposition et reste visible deux mois après la dernière exposition.

Dans un second temps, pour l'ensemble des gènes cibles de NRF2 à l'exception d'*HMOX1*, une exposition aiguë à une faible dose de 10 µg de PM_{2,5} induit une augmentation significative de leur expression par rapport aux groupes contrôles. Cette dernière est d'autant plus marquée que la dose testée est élevée sauf pour *KEAP1* pour lequel seule la dose de 10 µg a un effet significatif. Cette expression croît encore jusqu'à 28 jours d'exposition pour les gènes *GPX1*, *HMOX1*, *NQO1* et *SOD1*, et reste visible 2 mois après la dernière exposition pour l'ensemble des gènes étudiés exception faite de *KEAP1*.

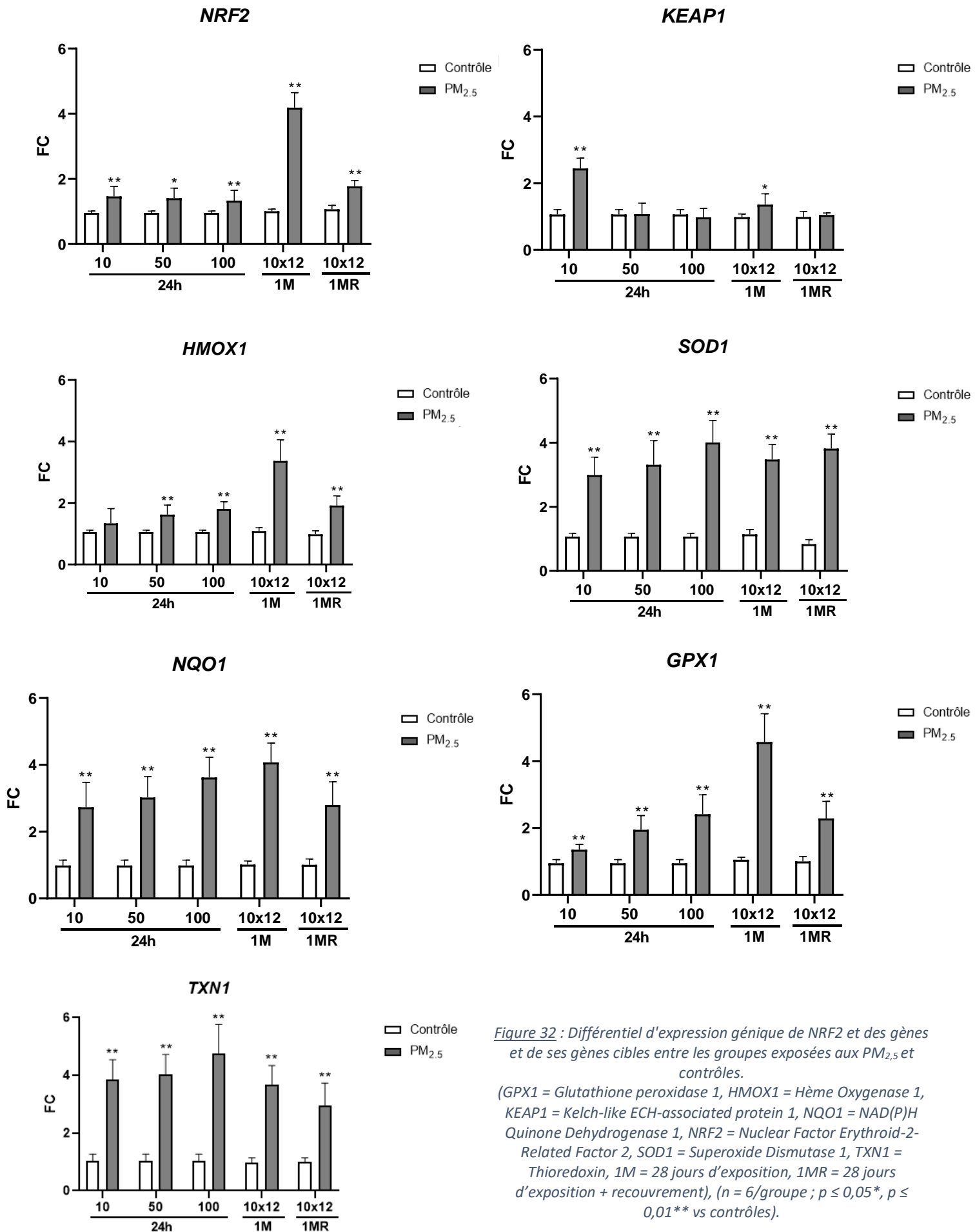


Figure 32 : Différentiel d'expression génique de NRF2 et des gènes et de ses gènes cibles entre les groupes exposés aux PM_{2.5} et contrôles. (GPX1 = Glutathione peroxidase 1, HMOX1 = Hème Oxygenase 1, KEAP1 = Kelch-like ECH-associated protein 1, NQO1 = NAD(P)H Quinone Dehydrogenase 1, NRF2 = Nuclear Factor Erythroid-2-Related Factor 2, SOD1 = Superoxide Dismutase 1, TXN1 = Thioredoxin, 1M = 28 jours d'exposition, 1MR = 28 jours d'exposition + recouvrement), (n = 6/groupe ; p ≤ 0,05*, p ≤ 0,01** vs contrôles).

iii. Analyse d'activités enzymatiques (CAT et SOD)

La figure 33 présente les résultats obtenus pour la mesure de l'activité des enzymes antioxydantes, CAT et SOD, pour lesquelles codent les gènes cibles du facteur de transcription NRF2. Une exposition aiguë à faible dose de 10 µg de PM_{2,5} induit une augmentation significative de l'activité de la SOD, tandis qu'une dose plus élevée de 50 µg de PM_{2,5} est nécessaire pour la catalase. Cet effet est d'autant plus important avec la dose de 100 µg de particules. De manière surprenante, l'activité de ces enzymes diminue après 28 jours d'exposition. Enfin, une élévation est toujours visible deux mois après l'arrêt des expositions.

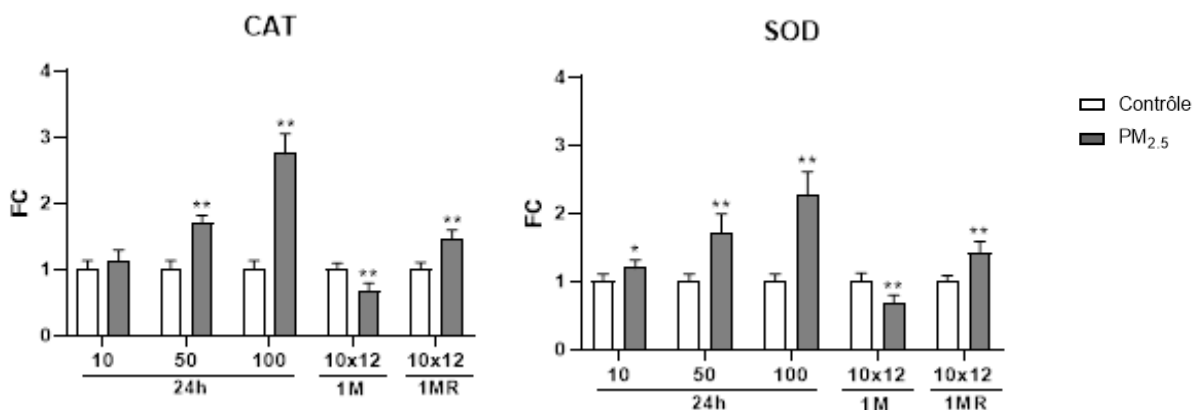


Figure 33 : Mesure de l'activité enzymatique de la catalase (CAT) et de la Superoxyde Dismutase (SOD) chez les souris exposées et contrôles. (FC = Fold Change, 1M = 28 jours d'exposition, 1MR = 28 jours d'exposition + recouvrement ; n = 6/groupe ; p ≤ 0,05*, p ≤ 0,01** vs Contrôles).

b) Étude de l'altération de l'homéostasie du glutathion

i. Mesure du ratio GSSG/GSH

La figure 34 présente les résultats obtenus pour la mesure du ratio GSSG/GSH chez les groupes exposés et témoins. Quelles que soient la dose testée et la durée d'exposition aux PM_{2,5}, une augmentation significative du ratio GSSG/GSH est observée par rapport aux contrôles. Ce ratio est d'autant plus important que la dose étudiée est élevée. Cet effet est également observé suite à une exposition subchronique de 28 jours et reste visible 2 mois après la dernière exposition aux PM_{2,5}.

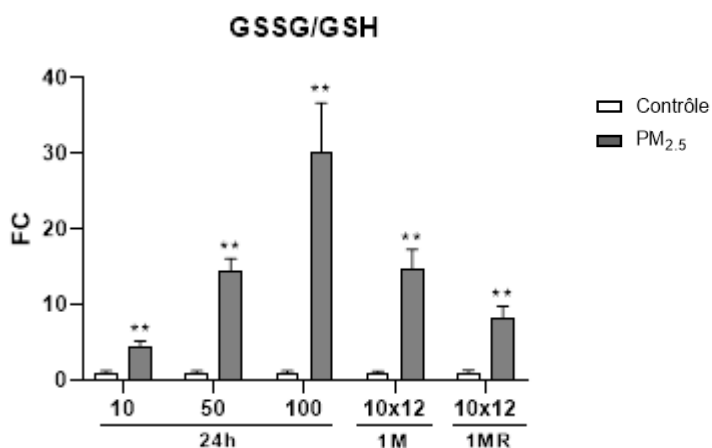


Figure 34 : Mesure du ratio GSSG/GSH chez les groupes exposés et contrôles. (FC = Fold Change, 1M = 28 jours d'exposition, 1MR = 28 jours d'exposition + recouvrement ; n = 6/groupe ; p ≤ 0,01** vs Contrôles).

ii. Analyse d'activités enzymatiques (GPx et GR)

La figure 35 présente les résultats obtenus pour la mesure de l'activité des enzymes antioxydantes, GPx et GR, pour lesquelles codent les gènes cibles du facteur de transcription NRF2. Une exposition aiguë à une dose de 50 µg de PM_{2,5} induit une augmentation significative de l'activité de ces enzymes. Cette dernière est d'autant plus importante avec la dose de 100 µg de PM_{2,5}. À la suite d'une exposition subchronique, cette augmentation continue de croître et reste visible deux mois après cessation des expositions, dans une moindre mesure.

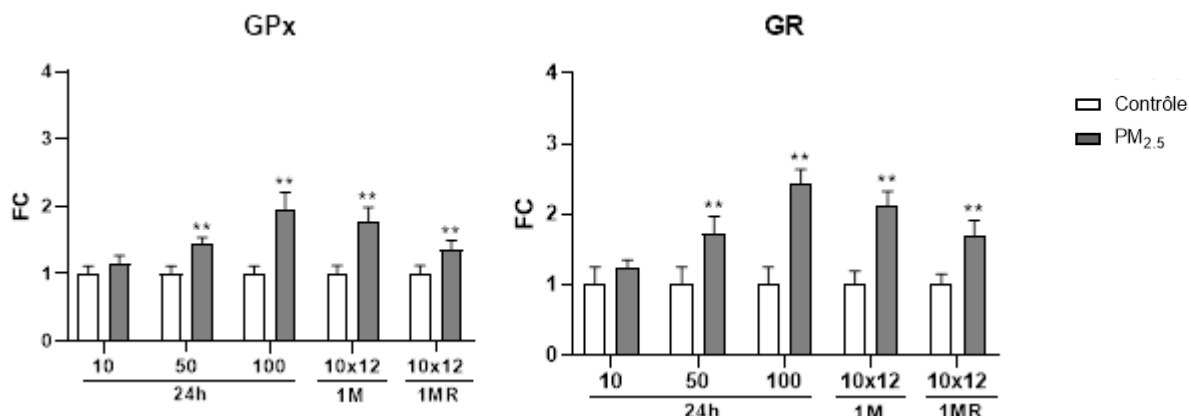


Figure 35 : Mesure de l'activité enzymatique de Glutathion Peroxydase (GPx) et de la Glutathion Réductase (GR) chez les souris exposées et contrôles. (FC = Fold Change, 1M = 28 jours d'exposition, 1MR = 28 jours d'exposition + recouvrement ; n = 6/groupe ; p ≤ 0,01** vs Contrôles).

2) Recherche de lésions oxydatives

La Figure 36 présente les résultats obtenus pour la recherche de lésions oxydatives au niveau de l'ADN, des protéines et des lipides (i.e, 8-OHdG, Prot-CO, 4-HNE et 8-IsoP).

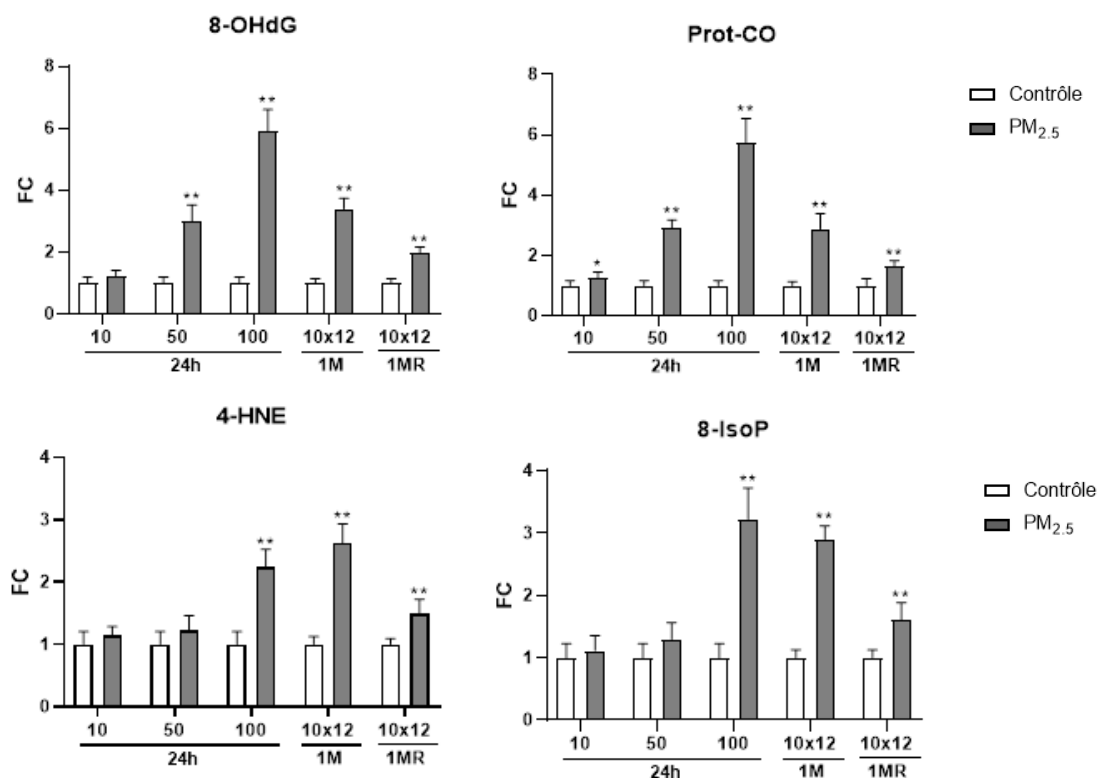


Figure 36 : Recherche de lésions oxydatives chez les souris exposées et contrôles.

(PROT-CO = protéines carbonylées, 4-HNE = 4-Hydroxynonéol, 8-IsoP = 8-Isoprostaglandin F_{2α}, 8-OHdG = 8-oxo-2'-désoxyguanosine, 1M = 28 jours d'exposition, 1MR = 28 jours d'exposition + recouvrement ; n = 6/groupe ; p ≤ 0,05*, p ≤ 0,01** vs Contrôles).

À la suite d'une exposition aiguë à une dose de 10 µg de PM_{2,5}, une augmentation significative des protéines carbonylées peut être observée, tandis qu'il faut attendre d'employer la dose de 50 µg pour le 8-OHdG et une dose encore plus importante de 100 µg pour les marqueurs de peroxydation lipidique 4-HNE et 8-IsoP. Cette augmentation continue de croître jusqu'à 28 jours d'exposition et reste significativement visible deux mois après la dernière exposition pour l'ensemble des paramètres étudiés.

V. ÉTUDE DE L'INFLAMMATION

1) Numération cellulaire du LBA

La figure 37 présente les résultats obtenus pour le comptage cellulaire dans le LBA des souris.

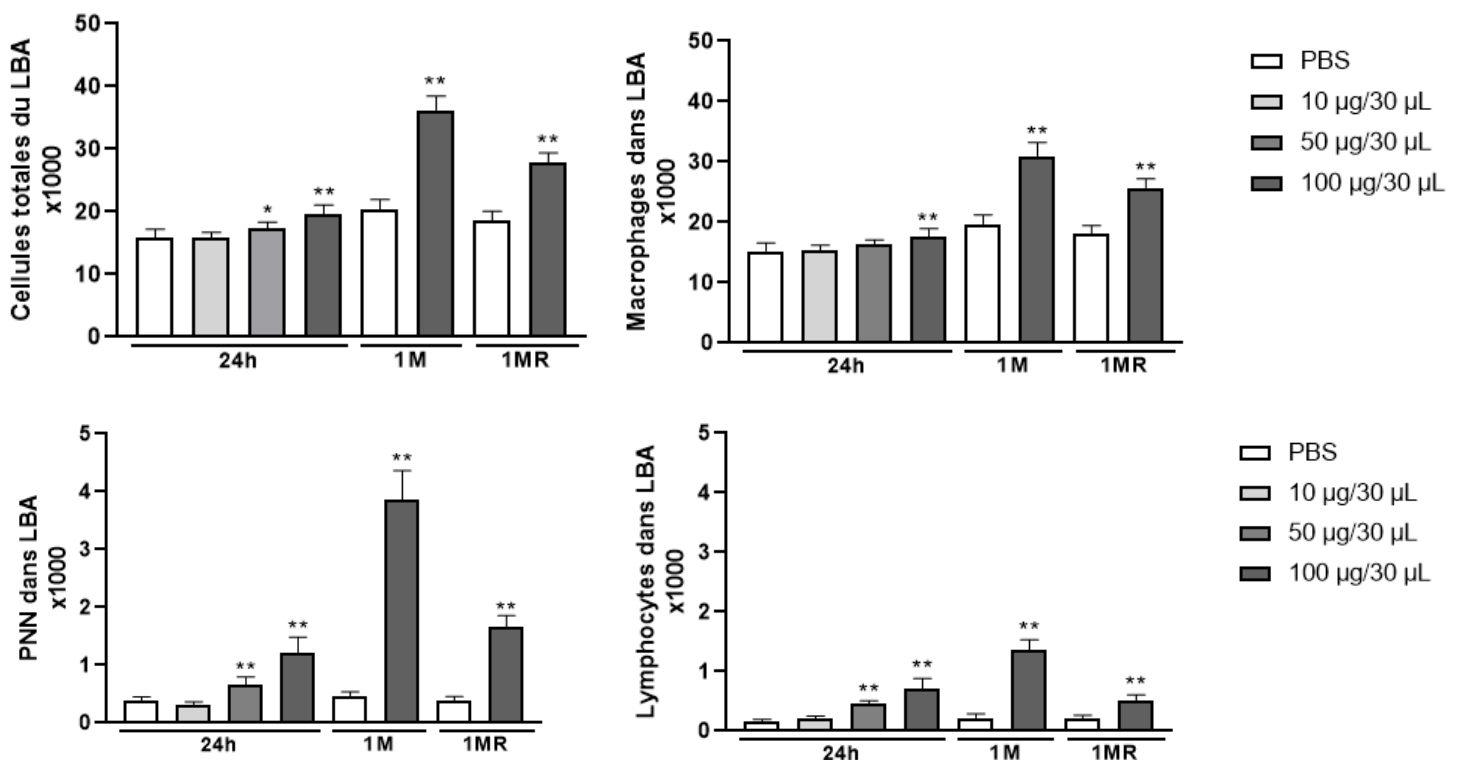


Figure 37 : Numération cellulaire des LBA des souris exposées aux PM_{2,5} et contrôles après 24h, 28 jours ou 28 jours d'exposition + recouvrement. Cellularité totale du LBA, nombres totaux de macrophages, de polynucléaires neutrophiles et de lymphocytes dans le LBA ; ($p \leq 0,05^*$, $p \leq 0,01^{**}$ vs Contrôle).

À la suite d'une exposition aiguë, les LBA présentent un nombre total de cellules significativement augmenté dès la dose de 50 µg de PM_{2,5} par rapport au groupe témoin. Il en est de même pour le nombre de PNN et de lymphocytes alvéolaires. Le nombre de macrophages n'est quant à lui augmenté qu'à partir de 100 µg de PM_{2,5}. L'ensemble de ces paramètres continue de croître jusqu'à 28 jours d'exposition et reste nettement augmenté deux mois après la dernière exposition.

2) Analyses histologiques des tissus pulmonaires

Des marquages immunohistochimiques ont été réalisés à l'aide des anticorps anti-DMBT1 (figure 38 a et b) et anti-Ki-67 (figure 38 b et d) sur les coupes histologiques pulmonaires des souris contrôles ou des souris exposées durant 28 jours aux PM_{2,5}. Le marquage spécifique de la protéine DMBT1 montre une expression cytoplasmique plus importante au niveau péribronchique et alvéolaire chez les souris exposées pendant 28 jours aux particules (figure 38 b), en comparaison avec celle observée dans les tissus pulmonaires des souris contrôles (figure 38 a). De même, les figures 38 c et d montrent que l'expression nucléaire de la protéine Ki-67 est plus marquée dans le tissu péribronchique et le parenchyme des souris exposées pendant 28 jours aux particules (figure 38 d), en comparaison avec celle observée dans les tissus pulmonaires des souris contrôles (figure 38 c).

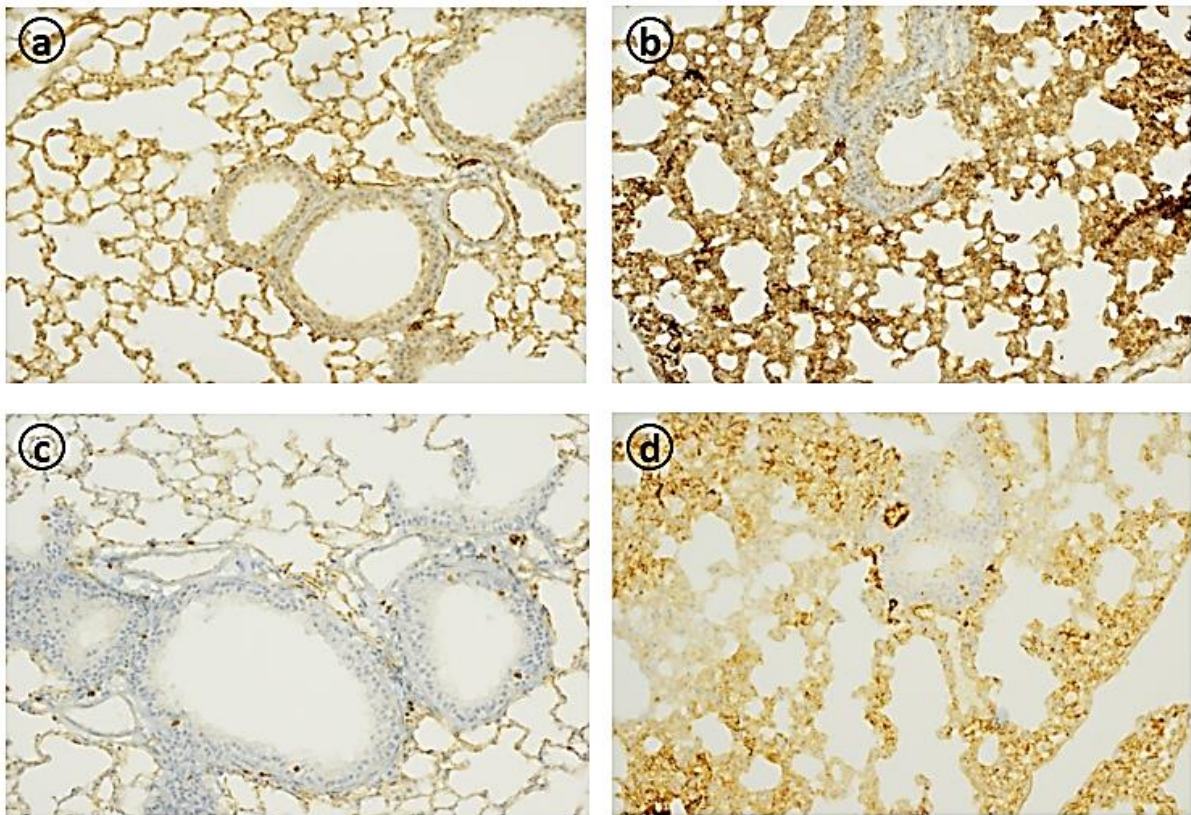


Figure 38: Marquage immunohistochimique de coupes histologiques pulmonaires de souris contrôles (a et c) et exposées durant 28 jours (b et d), avec l'anticorps DMBT1 (a et b) et Ki-67 (c et d), en marron (grossissement x200).

Afin d'avoir une meilleure évaluation des niveaux d'expression de ces deux protéines dans les coupes histologiques pulmonaires, des comptages des cellules pulmonaires respectivement marquées par les anticorps anti-DMBT1 (figure 39) et anti-Ki-67 (figure 40) ont été réalisés en aveugle, chez les souris contrôles et les souris exposées durant 28 jours aux PM_{2,5} avec et sans période de recouvrement.

À la suite d'une exposition subchronique aux PM_{2,5}, une augmentation significative du nombre de cellules bronchiques exprimant la protéine DMBT1 dans leur cytoplasme est rapportée avec, en moyenne, une évolution passant de 1,38 chez les souris contrôles à 3 chez les souris exposées aux PM_{2,5} (figure 39a). Il en est de même pour le nombre de cellules alvéolaires montrant une expression cytoplasmique

de la protéine DMBT1 avec en moyenne un accroissement de 1,25 chez les souris contrôles à 3,25 chez les souris exposées de manière subchronique (figure 39a). Deux mois après cessation des expositions, une persistance de cette augmentation est constatée avec une évolution passant, au niveau alvéolaire, de 1,375 chez les souris contrôles à 3,25 chez les souris exposées et de 1,5 à 3,125 au niveau bronchiolaire (figure 39b).

Des profils similaires d'expression de la protéine nucléaire Ki-67 sont observés au niveau bronchique et alvéolaire (figure 40). L'augmentation significative de cette protéine nucléaire, observée au niveau bronchique, provoque une évolution du nombre moyen de cellules marquées de 2,38 % chez les souris contrôles à 3,88 % chez les souris exposées pendant 28 jours aux PM_{2,5}. Au niveau parenchymateux, le nombre moyen de cellules exprimant la protéine Ki-67 évolue de 3 % chez les souris contrôles à 5 % chez les souris exposées de manière subchronique (figure 40a). De manière intéressante, cette augmentation est amplifiée à la suite de la période de recouvrement, passant au niveau des bronchioles, de 2,75 % chez les souris contrôles à 5% chez les souris ayant été exposées, et de 3,75 % à 5,875 % au niveau parenchymateux (figure 40b).

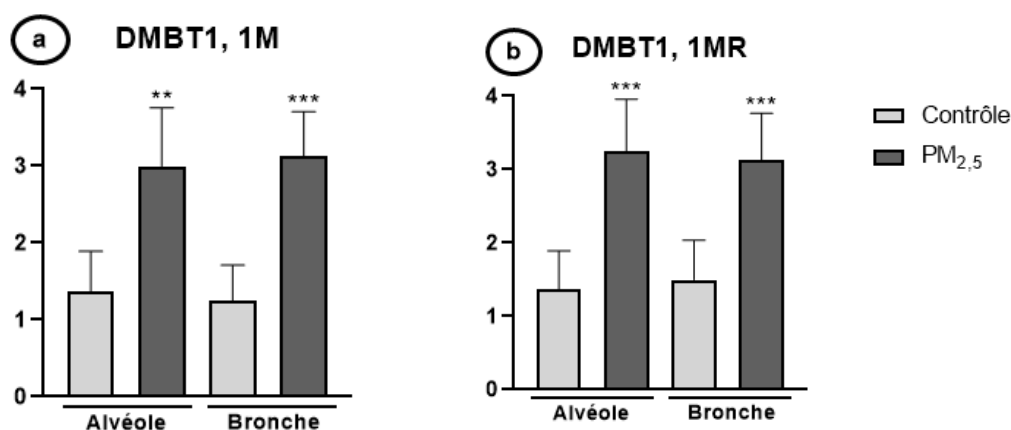


Figure 39 : Comptages cellulaires de cellules pulmonaires marquées au DMBT1, sur une échelle de 1 à 4, chez les souris contrôles et exposées pendant 28 jours avec (b) ou sans (a) période de recouvrement ($p \leq 0,01^{**}$; $p \leq 0,001^{***}$ vs Contrôles).

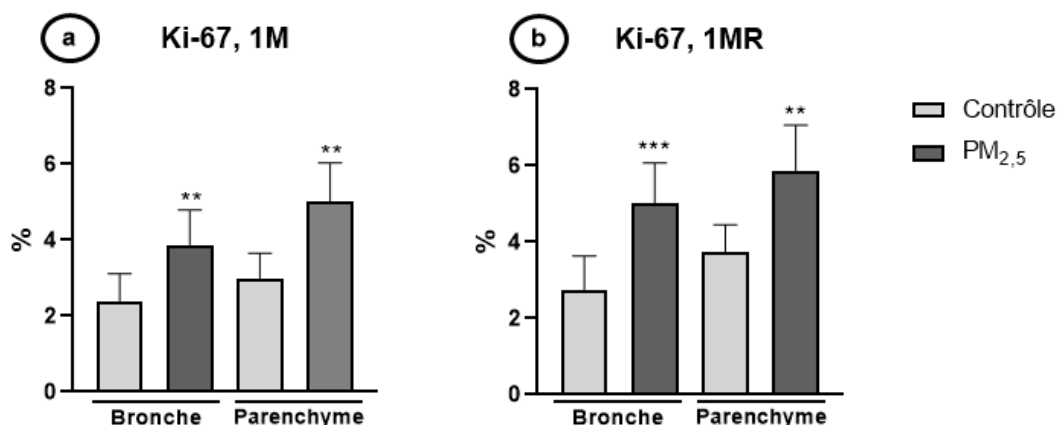


Figure 40 : Comptages cellulaires de cellules pulmonaires marquées au Ki-67, exprimés en %, chez les souris contrôles et exposées pendant 28 jours avec (b) ou sans (a) période de recouvrement ($p \leq 0,01^{**}$; $p \leq 0,001^{***}$ vs Contrôles).

3) Mesure de l'activité de fixation à l'ADN du facteur de transcription NFκB

La figure 41 présente les résultats obtenus pour l'étude de la capacité de liaison à l'ADN de deux des sous unités du facteur de transcription NFκB, p52 et p65, par la méthode TransAM. Il est observé qu'une exposition aiguë (24h) à une faible dose de 10 µg de particules fines induit une augmentation significative de la capacité de liaison à l'ADN de ces deux sous-unités par rapport aux groupes contrôles. Cette augmentation croît avec la dose testée quelle que soit la sous-unité étudiée lors d'une exposition aiguë. Celle-ci est néanmoins plus marquée avec la sous-unité p65. Cette capacité de fixation augmente encore jusqu'à 28 jours (1M) mais n'est plus visible deux mois après la dernière exposition aux particules (1MR).

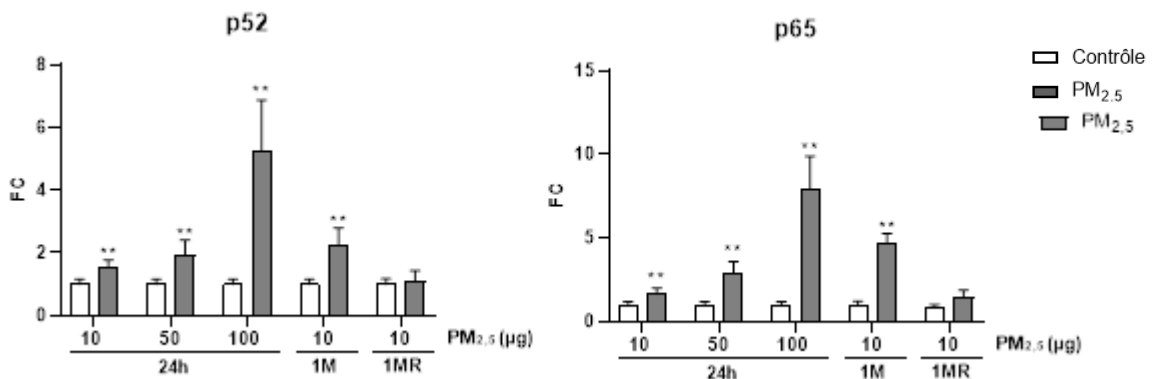
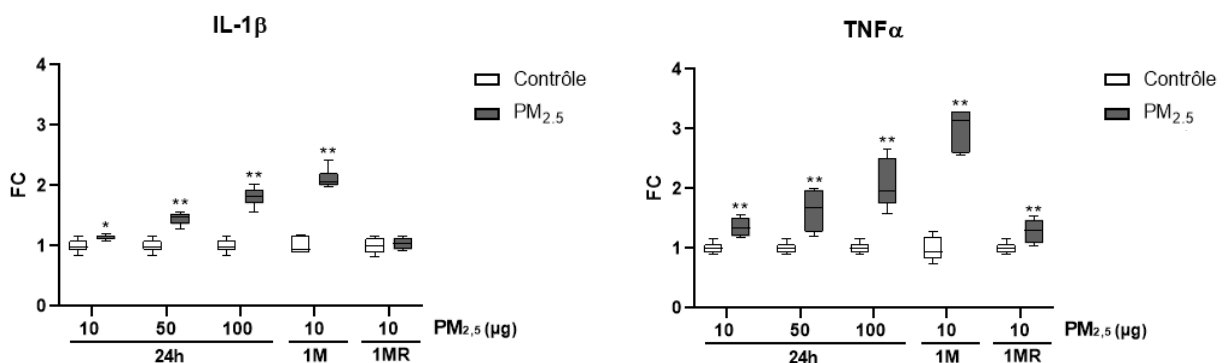


Figure 41 : Mesure de la capacité de liaison à l'ADN des sous-unités p52 et p65 du facteur de transcription NFκB. (FC = Fold Change, 1M = 28 jours d'exposition, 1MR = 28 jours d'exposition + recouvrement ; n = 6/groupe ; p ≤ 0,01** vs Contrôles).

4) Dosage des cytokines (Luminex)

Les niveaux d'expression de 12 cytokines (IL-1β, IL-6, IL-10, IL-13, IL-17A, GM-CSF, Kc, MCP1, MIP1α, MIP1β, RANTES, TNFα) ont été mesurés dans les poumons des souris à l'aide de la technologie Luminex (figure 42).



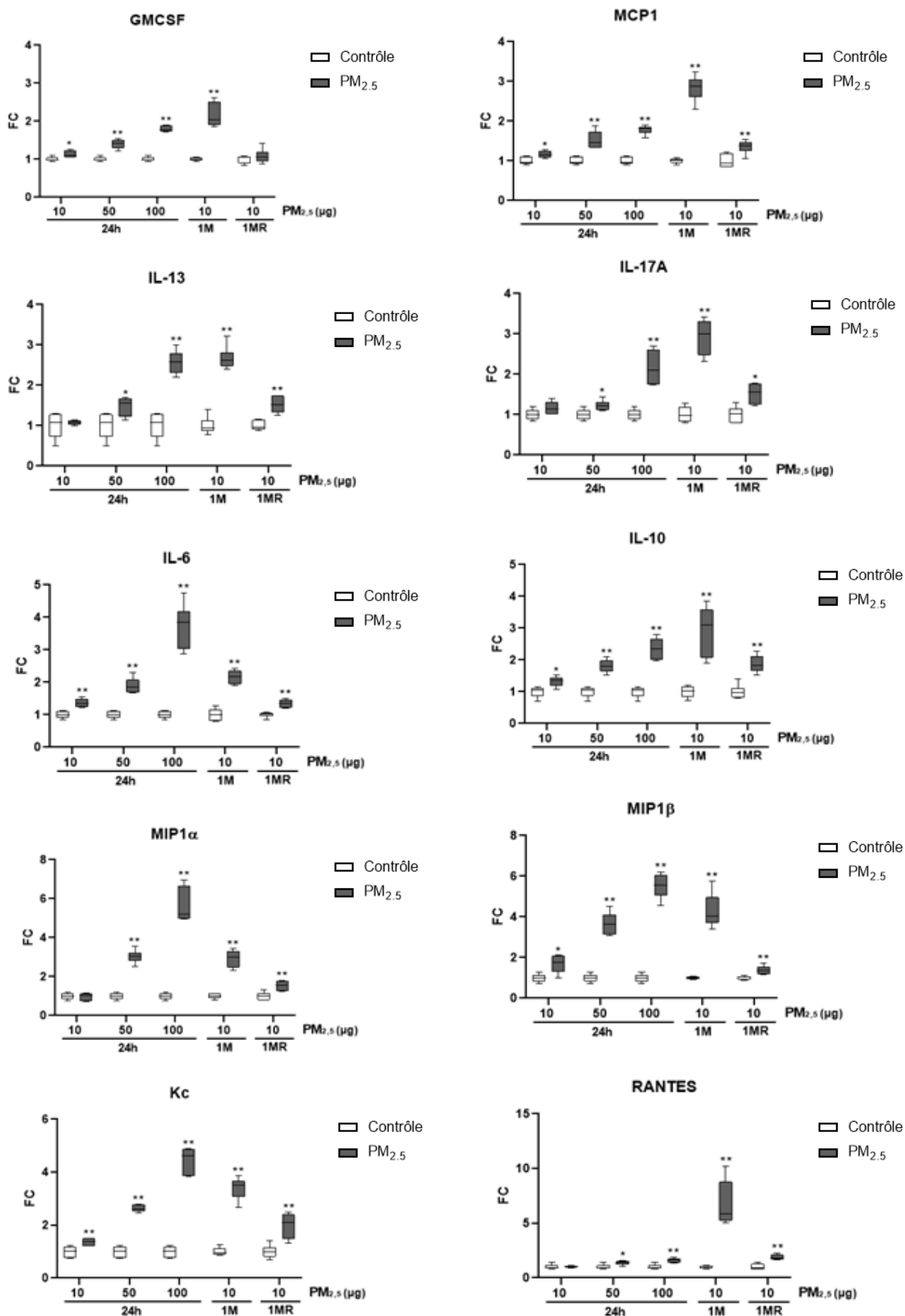


Figure 42 : Mesure de l'expression de 12 cytokines.

GM-CSF (granulocyte macrophage colony stimulating factor), IL-18 (interleukine 18), IL-6 (interleukine 6), IL-10 (interleukine 10), IL-13 (interleukine 13), IL-17A (interleukine 17A), Kc (keratinocytes-derived chemokine), MCP-1 (monocyte chemoattractant protein 1), MIP1 α (mouse macrophage inflammatory protein 1 alpha), MIP1 β (mouse macrophage inflammatory protein 1 beta), RANTES (chemokine ligand 5) et TNF- α (tumor necrosis factor- α) ; (1M = 28 jours d'exposition, 1MR = 28 jours d'exposition + recouvrement) ; (n = 6/groupe ; p \leq 0,05*, p \leq 0,01** vs Contrôles).

Il est possible d'observer qu'une exposition aiguë (24h) à une faible dose de 10 µg de particules induit une augmentation significative de l'expression de ces cytokines à l'exception d'IL-13, IL-17A, MIP1α et RANTES. Cette augmentation croît avec la dose testée quelle que soit la cytokine étudiée. Leurs expressions augmentent encore jusqu'à 28 jours (1M) et restent, dans une moindre mesure, visibles deux mois après la dernière exposition aux particules (1MR) sauf pour IL-1β et GM-CSF.

VI. ÉTUDE DU TRANSCRIPTOME

1) Analyse des ARN messagers

La figure 43 présente les résultats obtenus pour l'étude des profils d'expression pulmonaire des ARNm réalisée par microarrays, dont le FC était inférieur à 0,5 (down-régulé) ou supérieur à 2 (up-régulé) par rapport aux groupes contrôles. Cette technique permet d'effectuer une analyse pangénomique et sans a priori des modifications transcriptomiques pulmonaires potentiellement induites par les différents protocoles d'exposition. À la suite d'une exposition aiguë aux PM_{2,5}, 28 ARNm (i.e., 16 up et 12 down-régulés) sont retrouvés comme étant significativement dérégulés par rapport au groupe contrôle. Ce nombre est d'autant plus important à la suite d'une exposition subchronique, atteignant un total de 85 ARNm différenciellement exprimés (i.e., 81 up et 4 down-régulés). Deux mois après l'arrêt des expositions, 33 miARN sont toujours dérégulés (28 up et 5 down-régulés).

Le tableau 3 et le diagramme de Venn exposé dans la figure 44 présentent les gènes (ARNm) spécifiques et communs aux différents protocoles d'exposition. Ce dernier permet de mettre en évidence deux gènes dérégulés communs à l'ensemble des groupes d'exposition, *DMBT1* et *NR1D1*, respectivement impliqués dans l'inflammation et le rythme circadien. De plus, la majorité des gènes dérégulés à la suite d'une exposition subchronique avec période de recouvrement (1MR) le sont également à la suite d'une exposition subchronique classique (1M) tandis qu'un seul gène n'est commun avec le groupe exposé de manière aiguë.

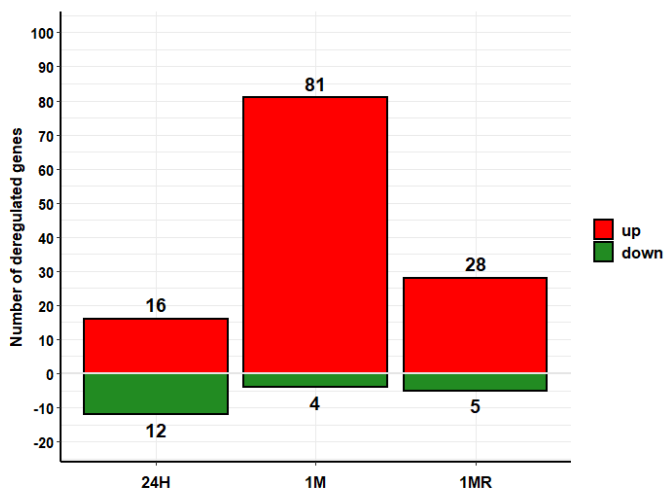


Figure 43 : Nombre d'ARNm pulmonaires dérégulés chez les souris exposées aux PM_{2,5} par rapport aux souris contrôles. (1M = 28 jours d'exposition, 1 MR = 28 jours d'exposition + recouvrement) ; (surexpression : FC ≥ 2 ; sous-expression : FC ≤ 0,5).

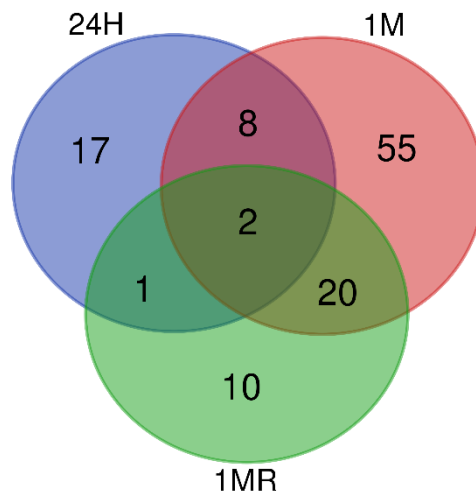


Figure 44 : Diagramme de Venn présentant le nombre d'ARNm dérégulés spécifiques et communs entre les différents protocoles d'exposition. (1M = 28 jours d'exposition, 1 MR = 28 jours d'exposition + recouvrement).

Tableau 3 : Identification des gènes dérégulés en fonction du protocole d'exposition aux PM_{2,5}.

| Names | total | elements |
|------------|-------|---|
| 1M 1MR 24h | 2 | Nr1d1 Dmbt1 |
| 1M 24h | 8 | Saa1 Cxcl5 Saa3 Gm4841 Cd177 Lcn2 Saa2 Nr1d2 |
| 1MR 24h | 1 | lincRNA:chr18:63363388-63365434 reverse strand |
| 1M 1MR | 20 | Cldn22 Gmnc Itlnb Itln1 Tff2 Ccl7 Mmp12 Cica3 Agr2 Plekhs1 Alox12e Tff1 Irg1 Dcstamp lincRNA:chr18:36481237-36481819 forward strand Cxcl3 H2-M2 Myl2 Reg3g Cyp2b13 |
| 24h | 17 | Npas2 Dbp lincRNA:chr17:35080914-35090009 forward strand Ccdc116 Tex11 Aldh3a1 Hlf Tspan4 Trim10 lincRNA:chr12:32781477-32808567 reverse strand lincRNA:chr12:110909258-110913909 forward strand Rasi11a Per3 Avpr1a Spon2 Nfil3 Hspb1 |
| 1M | 55 | Ly6f Scgb3a1 Ccl19 Pglyrp1 Cyp1a1 Fcgbp Vnn1 Cd209e Pdcd1 Serpina3i Erich2 Ccl8 Xcl1 Cyp1b1 Cfb Ptafr Clec4e Retnla Ccl4 Wfdc17 Defa-rs4 Pigr Wfdc18 Vnn3 Capn9 Mab21l3 Cxcl10 Tmc5 Gm15056 Ccl9 Il6 Ifitm1 Mefv Tnfrsf9 Ccl2 Sphkap Il1b Gabrb1 Ch25h Ccl17 Il4i1 Cxcl1 Ly6i Muc5b Noxo1 Gpr84 Ctsk Proz Timp1 Per2 Slc26a4 Muc5ac Cxcl9 Ubd Il12b |
| 1MR | 10 | Ltf Rfx8 lincRNA:chr13:104591573-104599048 reverse strand Fosb IgG2a Igh-VJ558 lincRNA:chr4:3752496-3752901 reverse strand lincRNA:chr9:63774461-63784928 reverse strand lincRNA:chr9:70017793-70045355 reverse strand Slurp1 |

Afin d'identifier les voies de signalisation et les mécanismes dans lesquels ces gènes différentiellement exprimés sont impliqués, une analyse bioinformatique par le logiciel IPA (« Ingenuity Pathway Analysis ») a ensuite été réalisée. Cette analyse fonctionnelle a ainsi permis d'observer que ces altérations transcriptomiques, induites à la suite d'une exposition aiguë et d'autant plus à la suite d'une exposition subchronique, sont capables d'induire ou d'exacerber une inflammation pulmonaire, par activation de gènes impliqués dans le mouvement cellulaire et le trafic de cellules immunitaires (e.g, *CCL2*, *CCL9*, *CCL17*) ainsi que dans la réponse inflammatoire (e.g, *SAA1*, *SAA2*, *DMBT1*, *IL-6*, *IL-12*) (tableau 4).

Tableau 4 : Principales fonctions cellulaires et moléculaires identifiées par le logiciel IPA, chez les souris exposées 28 jours aux PM_{2,5}.

| | P-value | Nombre de molécules |
|--|--------------------------------|---------------------|
| Réponse inflammatoire | $4,22.10^{-3} - 5,84.10^{-16}$ | 43 |
| Trafic de cellules immunitaires | $4,22.10^{-3} - 5,91.10^{-17}$ | 32 |
| Mouvement cellulaire | $4,22.10^{-3} - 5,91.10^{-17}$ | 31 |

Deux mois après l'arrêt des expositions, les gènes différentiellement exprimés sont quant à eux, plutôt impliqués dans le développement, la croissance et la prolifération cellulaires (e.g, *AGR2*, *FOSB*), de même que dans le cancer (e.g, *REG3G*, *TFF1/2*), et donc susceptibles d'induire un remodelage tissulaire et un cancer pulmonaire (tableau 5).

Tableau 5 : Principales fonctions cellulaires et moléculaires identifiées par le logiciel IPA, chez les souris exposées 28 jours aux PM_{2,5}, suivie d'une période de recouvrement de 2 mois.

| | P-value | Nombre de molécules |
|---------------------------------|-------------------------------|---------------------|
| Réponse inflammatoire | $3,42.10^{-2} - 6,65.10^{-4}$ | 12 |
| Développement cellulaire | $4,52.10^{-2} - 1,35.10^{-3}$ | 11 |
| Cancer | $4,26.10^{-2} - 5,70.10^{-4}$ | 8 |

À partir de cette analyse bio-informatique, une liste d'ARNm d'intérêt significativement dérégulés à la suite des expositions aux PM_{2,5} (i.e, down-régulés : $FC \leq 0,5$; up-régulés : $FC \geq 2$) et impliqués dans l'inflammation et la réponse immunitaire a pu être identifiée. Bien qu'offrant une capacité inédite d'analyse d'expression, la technologie par microarrays procure une qualité des données variable qui s'explique par son haut débit d'analyse. C'est pourquoi, il est nécessaire de valider les résultats obtenus par la technique de Rt-qPCR en temps réel qui présente une bien que plus grande sensibilité. Ainsi, l'expression des gènes d'intérêt identifiés (i.e., *DMBT1*, *LCN2*, *SAA1*, *SAA2*, *SAA3*, *CLCL5*, *SCGB3A1*, *TFF1*, *TFF2*, *TIMP1*, *AGR2*, *CAPN9*, *CCL4*, *CCL17*, *CCL2*, *CCL8*, *CCL7*, *TNFRSF9*, *CTSK*, *CXCL10*, *CXCL3*, *CXCL9*, *CYP1A1*, *CYP1B1*, *FCGBP*, *MMP12*, *MUC5AC*, *MUC5B* et *REG3G*) a été quantifiée par RT-qPCR et une comparaison des résultats a été effectuée. La figure 45 présente la corrélation des résultats obtenus par MicroArray et par Rt-qPCR. Pour l'ensemble des modalités d'exposition, le R² tend vers 1, suggérant que les valeurs obtenues par l'intermédiaire des 2 méthodes sont proches.

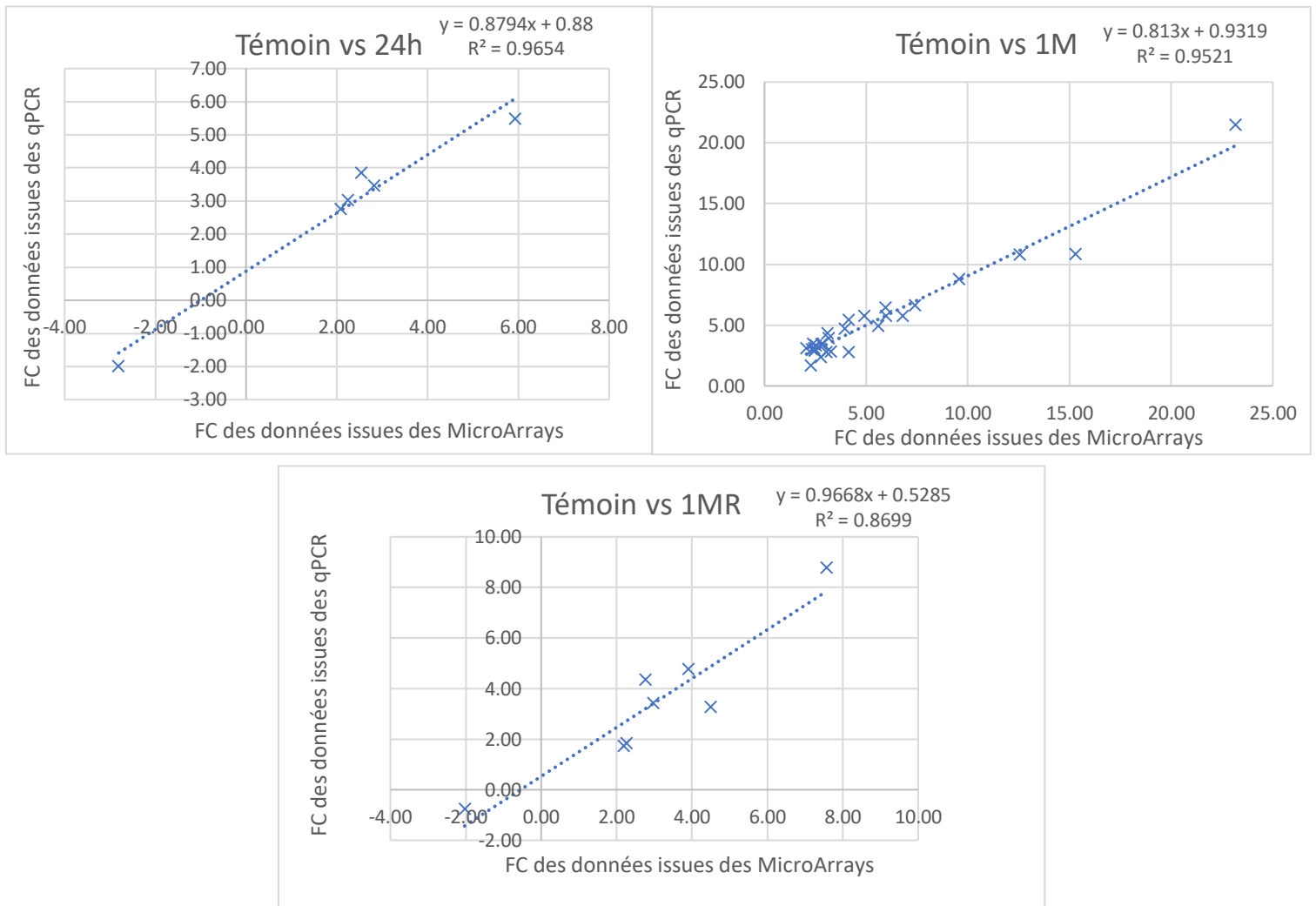


Figure 45 : Corrélation des résultats obtenus par MicroArray et Rt-qPCR (FC = Fold change, 1M = 28 jours d'exposition, 1MR = 28 jours d'exposition + recouvrement).

2) Analyse des miARN

La figure 46 présente les résultats obtenus pour l'étude des profils d'expression pulmonaire de 754 miARN réalisée par OpenArrays, dont le FC est inférieur à 0,5 (down-régulé) ou supérieur à 2 (up-régulé) par rapport aux groupes contrôles. À la suite d'une exposition aiguë aux PM_{2,5}, 7 miARN (i.e., 2 up et 5 down-régulés) sont retrouvés comme étant significativement dérégulés par rapport au groupe contrôle. Ce nombre est d'autant plus important à la suite d'une exposition subchronique, atteignant un total de 27 miARN différentiellement exprimés (i.e., 26 up et 1 down-régulés). Deux mois après l'arrêt des expositions, 7 miARN sont toujours dérégulés (3 up et 4 down-régulés).

Le tableau 6 et la figure 47 présentent les miARN spécifiques et communs aux différents protocoles d'exposition. Seul le miARN 23a est commun aux protocoles d'exposition aiguë (24h) et subchronique (1M). Le protocole d'exposition subchronique avec période de recouvrement (1MR) ne présente, quant à lui, aucun miARN en commun avec les autres types de protocoles d'exposition.

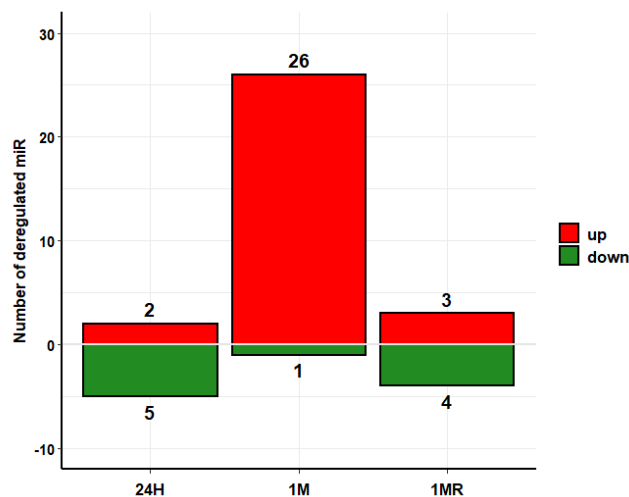


Figure 46 : Nombre de miARN pulmonaires dérégulés chez les souris exposées aux PM_{2,5} par rapport aux souris contrôles. (1M = 28 jours d'exposition, 1 MR = 28 jours d'exposition + recouvrement) ; (surexpression : FC ≥ 2 ; sous-expression : FC ≤ 0,5).

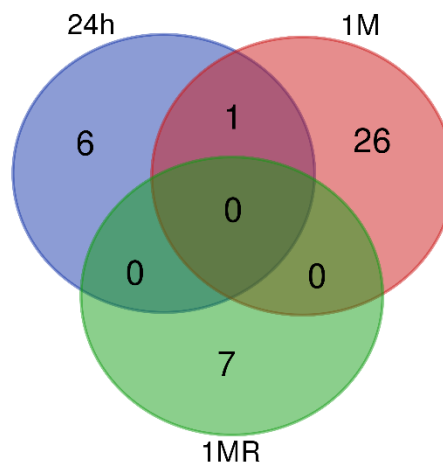


Figure 47 : Diagramme de Venn présentant le nombre de miARN dérégulés spécifiques et communs entre les différents protocoles d'exposition. (1M = 28 jours d'exposition, 1 MR = 28 jours d'exposition + recouvrement).

Tableau 6 : Identification des miARN dérégulés en fonction du protocole d'exposition aux PM_{2,5}.

| Names | total | elements |
|--------|-------|--|
| 1M 24h | 1 | hsa-miR-23a#_002439 |
| 24h | 6 | hsa-miR-147b_002262 mmu-miR-494_001293 mmu-miR-1897-3P_121126 hsa-miR-184_000485 hsa-miR-154_000477 hsa-miR-29a_002112 |
| 1M | 26 | hsa-miR-223_002295 mmu-miR-1930_121201 mmu-miR-16#_002489 mmu-miR-18a#_002490 hsa-miR-22_000398 dme-miR-7_000268 hsa-miR-99b#_002196 hsa-miR-214#_002293 hsa-miR-25_000403 hsa-miR-135b_002261 hsa-miR-139-5p_002289 hsa-miR-27b#_002174 mmu-miR-805_002045 hsa-miR-340_000550 mmu-miR-1949_121182 hsa-miR-30b_000602 hsa-miR-425_001104 mmu-miR-1971_121161 mmu-miR-1981_121200 hsa-miR-28_000411 mmu-miR-1941-5P_121140 hsa-miR-744#_002325 hsa-miR-18a_002422 rno-miR-379#_002081 mmu-miR-701_001635 hsa-miR-421_002700 |
| 1MR | 7 | mmu-miR-362-5p_002614 rno-miR-450_001345 hsa-miR-449_001030 hsa-let-7e#_002407 mmu-miR-467b_001684 mmu-miR-1903_121153 mmu-miR-1898_121195 |

PARTIE IV : DISCUSSION

À l'heure actuelle, les résultats de nombreuses études expérimentales et épidémiologiques ont identifié le rôle clé joué par la fraction particulaire et plus particulièrement par les particules fines dans l'impact sanitaire de la pollution atmosphérique. Néanmoins, les mécanismes physiopathologiques par lesquels elles induisent leur toxicité restent encore mal élucidés. Des recherches sur les effets des PM_{2,5}, en relation avec leurs caractéristiques physico-chimiques et leurs sources, sont donc nécessaires à l'amélioration des connaissances scientifiques et à l'adaptation des mesures de prévention actuellement en vigueur. C'est pourquoi, l'objectif de ce projet de recherche visait à étudier les mécanismes de toxicité des PM_{2,5} ainsi que leur éventuelle persistance après arrêt des expositions, par utilisation d'un modèle murin exposé à différentes doses de PM_{2,5} (0, 10, 50 ou 100 µg/30 µL de PBS) à raison de 3 instillations intranasales par semaine durant 24 heures ou 28 jours, suivis ou non, d'une période de recouvrement de deux mois.

Dans le cadre de ce travail, le choix du modèle s'est porté sur des souris A/J mâles puisqu'il s'agit d'un modèle très fréquemment utilisé dans les études de toxicité pulmonaire, notamment de cancérogénèse, de divers xénobiotiques (e.g., fumée de cigarette, matières particulaires, médicaments) et présentant une sensibilité accrue aux tumeurs pulmonaires chimiquement induites par des mutations de l'oncogène K-ras (128). Des souris exclusivement de sexe mâle ont été choisies, permettant d'éviter l'influence du cycle hormonal retrouvé de façon plus prononcée chez la femelle. Néanmoins, ce choix est critiquable puisqu'on sait dorénavant qu'il existe une influence du genre dans l'impact sanitaire des polluants atmosphériques (129–131). Il serait ainsi judicieux de valider les résultats obtenus chez des souris femelles. Un nombre de six souris par groupe a été utilisé, ce qui semble être un compromis acceptable entre le respect de la règle des 3 R (« Réduire, Remplacer et Raffiner ») et la puissance statistique nécessaire à la mise en évidence des différences significatives.

Lors du protocole d'exposition aiguë, ces souris ont été exposé à des doses croissantes de PM_{2,5} afin de s'assurer que la dose à utiliser pour le protocole d'exposition subchronique n'induirait pas une toxicité trop importante. Les observations réalisées à l'issue de ce protocole ont ainsi suggéré d'utiliser la dose la plus faible de 10 µg de PM_{2,5}/30 µL de PBS, qui, d'après la littérature, s'avère également être la dose la plus faible utilisée dans ce type d'étude toxicologique. Cette dernière présente un autre aspect intéressant puisqu'elle constitue une dose réaliste et représentative du niveau d'exposition des personnes habitants dans les villes polluées lors des pics de pollution. En effet, la fréquence respiratoire de la souris étant en moyenne de 50 mL/min, une exposition à 10 µg de PM_{2,5} se rapprocherait d'une exposition ambiante à une concentration de particules d'environ 139 µg/m³ d'air pendant 24h, ce qui pourrait correspondre approximativement à la concentration en PM_{2,5} lors d'un pic de pollution en France, selon le réseau régional de surveillance de la qualité de l'air « Atmo Hauts-de-France » (132,133). Or, ces pics de pollution sont assez récurrents dans les Hauts de France, puisqu'en 2020, 28 jours d'épisodes de pollution aux PM₁₀ avaient été enregistrés, dont 13 jours dépassant le seuil

d'information et de recommandation fixé à $50 \mu\text{g}/\text{m}^3$, 14 jours d'alerte sur persistance (i.e., dépassement du niveau d'information et de recommandation pendant plusieurs jours), et un jour dépassant le seuil d'alerte journalier français de $80 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (134). De plus, il s'agit d'une concentration observable lors d'événements ponctuels tels que les incendies de forêt, comme constaté en 2009 à Marseille lors d'un feu de végétation durant lequel l'une des stations de surveillance de la qualité de l'air avait mesuré une concentration en PM_{10} passer de $52 \mu\text{g}/\text{m}^3$ en moyenne avant l'incendie à $158 \mu\text{g}/\text{m}^3$ en moyenne durant l'incendie, atteignant une concentration horaire maximale de $302 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (135). Bien que plutôt rare en Europe, cette concentration de $139 \mu\text{g}/\text{m}^3$ est régulièrement dépassée en Chine, atteignant jusqu'à $400 \mu\text{g}/\text{m}^3$ à Pékin de manière récurrente (136,137). En janvier 2013, Pékin avait d'ailleurs enregistré son record de pollution avec $993 \mu\text{m}$ de $\text{PM}_{2,5}/\text{m}^3$, représentant plus de 60 fois le seuil recommandé par l'OMS (136,138,139).

Lors du protocole d'exposition subchronique, les souris adultes alors âgées de 12 semaines, ont été exposées durant 28 jours aux particules, ce qui correspond à une exposition d'environ 3 ans chez l'Homme. Cette durée d'exposition permet donc d'avoir un rationnel avec les expositions quotidiennes des personnes habitant les villes polluées. Cette période a été suivie, ou non, d'une période de recouvrement c'est-à-dire une période durant laquelle les souris n'ont plus été exposées aux particules. Ainsi, le caractère novateur de ce projet repose sur l'utilisation de différents protocoles d'exposition et notamment sur la période de recouvrement de deux mois, présumée être suffisante pour permettre l'élimination des $\text{PM}_{2,5}$ et/ou l'apparition de lésions tissulaires. Elle permet ainsi la génération de nouvelles données sur l'éventuelle persistance des effets nocifs des particules mais aussi sur la possible rétention de ces dernières au sein de l'appareil respiratoire. De plus, les études comportant une période de recouvrement sont encore relativement rares à ce jour, d'autant plus avec une durée aussi longue. Ces expositions se sont faites par instillations intranasales, à raison de 3 instillations par semaine lors du protocole d'exposition subchronique, en prenant soin d'alterner entre chaque narine. Cette technique, non-invasive et indolore, présente de nombreux avantages dont celui de réduire l'exposition systémique des animaux, en ciblant l'appareil pulmonaire. Bien plus naturelle que le recours aux instillations intratrachéales, cette méthode ne nécessite pas de contentions de l'animal et permet ainsi de limiter le stress de ce dernier. Elle permet également une distribution pulmonaire homogène des particules puisqu'elles parcourent l'arbre respiratoire dans son ensemble, depuis le nez jusqu'aux poumons, contrairement à l'exposition intratrachéale (140,141). L'anesthésie légère et non invasive employée offre la possibilité d'utiliser cette technique de façon répétée, permettant une exposition à long terme des animaux. De plus, il s'agit d'un procédé fréquemment utilisé dans le cadre des études toxicologiques portant sur les PM (142–144). Comme toute méthode d'exposition, cette technique présente aussi des inconvénients. En effet, ce modèle d'exposition affecterait la distribution des PM en fonction de leur D_{ae} et ne refléterait pas réellement les interactions des PM avec le système respiratoire, contrairement à l'exposition contrôlée par inhalation directe d'aérosols (i.e., technique dites "nose-only") (145). Bien qu'étant la méthode d'exposition la plus réaliste, cette dernière nécessite des quantités importantes de PM environnementales dont l'accès est très limité, ne rendant pas cela possible dans le cadre de ce projet. C'est pourquoi le mode

d'exposition par instillations intranasales a été jugé comme étant le plus adapté ici. Après avoir défini avec précision les doses, le modèle murin et le protocole d'exposition à employer, les prélèvements particuliers journaliers ont pu être initiés.

Les $PM_{2,5}$ utilisées dans le cadre de ce projet ont été prélevées dans le centre de Lille, en secteur résidentiel et tertiaire, à proximité de grands axes routiers dont la N356 et la D941 et des gares Lille Flandres et Lille Europe. Ces conditions les rendent susceptibles d'être soumises à différentes sources d'émission locales ou régionales, notamment d'origines industrielle, urbaine et routière. La collection de ces particules a été effectuée durant la période hivernale 2013/2014, période sujette aux variations météorologiques durant laquelle le chauffage domestique fonctionnait quotidiennement. Les analyses physico-chimiques réalisées par l'IMT ont permis de caractériser les profils de sources spécifiques de la zone, qui révèlent 8 sources potentielles d'émissions (i.e., aérosols inorganiques secondaires, AIS : 37,8%, combustion biomasse : 20,6%, trafic automobile : 14,7%, combustion charbon : 8,7%, resuspension du sol : 8,1%, ferroviaire : 5,3%, marin : 4,8% et métallurgie : 0,1%). La source des AIS est en relation avec les sources longue distance du Nord et Est de l'Europe. Il ressort de cette étude statistique que 6 sources sur les 8 identifiées sur la période considérée sont majoritairement issues de sources locales, en moyenne 57,4% de la masse des $PM_{2,5}$ lors de ces campagnes. Il est donc pertinent de considérer ces $PM_{2,5}$ comme représentatives de la pollution particulaire impactant la santé des habitants de Lille. La composition chimique de ces particules conditionnant leur toxicité, une identification précise des différents composants de ces dernières s'est avérée indispensable à la compréhension de leurs mécanismes d'action toxique.

Ces analyses physico-chimiques ont ainsi permis de confirmer le caractère urbain de ces particules, notamment par la présence importante de composés organiques et aromatiques et de métaux de transition. La concentration de ces derniers est en accord avec ce qui a pu être mesuré dans d'autres grandes villes de la région Hauts de France, notamment à Dunkerque (146,147). Cette composition complexe des PM conditionne leur toxicité et présente une forte hétérogénéité puisqu'elle peut être influencée par différents facteurs environnementaux comprenant la source d'émission, les conditions atmosphériques ou la localisation, et des facteurs physico-chimiques comprenant leur capacité à absorber les HAP et les COV, la taille et la morphologie des particules qui influencent notamment leur niveau de pénétration dans l'arbre bronchique ainsi que leurs interactions avec d'autres composants de l'air, pouvant être à l'origine de nouveaux composés toxiques (148–150). Pourtant, cette composition physico-chimique des particules n'est pas prise en compte dans la réglementation des $PM_{2,5}$ à l'heure actuelle, celle-ci ne retenant que la masse et le nombre des particules. Afin de ne pas négliger cet aspect au cours de ce projet, il a ainsi été décidé d'étudier le potentiel oxydant des particules.

La mesure du potentiel oxydant des PM, qui correspond à la capacité des différents composés des PM à générer des ERO et/ou à oxyder les molécules antioxydantes, est employée de plus en plus fréquemment dans les études de toxicologie cherchant à étudier le stress oxydant. Dans le cadre de ce projet, quatre tests acellulaires ont été réalisés (i.e., DTT, CM- H_2 DCFDA, GSSG/GSH et AA) dont les résultats obtenus suggèrent un fort potentiel oxydant intrinsèque des $PM_{2,5}$,

proportionnel à la dose testée. Ce pouvoir oxydant des PM_{2,5} pourrait s'expliquer par les constituants chimiques majoritaires composant ces dernières, à savoir les ions inorganiques secondaires (i.e, NO₃⁻, SO₄²⁻, NH₄⁺), les métaux de transition (e.g, Fe, Cu, Mn) et la fraction carbonée organique, connus pour participer activement au potentiel oxydant des PM. L'étude de la littérature montre la complémentarité des tests employés et la nécessité de les combiner afin de prendre en considération l'ensemble des espèces susceptibles de contribuer au potentiel oxydant des PM et la diversité de leurs sources d'émission (151–154). En effet, la sensibilité de chacun de ces tests à l'égard des ERO est variable. Ainsi, l'AA et le DTT seraient principalement sensibles aux métaux de transition et aux espèces organiques oxygénées telles que les quinones tandis que le CM-H₂DCFDA ne détecterait que certains types d'ERO, à savoir les radicaux nitryle (°NO₂), hydroxyle (°OH), aloxyle (RO°), peroxyde (ROO°), le peroxyde nitrite (ONOO⁻) et les peroxydes (155–158). Le GSH, quant à lui, détecterait la plupart des ERO, y compris les peroxydes, les alcénals, les disulfures de protéines et les acides sulféniques (159). Ces ERO peuvent être d'origine exogène dans le cas où il s'agit des molécules adsorbées par les PM ou constitutrices de leur « cœur » (e.g métaux, HAP...) (56,57), ou d'origine endogène si générées dans l'organisme par l'intermédiaire de diverses réactions cellulaires catalysées par les PM (e.g, inflammation, stress mitochondrial et activation d'oxydases membranaires) (160,161). Les résultats obtenus par l'intermédiaire de ces 4 tests ont démontré le fort potentiel oxydant intrinsèque des PM ; ce dernier étant proportionnel à la dose utilisée jusqu'à atteindre un niveau de saturation. Ces résultats encourageants ont cependant été obtenus dans des milieux acellulaires, soulignant la nécessité d'en étudier les conséquences dans un milieu biologique, à savoir le poumon murin.

Cette génération catalytique d'ERO combinée à l'épuisement simultané des systèmes antioxydants conduit à un déséquilibre de l'homéostasie redox et au développement d'un stress oxydant. Les résultats de nombreuses études expérimentales ont démontré que l'exposition aux PM induisait ce stress oxydant au niveau pulmonaire, à des doses non cytotoxiques (162–165). Ce dernier peut conduire à des altérations cellulaires au niveau de l'ADN, des protéines et des lipides pouvant aboutir au développement et/ou à l'aggravation de diverses pathologies (51,166,167). Afin de prévenir ou de réparer ces dommages, des défenses antioxydantes endogènes, de nature enzymatique ou non, se mettent en place. Ceci est le cas notamment de la voie de signalisation antioxydante NRF2, dont nous avons étudié l'activation, dans un premier temps, par analyse de sa capacité de liaison à l'ADN et mesure de son expression génique. À la suite d'une exposition aiguë aux PM, ces deux paramètres sont significativement augmentés mais la dose testée ne semble pas influencer sur sa capacité de liaison à l'ADN tandis qu'elle influe positivement sur son expression génique. Ces deux paramètres sont nettement augmentés à la suite d'une exposition subchronique, témoignant de l'importance de la répétition des expositions. Enfin, deux mois après la dernière exposition aux PM, ces derniers restent significativement augmentés, suggérant la persistance du stress oxydant pulmonaire malgré l'arrêt des expositions. L'expression génique de *KEAP1* a ensuite été mesurée dans un second temps. Seuls les protocoles d'exposition aiguë et subchronique à la dose de 10 µg de PM ont induit une augmentation significative de son expression. Ces résultats ne sont pas surprenants puisqu'en présence d'un stress oxydant, l'activité de

la protéine Keap1 est nulle ; cette dernière relarguant Nrf2 et se retrouvant à l'état inactif dans le cytosol. Dans un troisième temps, l'expression génique des gènes cibles du facteur de transcription NRF2 (i.e, *GPX1*, *HMOX1*, *SOD1*, *NQO1* et *TXNN1*), codant pour des enzymes ayant une activité antioxydante, détoxifiante et cytoprotectrice, a été mesurée dans les poumons de l'ensemble des souris. Les résultats obtenus montrent qu'à la suite d'une exposition aiguë ou subchronique aux PM, ces gènes sont surexprimés, quelle que soit la dose utilisée et la durée des expositions, à l'exception de la dose de 10 µg de PM qui n'induit pas une augmentation significative de l'expression d'*HMOX1*. Cet effet est d'autant plus important que la dose employée est élevée. À la suite de la période de recouvrement, cette augmentation d'expression persiste de manière significative pour l'ensemble des gènes étudiés. Afin de compléter ces données obtenues au niveau génique, l'activité de la glutathion peroxydase (GPx) et de la superoxyde dismutase (SOD) pour lesquelles codent respectivement les gènes *GPX1* et *SOD1* a également été étudiée. Les résultats obtenus ont ainsi montré des résultats parfaitement similaires à ce qui avait pu être observé au niveau génique. De même, l'analyse de deux autres enzymes antioxydantes, CAT et GR, ont montré des résultats proches qui diffèrent néanmoins par une diminution de l'activité de ces dernières après 28 jours d'exposition. Cette particularité pourrait s'expliquer par une concentration en ERO trop importante, excédant la capacité antioxydante de ces enzymes et conduisant, dans un contexte de stress oxydant, à leur inhibition. Le glutathion réduit, autre mécanisme de défense antioxydant de nature non enzymatique, a également été analysé au sein des tissus pulmonaires murins. Ce dernier est significativement diminué à la suite des expérimentations, quelle que soit la dose et la durée d'exposition testées, au profit du glutathion oxydé. L'ensemble de ces résultats suggèrent donc l'activation de différents moyens de lutte antioxydante à la suite d'une exposition aiguë ou répétée à des PM, ce qui concorde avec les résultats d'autres études expérimentales (68,168–170). De manière surprenante, ces défenses antioxydantes restent vigoureusement actives à la suite de la période de recouvrement de deux mois, suggérant la persistance d'un stress oxydant pulmonaire bien que les souris ne soient plus exposées aux particules, amenant à s'interroger sur leur efficacité. C'est pourquoi, des biomarqueurs de lésions oxydatives ont été recherchés au niveau de divers constituants cellulaires tels que les lipides, les protéines et l'ADN.

Ces analyses ont démontré que malgré leur activation, des lésions oxydatives (i.e, 4-HNE, 8-IsoP, 8-OHdG, Prot-CO) étaient générées de manière dose et temps dépendants. Ces dommages, déjà présents après une exposition aiguë, sont d'autant plus marqués après une exposition subchronique aux PM et restent même visibles deux mois après leur arrêt. Cela semble suggérer que les dégâts cellulaires induits par les PM se font de manière précoce chez les animaux exposés et que les systèmes de protection antioxydante ne sont pas en mesure de faire face à des dommages aussi importants, même plusieurs semaines après l'arrêt des expositions. Ces altérations non réparées par l'organisme peuvent perturber des mécanismes cellulaires tels que la croissance, la prolifération ou encore l'apoptose et conduire à la carcinogénèse. Ceci est particulièrement le cas du 8-OHdG ; biomarqueur d'oxydation à l'ADN doté d'un haut potentiel mutagène (171). Plusieurs études *in vitro* ont démontré que les PM induisaient des cassures double-brin de l'ADN et la formation du 8-OHdG dans des

cellules épithéliales pulmonaires, de manière dose et durée dépendante (51,172,173). Une étude *in vivo* réalisée préalablement au laboratoire et ayant étudiée la génotoxicité des PM_{2,5} chez des souris Balb/c n'a, quant à elle, montré aucune augmentation significative du 8-OHdG à la suite des expositions aiguës et subchroniques (174). Cette différence de résultats peut s'expliquer par le modèle de souris employée puisque les souris A/J sont beaucoup plus sensibles que les souris Balb/c. À l'inverse, d'autres études *in vivo* ont des résultats similaires à ceux obtenus dans le cadre de notre projet, que ce soit chez des rats, des souris saines ou asthmatiques (175–177). Par ailleurs, des associations entre ces niveaux de 8-OHdG dans les urines et/ou l'ADN des lymphocytes et les niveaux d'exposition aux PM et plus particulièrement aux HAP et aux métaux de transition adsorbés par ces derniers ont été identifiées chez l'Homme (178–180). Des études *in vitro* ont démontré que l'oxydation des protéines réduisait l'efficacité de certains processus cellulaires vitaux, notamment la réparation de l'ADN (181,182). Nos résultats ont montré que l'exposition aux PM_{2,5} induisait une oxydation importante des protéines pulmonaires, conséquence du stress oxydant, susceptibles de réduire la capacité des cellules à réparer les dommages causés à l'ADN. Ceci pourrait expliquer la similitude des résultats obtenus pour le 8-OHdG et les PROT-CO. Cette oxydation des protéines à la suite d'une exposition particulière a également été obtenue dans d'autres études expérimentales (183,184). Enfin, les résultats du dosage des marqueurs de peroxydation lipidique, susceptible d'altérer les membranes cellulaires, ont montré une augmentation significative du 4-HNE et du 8-IsoP à la suite des expositions, notamment subchroniques. Ces résultats sont concordants avec ceux obtenus dans le cadre d'études *in vitro* préalablement réalisés au laboratoire (183,185) et également chez une étude chinoise réalisée *in vivo* chez la souris (186). Globalement, l'ensemble de ces données suggère que la pénétration alvéolaire des PM_{2,5} induit la génération d'ERO et radicaux libres impliqués dans le développement de lésions oxydatives diverses au niveau pulmonaire. Malgré l'induction de molécules antioxydantes, l'homéostasie redox n'est pas restaurée, ayant pour conséquence un important stress oxydant qui ne se résorbe pas et subsiste jusqu'à plusieurs semaines après l'arrêt des expositions, pouvant conduire à l'apparition ou à l'exacerbation de pathologies pulmonaires à travers l'inflammation des voies respiratoires. C'est pourquoi, il a été jugé judicieux d'étudier l'induction potentielle de cette réponse inflammatoire au sein des tissus pulmonaires ainsi que son éventuelle persistance après arrêt des expositions, à l'aide de divers paramètres biologiques.

En effet, ce déséquilibre oxydants/antioxydants pulmonaire conduit à l'activation de la voie de signalisation NFκB, chef d'orchestre de la réponse inflammatoire (187). En conditions physiologiques, NFκB se trouve dans le cytoplasme, lié à son inhibiteur IκB mais en présence d'un corps étranger tel que les PM, NFκB est transloqué dans le noyau cellulaire où il va se lier aux promoteurs de ses gènes cibles codant pour des médiateurs de la réponse inflammatoire. Des altérations du statut redox GSH/GSSG par les oxydants environnementaux telles que cela a pu être observé dans notre étude peuvent également moduler l'activation du facteur de transcription NFκB, conduisant à la transcription de gènes pro-inflammatoires (72). Ainsi, NFκB cible l'inflammation non seulement directement en augmentant la production de cytokines inflammatoires, de chimiokines et de molécules

d'adhésion, mais aussi en régulant la prolifération cellulaire, l'apoptose, la morphogénèse et la différenciation (188). Cette activation du facteur NFκB a été quantifiée grâce au kit TransAM mesurant sa capacité de liaison à l'ADN. Les résultats obtenus montrent une augmentation significative de ce paramètre de manière dose et durée dépendante, qui n'est plus visible deux mois après cessation des expositions. Cela suggère que cette activation a été réalisée de manière très précoce, même à la suite d'une exposition unique à une faible dose de particules. La chronicité des expositions entretient ce processus qui, après arrêt des expositions, retrouve son état basal. Afin de compléter ces données, un panel de cytokines et chimiokines a été dosé dans les tissus pulmonaires : les résultats ont montré une augmentation significative de plusieurs cytokines pro-inflammatoires (e.g, IL-1β, IL-6, IL-17A, TNFα) et chimiokines (i.e, Kc, MCP1, MIP1α, MIP1β, RANTES) impliquées dans le trafic et l'activation cellulaire, confirmant ainsi qu'une réponse inflammatoire pulmonaire était induite, quelles que soient les conditions d'exposition aux particules. Ces médiateurs inflammatoires sécrétés par les cellules épithéliales respiratoires participent activement au recrutement des cellules immunitaires. La numération cellulaire des LBA a d'ailleurs montré que les expositions particulières, qu'elles soient aiguës ou subchroniques, induisaient une augmentation significative du nombre totale de cellules et plus particulièrement du nombre de PNN au niveau pulmonaire. De nombreuses études *in vivo* confirment ces observations. À titre d'exemples, après une exposition aiguë à une dose de 100 µg de PM_{2,5}, des souris CD1 exposées par instillations intratrachéales présentent une augmentation de l'IL-6, du TNF-α et du nombre de neutrophiles dans les lavages broncho-alvéolaires (189). Il en est de même pour des souris BALB/c exposées par instillations intratrachéales à 120 µg/mL de PM_{2,5} pendant 14 jours (190). En parallèle, une augmentation significative de l'IL-10 est observée, suggérant qu'une réponse anti-inflammatoire est également enclenchée afin de résoudre l'inflammation pulmonaire induite par les particules. En effet, cette dernière possède des propriétés immunosuppressives et anti-inflammatoires, lui conférant un rôle central dans la limitation de la réponse immunitaire vis-à-vis des agents pathogènes, maintenant ainsi l'homéostasie normale des tissus. Ses propriétés la rendent capable d'induire l'élimination des mitochondries dysfonctionnelles, d'inhiber l'apoptose et de favoriser la clairance des PNN (191,192). Une étude a par ailleurs démontré que l'administration d'IL-10 chez des rats exposés aux PM_{2,5} permettait de contrôler l'inflammation en réduisant le stress oxydant et l'apoptose par activation de la voie de signalisation AMPK/SIRT1/PGC-1α (193). L'induction de cette réaction inflammatoire par les particules appartient aux processus de l'immunité innée. Si elle n'est pas suffisante pour réinstaurer une homéostasie tissulaire, l'immunité adaptative est instaurée. Par ailleurs, chez les souris soumises aux protocoles d'exposition aiguë et surtout subchronique, les observations histologiques couplées aux analyses immunohistochimiques des tissus pulmonaires ont permis de mettre en évidence des foyers inflammatoires péribronchiques et alvéolaires, marqués par la présence d'infiltrats de cellules inflammatoires, d'une alvéolite et d'un épaissement de la paroi alvéolaire, ainsi que par la surexpression cytoplasmique de la protéine DMBT1, même deux mois après arrêt des expositions particulières. Cette protéine, exprimée dans les pneumocytes de type II, les cellules épithéliales et les glandes associées de l'arbre respiratoire, jouent un rôle dans l'inflammation et l'immunité innée. Celle-ci serait

impliquée dans la régulation de la réponse inflammatoire en stimulant la migration des macrophages alvéolaires, la différenciation des cellules épithéliales, l'activation de la cascade du complément et la suppression tumorale (194). Elle contribuerait également à l'élimination des pathogènes en raison de son importante capacité de liaison à ces derniers. Chez les sujets sains, elle est exprimée en faible concentration tandis qu'en cas d'infection et d'inflammation, sa concentration est nettement augmentée (195). Des études ont d'ailleurs montré une augmentation de l'expression de DMBT1 dans diverses pathologies pulmonaires telles que la fibrose kystique et les carcinomes pulmonaires (196,197). En outre, l'existence d'une corrélation positive entre le pourcentage de pneumocytes de type II exprimant DMBT1 et la gravité de l'inflammation a été démontrée (196). Une étude récente a également démontré l'implication de cette protéine dans l'induction de l'angiogenèse et la réparation vasculaire en agissant au niveau de l'adhésion, de la migration et de la prolifération des cellules endothéliales ainsi qu'en se fixant sur divers facteurs de croissance tels que le Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) et l'EGF (198). À ce jour, aucune étude n'a cherché à mesurer ce biomarqueur au niveau pulmonaire. Seule une étude épidémiologique portant sur les PM_{2,5} a cherché à mesurer l'expression de l'isoforme salivaire de ce biomarqueur, nommé « agglutinine salivaire » (SAG), chez des enfants quotidiennement exposés aux PM_{2,5} dans des zones sujettes aux déchets électroniques. Les résultats obtenus dans le cadre de cette étude évolue dans le sens inverse de ce que nous avons pu observer dans notre projet, avec une diminution de SAG, qui pourrait se traduire par un affaiblissement de l'activité antimicrobienne des voies respiratoires (199). Il faut néanmoins noter que les échantillons biologiques et les doses d'exposition utilisés ne sont pas les mêmes que dans notre étude. Ces observations histologiques n'ayant cependant pas permis de mettre en évidence de manifestations cancéreuses, des recherches moléculaires ont été entreprises au niveau du transcriptome et du miRNome. Des ARNm différentiellement exprimés ont été trouvés dans les poumons de souris exposées de manière aiguë (16 up et 12 down-régulés) ou subchronique (81 up et 4 down-régulés). L'analyse fonctionnelle des gènes dérégulés a permis d'identifier les fonctions biologiques les plus impactées à la suite des expositions particulières aiguë et subchronique, comme étant celles du mouvement cellulaire, du trafic des cellules immunitaires (e.g, *CCL2*, *CCL9*, *CCL17*) et de la réponse inflammatoire (e.g, *SAA1*, *SAA2*, *DMBT1*, *IL-6*, *IL-12*), susceptibles d'induire ou d'exacerber une inflammation au niveau pulmonaire. La validation d'une partie de ces résultats par RT-qPCR a montré une très forte concordance, témoignant de la robustesse de nos données expérimentales obtenus au niveau génique. L'expression de ces gènes est néanmoins susceptible d'être régulée par des modifications épigénétiques et notamment par les miARN. Ces derniers sont reconnus pour jouer un rôle clé dans la régulation de phénomènes cellulaires essentiels tels que la survie, l'apoptose, la prolifération, l'homéostasie ou la différenciation cellulaire. Pour ces raisons, les perturbations importantes de l'expression des miARN tissulaires sont bien souvent associées à l'apparition d'un contexte pathologique. C'est pourquoi l'expression de ces derniers a été étudiée dans ce projet. Ainsi, des miARN différentiellement exprimés ont été trouvés dans les poumons de souris exposées de manière aiguë (2 up et 5 down-régulés) et subchronique (26 up et 1 down-régulés). L'étude de la littérature a permis d'identifier certains de ces miARN comme étant, eux

aussi, impliqués dans la régulation de la réponse inflammatoire. À titre d'exemple, le miR-29a, surexprimé à la suite d'une exposition aiguë, a été décrit comme améliorant lésions pulmonaires aiguës en réduisant la PANoptose des cellules épithéliales alvéolaires (200). De la même manière, certains miARN différentiellement exprimés à la suite de l'exposition subchronique, jouent un rôle dans la régulation de l'inflammation. Cela est particulièrement le cas du miR-223, bien connu pour avoir un impact sur différents processus cellulaires, tels que la régulation du cycle cellulaire, la différenciation hématopoïétique et la migration des cellules immunitaires (201). Au niveau pulmonaire, ce dernier aurait plutôt un rôle protecteur, en étant capable de réguler l'inflammasome NLRP3, ayant pour conséquences de réguler la différenciation macrophagique, de diminuer la libération d'IL-1 β et d'inhiber NF κ B dans les cellules épithéliales bronchiques (202–204). Seul le miR-23a a été identifié comme étant dérégulé à la suite d'une exposition aux PM_{2,5}, qu'elle soit aiguë ou subchronique. Ce dernier est d'ores et déjà connu pour jouer un rôle dans l'initiation et la progression tumorale dans de nombreux cancers (205). Au niveau pulmonaire, il serait impliqué dans la régulation de la TEM induite par le TGF- β en réduisant l'expression de la e-cadhérine des cellules cancéreuses pulmonaires (206). Les cellules tumorales surexprimant ce miARN seraient également plus résistantes aux traitements anticancéreux. À l'heure actuelle, seul un nombre restreint d'études a cherché à mettre en évidence l'impact de la pollution atmosphérique sur les profils d'expression des miARN, rendant difficile la comparaison de nos résultats à ceux de la littérature. Ainsi actuellement, une seule étude épidémiologique s'intéressant aux effets à long terme de l'exposition aux PM_{2,5} sur l'expression des miARN dans les vésicules extracellulaires sériques a montré une augmentation significative du niveau d'expression du miR-23a (207). De plus amples investigations s'avèrent donc être nécessaires, notamment concernant les interactions existantes entre les miARN et les ARNm. L'ensemble des paramètres biologiques mesurés chez les souris soumises aux protocoles d'exposition aiguë et subchronique a subséquentement permis de mettre en évidence une importante réponse inflammatoire caractérisée par l'induction de la voie de signalisation NF κ B et la sécrétion de diverses cytokines pro-inflammatoires, dont les résultats ont pu être confortés par les observations histologiques et les analyses transcriptomiques.

L'analyse de ces différents paramètres après cessation des expositions particulières a montré une persistance de cette inflammation, bien que celle-ci soit indéniablement atténuée. Néanmoins, l'étude des données transcriptomiques réalisée grâce à plusieurs outils bioinformatiques a permis de mettre en évidence l'apparition d'un phénomène de remodelage tissulaire apparaissant à la suite des expositions subchroniques et persistant après cessation des expositions, comme en témoigne la dérégulation de gènes impliqués dans le développement, la croissance et la prolifération cellulaires (e.g, *AGR2*, *FOSB*, *MMP12*). Ce mécanisme de pathogénicité est susceptible de favoriser l'invasion tumorale et la cancérogénèse, comme l'illustre la dérégulation de l'expression de certains gènes tels que *REG3G* et *TFF1/2*. Par ailleurs, l'étude du miRNome a permis de mettre en évidence la persistance de 7 miARN dérégulés (3 up et 4 down-régulés) après cessation des expositions. Cela est notamment le cas du miR-let-7e, identifié comme étant significativement sous-exprimé. Ce dernier a été décrit dans la littérature comme ayant un rôle protecteur vis-

à-vis de la progression tumorale dans le cancer pulmonaire non à petites cellules. En effet, une étude *in vivo* a démontré que sa surexpression entraînait une diminution de la viabilité, de la migration et de l'invasion cellulaires (208). Il a également été démontré qu'une perte d'expression de ce miARN était associée à une survie globale plus courte chez les patients atteints de ce cancer (209). Afin de conforter l'ensemble de ces résultats transcriptomiques, des analyses immunohistochimiques ont été entreprises. L'utilisation d'un marqueur de prolifération cellulaire, la protéine Ki-67, a ainsi permis de conforter les résultats obtenus puisque celui est significativement surexprimé, au niveau bronchique et surtout parenchymateux, chez les souris exposées aux PM_{2,5} de manière subchronique et, est même amplifié à la suite de la période de recouvrement de deux mois. Il s'agit d'une protéine nucléaire exprimée durant l'ensemble des phases du cycle cellulaire des cellules en prolifération, à l'exception de la phase de quiescence G₀, qui fut longtemps utilisée pour distinguer les cellules en croissance de celles qui ne le sont pas. En pratique, l'index de marquage par l'anticorps anti-Ki-67, qui correspond au pourcentage de cellules positives pour l'expression nucléaire de la protéine Ki-67, déterminé en immunohistochimie, est employé pour évaluer la prolifération tumorale dans de nombreux cancers. Ce dernier a par ailleurs un intérêt pronostique puisqu'il serait corrélé à des paramètres reflétant l'agressivité et la progression cancéreuse dans les tumeurs malignes (210). En outre, des études ont suggéré que son expression dans le cancer pulmonaire non à petites cellules était corrélée à un mauvais pronostic de survie et à une efficacité moindre à la chimiothérapie (211–213). L'ensemble de ces données suggèrent donc qu'à la suite du protocole d'exposition subchronique, un processus de remodelage tissulaire est initié au niveau pulmonaire, et que celui-ci subsiste même deux mois après l'arrêt des expositions.

Cette évolution d'un profil inflammatoire vers un profil de remodelage tissulaire et potentiellement de cancérogenèse persistant plusieurs semaines après l'arrêt des expositions particulières, constitue un axe de recherche prometteur et nécessiterait de plus amples investigations avec notamment l'étude des interactions existantes entre les miARN et les ARNm qui devrait permettre d'identifier les voies de signalisation dérégulées, potentiellement impliquées dans ces mécanismes biologiques délétères.

Conclusion et perspectives

Ce projet de recherche avait pour objectif d'étudier la pathogénicité pulmonaire des particules fines atmosphériques chez un modèle murin exposé de manière aiguë ou subchronique directement et/ou deux mois après arrêt des expositions. Les résultats obtenus à ce jour suggèrent que les PM_{2,5} prélevées dans la zone urbaine de Lille sont riches en composés hautement nocifs (e.g., métaux, HAP, dioxines), leur conférant un important potentiel oxydant intrinsèque qui mène au développement d'un stress oxydant pulmonaire. Afin de lutter contre ce dernier et rétablir l'homéostasie redox, l'organisme active des défenses antioxydantes, de nature enzymatique ou non, qui se retrouvent rapidement dépassées, ayant pour conséquence l'apparition dose et temps dépendants de multiples lésions oxydatives, l'initiation de processus inflammatoires et l'induction d'altérations transcriptomiques. À la suite d'une exposition aiguë et surtout d'une exposition subchronique, ces dernières pourraient contribuer de façon spectaculaire au développement et/ou à l'exacerbation de l'inflammation pulmonaire et, par la suite, à la prolifération cellulaire, au remodelage tissulaire et potentiellement au cancer, même 2 mois après l'arrêt des expositions. Le caractère novateur de ce projet a précisément porté sur l'utilisation d'une période de recouvrement qui a montré la persistance des effets toxiques observés jusqu'à deux mois après la dernière exposition, suggérant la rétention des particules au sein de l'arbre respiratoire. Ces nouvelles données amènent à s'interroger sur l'impact sanitaire de la vie en milieu urbain et sur la nécessité d'adapter la réglementation actuellement en vigueur afin de limiter les conséquences néfastes sur les populations fortement exposées aux particules.

Afin de compléter ces résultats prometteurs, il sera nécessaire d'approfondir l'étude des mécanismes d'action toxique des PM_{2,5}, notamment à la suite de la période de recouvrement. Pour cela, une analyse des interactions miARN/ARNm pourra être initiée dans le but d'identifier des voies de signalisation dérégulées, potentiellement impliquées dans des mécanismes biologiques délétères. Puis, certaines modifications transcriptomiques d'intérêt devront être validées au niveau protéique par Western Blot ou technique ELISA. D'autres mécanismes de toxicité pourront être également étudiés tels que la génotoxicité, les altérations mitochondriales ou les modifications épigénétiques autres que les miARN (e.g., modifications des histones, méthylation de l'ADN). Enfin, l'étude des miARN circulants, susceptibles d'être utilisés en tant que biomarqueurs d'exposition et/ou d'effets des PM_{2,5}, pourrait constituer un axe de recherche prometteur. Par ailleurs, l'étude *in vivo* des mécanismes d'action toxique des PM_{0,1}, qui constituent la fraction la plus toxique et la plus importante en nombre au sein des PM_{2,5}, fera l'objet de mon doctorat de sciences, en optant cette fois pour une approche multi-organes susceptible de révéler des effets délétères sur d'autres organes cibles que les poumons.

Bibliographie

1. Lelieveld J, Klingmüller K, Pozzer A, Pöschl U, Fnais M, Daiber A, et al. Cardiovascular disease burden from ambient air pollution in Europe reassessed using novel hazard ratio functions. *Eur Heart J*. 21 mai 2019;40(20):1590-6.
2. Air quality in Europe 2021 — European Environment Agency. Disponible sur: <https://www.eea.europa.eu/publications/air-quality-in-europe-2021>
3. Pollution de l'air ambiant : nouvelles estimations de son impact sur la santé des Français. Disponible sur: <https://www.santepubliquefrance.fr/presse/2021/pollution-de-l-air-ambiant-nouvelles-estimations-de-son-impact-sur-la-sante-des-francais>
4. Gakidou E, Afshin A, Abajobir AA, Abate KH, Abbafati C, Abbas KM, et al. Global, regional, and national comparative risk assessment of 84 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *The Lancet*. sept 2017;390(10100):1345-422.
5. Health Effects Institute. 2019. State of Global Air 2019. Special Report. Boston, MA:Health Effects Institute.
6. Preunkert S, McConnell JR, Hoffmann H, Legrand M, Wilson AI, Eckhardt S, et al. Lead and Antimony in Basal Ice From Col du Dome (French Alps) Dated With Radiocarbon: A Record of Pollution During Antiquity. *Geophys Res Lett*. 2019;46(9):4953-61.
7. Atmospheric Chemistry and Physics: From Air Pollution to Climate Change, 3rd Edition | Wiley. Wiley.com. Disponible sur: <https://www.wiley.com/en-us/Atmospheric+Chemistry+and+Physics%3A+From+Air+Pollution+to+Climate+Change%2C+3rd+Edition-p-9781118947401>
8. Rapport de projet Particules spéciation chimique et particules ultrafines-1.pdf. Disponible sur: <http://www.atmo-grandest.eu/sites/prod/files/2022-01/Rapport%20de%20projet%20Particules%20%20speciation%20chimique%20et%20particules%20ultrafines-1.pdf>
9. Lepers C. Pollution atmosphérique de proximité et toxicité respiratoire: recherche in vitro des mécanismes d'action toxique induits par des aérosols atmosphériques particuliers (PM_{2.5}) industriels, urbains et ruraux. :311.
10. Les particules de combustion automobile et leurs dispositifs d'élimination. Disponible sur: https://www.ademe.fr/sites/default/files/assets/documents/35160_particules.pdf
11. Rodríguez S, Querol X, Alastuey A, Kallos G, Kakaliagou O. Saharan dust contributions to PM₁₀ and TSP levels in Southern and Eastern Spain. *Atmos Environ*. mai 2001;35(14):2433-47.
12. Zauli Sajani S, Miglio R, Bonasoni P, Cristofanelli P, Marinoni A, Sartini C, et al. Saharan dust and daily mortality in Emilia-Romagna (Italy). *Occup Environ Med*. juin 2011;68(6):446-51.
13. Perez L, Tobias A, Querol X, Künzli N, Pey J, Alastuey A, et al. Coarse particles from Saharan dust and daily mortality. *Epidemiol Camb Mass*. nov 2008;19(6):800-7.
14. Nastos PT, Kampanis NA, Giaouzaki KN, Matzarakis A. Environmental impacts on human health during a Saharan dust episode at Crete Island, Greece. *Meteorol Z*. 1 oct 2011;20(5):517-29.
15. Chimie de l'environnement. De Boeck Supérieur. 2022. Disponible sur: <https://www.deboecksuperieur.com/ouvrage/9782804192174-chimie-de-l-environnement>

16. Citepa_Rapport-Secten-2022_Rapport-complet_v1.8.pdf. Disponible sur: https://www.citepa.org/wp-content/uploads/Citepa_Rapport-Secten-2022_Rapport-complet_v1.8.pdf
17. Inventaire des émissions de polluants atmosphériques en France au titre de la convention sur la pollution atmosphérique transfrontalière à longue distance et de la directive européenne concernant la réduction des émissions nationales de certains polluants atmosphériques.
18. 2.7.2-FicheMERA_SpeciatiionPM25_202006.pdf. Disponible sur: https://www.lcsqa.org/system/files/media/documents/2.7.2/FicheMERA_SpeciatiionPM25_202006.pdf
19. Putaud JP, Raes F, Van Dingenen R, Brüggemann E, Facchini MC, Decesari S, et al. A European aerosol phenomenology—2: chemical characteristics of particulate matter at kerbside, urban, rural and background sites in Europe. *Atmos Environ.* 1 mai 2004;38(16):2579-95.
20. Contini D, Vecchi R, Viana M. Carbonaceous Aerosols in the Atmosphere. *Atmosphere.* mai 2018;9(5):181.
21. Mo Z, Wang Z, Mao G, Pan X, Wu L, Xu P, et al. Characterization and health risk assessment of PM2.5-bound polycyclic aromatic hydrocarbons in 5 urban cities of Zhejiang Province, China. *Sci Rep.* déc 2019;9(1):7296.
22. Zhang Y, Zhu X, Slanina S, Shao M, Zeng L, Hu M, et al. Aerosol pollution in some Chinese cities (IUPAC Technical Report). *Pure Appl Chem.* 1 janv 2004;76(6):1227-39.
23. Mikrut M, Regiel-Futyra A, Samek L, Macyk W, Stochel G, van Eldik R. Generation of hydroxyl radicals and singlet oxygen by particulate matter and its inorganic components. *Environ Pollut.* 1 juill 2018;238:638-46.
24. Donaldson K, Brown DM, Mitchell C, Dineva M, Beswick PH, Gilmour P, et al. Free radical activity of PM10: iron-mediated generation of hydroxyl radicals. *Environ Health Perspect.* sept 1997;105(Suppl 5):1285-9.
25. Shi T, Duffin R, Borm PJA, Li H, Weishaupt C, Schins RPF. Hydroxyl-radical-dependent DNA damage by ambient particulate matter from contrasting sampling locations. *Environ Res.* mai 2006;101(1):18-24.
26. Falcon-Rodriguez CI, Osornio-Vargas AR, Sada-Ovalle I, Segura-Medina P. Aeroparticles, Composition, and Lung Diseases. *Front Immunol [Internet].* 20 janv 2016;7. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4719080/>
27. Valko M, Jomova K, Rhodes CJ, Kuča K, Musílek K. Redox- and non-redox-metal-induced formation of free radicals and their role in human disease. *Arch Toxicol.* 1 janv 2016;90(1):1-37.
28. He M, Ichinose T, Yoshida S, Nishikawa M, Sun G, Shibamoto T. Role of iron and oxidative stress in the exacerbation of allergic inflammation in murine lungs caused by urban particulate matter <2.5 µm and desert dust. *J Appl Toxicol.* 2019;39(6):855-67.
29. Knaapen et al. Soluble metals as well as the insoluble particle fraction are involved in cellular DNA damage induced by particulate matter. *Mol Cell Biochem.* 2002;234-235:317-26.
30. Lippmann M, Chen LC, Gordon T, Ito K, Thurston GD. National Particle Component Toxicity (NPACT) Initiative: integrated epidemiologic and toxicologic studies of the health effects of particulate matter components. *Res Rep Health Eff Inst.* oct 2013;(177):5-13.

31. Bell ML, HEI Health Review Committee. Assessment of the health impacts of particulate matter characteristics. *Res Rep Health Eff Inst.* janv 2012;(161):5-38.
32. Zhou J, Ito K, Lall R, Lippmann M, Thurston G. Time-series analysis of mortality effects of fine particulate matter components in Detroit and Seattle. *Environ Health Perspect.* avr 2011;119(4):461-6.
33. Cakmak S, Dales R, Kauri LM, Mahmud M, Van Ryswyk K, Vanos J, et al. Metal composition of fine particulate air pollution and acute changes in cardiorespiratory physiology. *Environ Pollut Barking Essex* 1987. juin 2014;189:208-14.
34. PM2.5 chemical composition at a rural background site in Central Europe, including correlation and air mass back trajectory analysis.htm.
35. Švédová B, Kucbel M, Raclavská H, Růžicková J, Raclavský K, Sassmanová V. Water-soluble ions in dust particles depending on meteorological conditions in urban environment. *J Environ Manage.* mai 2019;237:322-31.
36. Sillanpää M, Hillamo R, Saarikoski S, Frey A, Pennanen A, Makkonen U, et al. Chemical composition and mass closure of particulate matter at six urban sites in Europe. *Atmos Environ.* 2006;40:212-23.
37. Zhang Y, Yang L, Bie S, Zhao T, Huang Q, Li J, et al. Chemical compositions and the impact of sea salt in atmospheric PM1 and PM2.5 in the coastal area. *Atmospheric Res.* mars 2021;250:105323.
38. Alharbi B, Shareef MM, Husain T. Study of chemical characteristics of particulate matter concentrations in Riyadh, Saudi Arabia. *Atmospheric Pollut Res.* janv 2015;6(1):88-98.
39. Paulauskas R, Striūgas N, Sadeckas M, Sommersacher P, Retschitzegger S, Kienzl N. Online determination of potassium and sodium release behaviour during single particle biomass combustion by FES and ICP-MS. *Sci Total Environ.* déc 2020;746:141162.
40. Glikson M, Rutherford S, Simpson RW, Mitchell CA, Yago A. Microscopic and submicron components of atmospheric particulate matter during high asthma periods in Brisbane, Queensland, Australia. *Atmos Environ.* mars 1995;29(4):549-62.
41. Lembo R, Landoni G, Cianfanelli L, Frontera A. Air pollutants and sars-cov-2 in 33 European countries. *Acta Bio Medica Atenei Parm.* 2021;92(1):e2021166.
42. OECD. Panorama de la santé 2017 Les indicateurs de l'OCDE: Les indicateurs de l'OCDE. OECD Publishing; 2017. 226 p.
43. OCDE. Environment at a Glance Indicators. 2022. Disponible sur: <https://www.oecd-ilibrary.org/content/publication/ac4b8b89-en>
44. Crystal RG, Randell SH, Engelhardt JF, Voynow J, Sunday ME. Airway Epithelial Cells. *Proc Am Thorac Soc.* 15 sept 2008;5(7):772-7.
45. Voynow JA, Rubin BK. Mucins, Mucus, and Sputum. *Chest.* 1 févr 2009;135(2):505-12.
46. Adam D, Perotin JM, Lebargy F, Birembaut P, Deslée G, Coraux C. Régénération de l'épithélium des voies aériennes. *Rev Mal Respir.* avr 2014;31(4):300-11.
47. Li P, Xin J, Wang Y, Wang S, Li G, Pan X, et al. The acute effects of fine particles on respiratory mortality and morbidity in Beijing, 2004-2009. *Environ Sci Pollut Res Int.* sept 2013;20(9):6433-44.
48. Nanomatériaux. Effets sur la santé - Risques - INRS. Disponible sur: <https://www.inrs.fr/risques/nanomateriaux/effets-sante.html>
49. Benoît HB. Les nanoparticules. EDP Sciences; 2012. 704 p.

50. Milkovic L, Cipak Gasparovic A, Cindric M, Mouthuy PA, Zarkovic N. Short Overview of ROS as Cell Function Regulators and Their Implications in Therapy Concepts. *Cells*. 30 juill 2019;8(8):793.
51. Garçon G, Dagher Z, Zerimech F, Ledoux F, Courcot D, Aboukais A, et al. Dunkerque City air pollution particulate matter-induced cytotoxicity, oxidative stress and inflammation in human epithelial lung cells (L132) in culture. *Toxicol In Vitro*. 1 juin 2006;20(4):519-28.
52. Dahl JU, Gray MJ, Jakob U. Protein Quality Control under Oxidative Stress Conditions. *J Mol Biol*. 10 avr 2015;427(7):1549-63.
53. Boutten A, Goven D, Artaud-Macari É, Bonay M. La voie Nrf2 en pathologie respiratoire. *MS Médecine Sci* ISSN Pap 0767-0974 ISSN Numér 1958-5381 2011 Vol 27 N° 11 P 966-972. 2011; Disponible sur: <http://www.ipubli.inserm.fr/handle/10608/7659>
54. Migdal C, Serres M. Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant. *médecine/sciences*. 1 avr 2011;27(4):405-12.
55. (2) (PDF) Dietary polyphénols : extraction, antioxidant activity and metal ion interaction. Disponible sur: https://www.researchgate.net/publication/278645043_Dietary_polyphenols_extraction_antioxidant_activity_and_metal_ion_interaction
56. Pardo M, Shafer MM, Rudich A, Schauer JJ, Rudich Y. Single Exposure to near Roadway Particulate Matter Leads to Confined Inflammatory and Defense Responses: Possible Role of Metals. *Environ Sci Technol*. 21 juill 2015;49(14):8777-85.
57. Shuster-Meiseles T, Shafer MM, Heo J, Pardo M, Antkiewicz DS, Schauer JJ, et al. ROS-generating/ARE-activating capacity of metals in roadway particulate matter deposited in urban environment. *Environ Res*. avr 2016;146:252-62.
58. Liu K, Hua S, Song L. PM2.5 Exposure and Asthma Development: The Key Role of Oxidative Stress. *Oxid Med Cell Longev*. 4 avr 2022;2022:3618806.
59. Deng X, Zhang F, Rui W, Long F, Wang L, Feng Z, et al. PM2.5-induced oxidative stress triggers autophagy in human lung epithelial A549 cells. *Toxicol In Vitro*. 1 sept 2013;27(6):1762-70.
60. Li R, Zhou R, Zhang J. Function of PM2.5 in the pathogenesis of lung cancer and chronic airway inflammatory diseases. *Oncol Lett*. mai 2018;15(5):7506-14.
61. Delfino RJ, Staimer N, Tjoa T, Gillen DL, Schauer JJ, Shafer MM. Airway inflammation and oxidative potential of air pollutant particles in a pediatric asthma panel. *J Expo Sci Environ Epidemiol*. oct 2013;23(5):466.
62. Ahmed SMU, Luo L, Namani A, Wang XJ, Tang X. Nrf2 signaling pathway: Pivotal roles in inflammation. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Basis Dis*. févr 2017;1863(2):585-97.
63. Buendia I, Michalska P, Navarro E, Gameiro I, Egea J, León R. Nrf2–ARE pathway: An emerging target against oxidative stress and neuroinflammation in neurodegenerative diseases. *Pharmacol Ther*. janv 2016;157:84-104.
64. Kensler TW, Wakabayashi N, Biswal S. Cell Survival Responses to Environmental Stresses Via the Keap1-Nrf2-ARE Pathway. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1 févr 2007;47(1):89-116.
65. Bayo Jimenez MT, Frenis K, Hahad O, Steven S, Cohen G, Cuadrado A, et al. Protective actions of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (NRF2) and downstream pathways against environmental stressors. *Free Radic Biol Med*. juill 2022;187:72-91.

66. Sun KA, Li Y, Meliton AY, Woods PS, Kimmig LM, Cetin-Atalay R, et al. Endogenous itaconate is not required for particulate matter-induced NRF2 expression or inflammatory response. *eLife*. 7 avr 2020;9:e54877.
67. Jin L, Ni J, Tao Y, Weng X, Zhu Y, Yan J, et al. N-acetylcysteine attenuates PM2.5-induced apoptosis by ROS-mediated Nrf2 pathway in human embryonic stem cells. *Sci Total Environ*. mai 2019;666:713-20.
68. Li N, Alam J, Venkatesan MI, Eiguren-Fernandez A, Schmitz D, Stefano ED, et al. Nrf2 Is a Key Transcription Factor That Regulates Antioxidant Defense in Macrophages and Epithelial Cells: Protecting against the Proinflammatory and Oxidizing Effects of Diesel Exhaust Chemicals. *J Immunol*. 1 sept 2004;173(5):3467-81.
69. Deng X, Rui W, Zhang F, Ding W. PM2.5 induces Nrf2-mediated defense mechanisms against oxidative stress by activating PIK3/AKT signaling pathway in human lung alveolar epithelial A549 cells. *Cell Biol Toxicol*. 1 juin 2013;29(3):143-57.
70. Zhao QJ, Liu XJ, Zeng XL, Bao HR. [Effect of PM2.5 on the level of nuclear factor erythroid-2 related factor 2 in chronic obstructive pulmonary disease mice and its relationship with oxidative stress]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 26 juill 2016;96(28):2241-5.
71. Forman HJ, Zhang H, Rinna A. Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Mol Aspects Med*. avr 2009;30(1-2):1-12.
72. Biswas SK, Rahman I. Environmental toxicity, redox signaling and lung inflammation: the role of glutathione. *Mol Aspects Med*. avr 2009;30(1-2):60-76.
73. Ballatori N, Krance SM, Notenboom S, Shi S, Tieu K, Hammond CL. Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases. *Biol Chem*. mars 2009;390(3):191-214.
74. Baeza A, Marano F. Pollution atmosphérique et maladies respiratoires - Un rôle central pour le stress oxydant. *médecine/sciences*. 1 mai 2007;23(5):497-501.
75. Xiao GG, Wang M, Li N, Loo JA, Nel AE. Use of Proteomics to Demonstrate a Hierarchical Oxidative Stress Response to Diesel Exhaust Particle Chemicals in a Macrophage Cell Line. *J Biol Chem*. déc 2003;278(50):50781-90.
76. Aghasafari P, George U, Pidaparti R. A review of inflammatory mechanism in airway diseases. *Inflamm Res*. 1 janv 2019;68(1):59-74.
77. Chen S, Yin R, Mutze K, Yu Y, Takenaka S, Königshoff M, et al. No involvement of alveolar macrophages in the initiation of carbon nanoparticle induced acute lung inflammation in mice. *Part Fibre Toxicol*. 21 juin 2016;13(1):33.
78. Li R, Kou X, Xie L, Cheng F, Geng H. Effects of ambient PM2.5 on pathological injury, inflammation, oxidative stress, metabolic enzyme activity, and expression of c-fos and c-jun in lungs of rats. *Environ Sci Pollut Res*. déc 2015;22(24):20167-76.
79. Riva DR, Magalhães CB, Lopes AA, Lanças T, Mauad T, Malm O, et al. Low dose of fine particulate matter (PM2.5) can induce acute oxidative stress, inflammation and pulmonary impairment in healthy mice. *Inhal Toxicol*. avr 2011;23(5):257-67.
80. Shukla A, Timblin C, BeruBe K, Gordon T, McKinney W, Driscoll K, et al. Inhaled Particulate Matter Causes Expression of Nuclear Factor (NF)- κ B-Related Genes and Oxidant-Dependent NF- κ B Activation In Vitro. *Am J Respir Cell Mol Biol*. août 2000;23(2):182-7.
81. van EEDEN SF, Tan WC, Suwa T, Mukae H, Terashima T, Fujii T, et al. Cytokines Involved in the Systemic Inflammatory Response Induced by Exposure to Particulate Matter Air Pollutants (PM10). *Am J Respir Crit Care Med*. sept 2001;164(5):826-30.

82. Quay JL, Reed W, Samet J, Devlin RB. Air Pollution Particles Induce IL-6 Gene Expression in Human Airway Epithelial Cells via NF- κ B Activation. *Am J Respir Cell Mol Biol*. juill 1998;19(1):98-106.
83. Wu JZ, Ge DD, Zhou LF, Hou LY, Zhou Y, Li QY. Effects of particulate matter on allergic respiratory diseases. *Chronic Dis Transl Med*. 1 juin 2018;4(2):95-102.
84. Mogensen TH. Pathogen Recognition and Inflammatory Signaling in Innate Immune Defenses. *Clin Microbiol Rev*. avr 2009;22(2):240-73.
85. *Histologie_de_l_appareil_respiratoire-_Voies_aeriennes_profondes.pdf*. Disponible sur: https://sofia.medicalistes.fr/spip/IMG/pdf/Histologie_de_l_appareil_respiratoire-_Voies_aeriennes_profondes.pdf
86. Vareille M, Kieninger E, Edwards MR, Regamey N. The airway epithelium: soldier in the fight against respiratory viruses. *Clin Microbiol Rev*. janv 2011;24(1):210-29.
87. Hiemstra PS, McCray PB, Bals R. The innate immune function of airway epithelial cells in inflammatory lung disease. *Eur Respir J*. avr 2015;45(4):1150-62.
88. Whitsett JA, Alenghat T. Respiratory epithelial cells orchestrate pulmonary innate immunity. *Nat Immunol*. 18 déc 2014;16(1):27-35.
89. Jouan Y, Si-Tahar M, Guillon A. Immunité de la muqueuse respiratoire : physiologie et implications en réanimation. *Médecine Intensive Réanimation*. 17 nov 2016; Disponible sur: <http://link.springer.com/10.1007/s13546-016-1245-9>
90. Nemmar A, Hoet PHM, Vanquickenborne B, Dinsdale D, Thomeer M, Hoylaerts MF, et al. Passage of inhaled particles into the blood circulation in humans. *Circulation*. 29 janv 2002;105(4):411-4.
91. León-Mejía G, Machado MN, Okuro RT, Silva LFO, Telles C, Dias J, et al. Intratracheal instillation of coal and coal fly ash particles in mice induces DNA damage and translocation of metals to extrapulmonary tissues. *Sci Total Environ*. 1 juin 2018;625:589-99.
92. Ostro B, Malig B, Broadwin R, Basu R, Gold EB, Bromberger JT, et al. Chronic PM2.5 Exposure and Inflammation: Determining Sensitive Subgroups in Mid-life Women. *Environ Res*. juill 2014;132:168-75.
93. Brook RD, Rajagopalan S, Pope CA, Brook JR, Bhatnagar A, Diez-Roux AV, et al. Particulate Matter Air Pollution and Cardiovascular Disease. *Circulation*. juin 2010;121(21):2331-78.
94. Benayoun L, Pretolani M. Le remodelage bronchique dans l'asthme : mécanismes et enjeux thérapeutiques. *médecine/sciences*. mars 2003;19(3):319-26.
95. Godinas L, Duquenne S, Louis R. Comparaison du remodelage tissulaire dans l'asthme et la BPCO. *Rev Med Liege*. :5.
96. Gras D, Bourdin A, Chanez P, Vachier I. Remodelage bronchique dans l'asthme - Conséquences cliniques et fonctionnelles respiratoires. *médecine/sciences*. 1 nov 2011;27(11):959-65.
97. Puisieux A, Caramel J. La transition épithélio-mésenchymateuse, un processus d'adaptation des cellules cancéreuses. 2013;7.
98. Rôle de la transition épithélio-mésenchymateuse au cours de la progression tumorale – Académie nationale de médecine | Une institution dans son temps. Disponible sur: <https://www.academie-medecine.fr/role-de-la-transition-epithelio-mesenchymateuse-au-cours-de-la-progression-tumorale/>

99. Lu W, Kang Y. Epithelial-mesenchymal plasticity in cancer progression and metastasis. *Dev Cell.* 6 mai 2019;49(3):361-74.
100. Nawrocki-Raby B, Polette M, Tournier JM, Birembaut P. Rôle des métalloprotéinases matricielles dans le remodelage de la matrice extracellulaire au cours des phénomènes de migration cellulaire de l'épithélium bronchique. 2001;(4):5.
101. Xu Z, Ding W, Deng X. PM2.5, Fine Particulate Matter: A Novel Player in the Epithelial-Mesenchymal Transition? *Front Physiol.* 2019;10. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphys.2019.01404>
102. Tang W, Du L, Sun W, Yu Z, He F, Chen J, et al. Maternal exposure to fine particulate air pollution induces epithelial-to-mesenchymal transition resulting in postnatal pulmonary dysfunction mediated by transforming growth factor- β /Smad3 signaling. *Toxicol Lett.* 5 févr 2017;267:11-20.
103. Gu LZ, Sun H, Chen JH. Histone deacetylases 3 deletion restrains PM2.5-induced mice lung injury by regulating NF- κ B and TGF- β /Smad2/3 signaling pathways. *Biomed Pharmacother.* 1 janv 2017;85:756-62.
104. Melchior M, Poisbeau P. Conséquences des perturbations périnatales sur les réponses douloureuses. *Douleurs Eval - Diagn - Trait.* 7 avr 2015;16.
105. Dunoyer P. La bataille du silence - Mécanisme et inhibition du RNA silencing au cours des interactions plante/virus. *médecine/sciences.* 1 mai 2009;25(5):505-12.
106. Baulande S, Criqui A, Duthieuw M. Les microARN circulants, une nouvelle classe de biomarqueurs pour la médecine. *médecine/sciences.* 1 mars 2014;30(3):289-96.
107. Van der Hauwaert C, Savary G, Hennino MF, Pottier N, Glowacki F, Cauffiez C. Implication des microARN dans la fibrose rénale. *Néphrologie Thérapeutique.* 1 nov 2015;11(6):474-82.
108. Izzotti A, Pulliero A. The effects of environmental chemical carcinogens on the microRNA machinery. *Int J Hyg Environ Health.* juill 2014;217(6):601-27.
109. Li M, Huo X, Davuljigari CB, Dai Q, Xu X. MicroRNAs and their role in environmental chemical carcinogenesis. *Environ Geochem Health.* févr 2019;41(1):225-47.
110. Pogribny IP, Beland FA, Rusyn I. The role of microRNAs in the development and progression of chemical-associated cancers. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1 déc 2016;312:3-10.
111. Cheng M, Wang B, Yang M, Ma J, Ye Z, Xie L, et al. microRNAs expression in relation to particulate matter exposure: A systematic review. *Environ Pollut Barking Essex* 1987. mai 2020;260:113961.
112. Sima M, Rossnerova A, Simova Z, Rossner P. The Impact of Air Pollution Exposure on the MicroRNA Machinery and Lung Cancer Development. *J Pers Med.* janv 2021;11(1):60.
113. Pierce Chromogenic Endotoxin Quant Kit. Disponible sur: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0017902_ChromogenicEndotoxinQuantKit_UG.pdf
114. Crobeddu B, Aragao-Santiago L, Bui LC, Boland S, Baeza Squiban A. Oxidative potential of particulate matter 2.5 as predictive indicator of cellular stress. *Environ Pollut.* 1 nov 2017;230:125-33.
115. Promega, GSH/GSSG-GloTM Assay, Instructions for use of Products, V6611 and V6612.
116. Janssen N, Strak M, Yang A, Hellack B, Kelly F, Kuhlbusch TAJ, et al. Associations between three specific a-cellular measures of the oxidative potential of particulate matter

and markers of acute airway and nasal inflammation in healthy volunteers. *Occup Environ Med.* 7 août 2014;

117. TransAM NRF2 ELISA kit. Active Motif. Disponible sur : <https://www.activemotif.com/documents/1600.pdf>
118. AllPrep DNA/RNA/miRNA Universal Kit, Quick-Start Protocol. Quiagen. Disponible sur : <https://www.qiagen.com/dk/products/discovery-and-translational-research/dna-rna-purification/multianalyte-and-virus/allprep-dnarnamirna-universal-kit>
119. Catalase Assay Kit, Sigma-Aldrich. Disponible sur : <https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/documents/508/342/mak381bul-mk.pdf>
120. Superoxide Dismutase Activity Assay Kit. Abcam. Disponible sur : [https://www.abcam.com/ps/products/65/ab65354/documents/ab65354%20Superoxide%20Dismutase%20Activity%20assay%20v9b%20\(website\).pdf](https://www.abcam.com/ps/products/65/ab65354/documents/ab65354%20Superoxide%20Dismutase%20Activity%20assay%20v9b%20(website).pdf)
121. Glutathione Peroxidase Cellular Activity Assay Kit. Sigma Aldrich. Disponible sur : <https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/documents/201/822/cgp1bul-mk.pdf>
122. Glutathione Reductase Assay Kit. Sigma Aldrich. Disponible sur : <https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/documents/164/274/grsabul.pdf>
123. OxiSelect™ Oxidative DNA Damage ELISA Kit (8-OHdG Quantitation). Cell Biolabs, INC. Disponible : <https://www.cellbiolabs.com/sites/default/files/STA-320-8ohdg-elisa-kit.pdf>
124. ELISA OxiSelect™ 8-iso- Prostaglandin F2 α . Cell Biolabs, INC. Disponible sur : <https://www.cellbiolabs.com/sites/default/files/STA-337-isoprostane-assay-kit.pdf>
125. OxiSelect™ Protein Carbonyl ELISA Kit. Cell Biolabs, INC. Disponible sur : <https://www.cellbiolabs.com/sites/default/files/STA-310-protein-carbonyl-elisa-kit.pdf>
126. TransAM™ Flexi NF κ B Family Transcription Factor Assay Kit. Active Motif. Disponible sur: <https://www.activemotif.com/documents/112.pdf>
127. Magnetic Luminex® Assay - Mouse Premixed Multi-Analyte Kit. RnDSystems. Disponible sur : <https://resources.rndsystems.com/pdfs/datasheets/lxsamsm.pdf>
128. Chen B, You L, Wang Y, Stoner GD, You M. Allele-specific activation and expression of the K-ras gene in hybrid mouse lung tumors induced by chemical carcinogens. *Carcinogenesis.* 1 sept 1994;15(9):2031-5.
129. Allen JL, Liu X, Weston D, Prince L, Oberdörster G, Finkelstein JN, et al. Developmental Exposure to Concentrated Ambient Ultrafine Particulate Matter Air Pollution in Mice Results in Persistent and Sex-Dependent Behavioral Neurotoxicity and Glial Activation. *Toxicol Sci.* 1 juill 2014;140(1):160-78.
130. Edwards S, Zhao G, Tran J, Patten KT, Valenzuela A, Wallis C, et al. Pathological Cardiopulmonary Evaluation of Rats Chronically Exposed to Traffic-Related Air Pollution. *Environ Health Perspect.* déc 2020;128(12):127003.
131. Bertin M, Chevrier C, Serrano T, Monfort C, Cordier S, Viel JF. Sex-specific differences in fetal growth in newborns exposed prenatally to traffic-related air pollution in the PELAGIE mother-child cohort (Brittany, France). *Environ Res.* oct 2015;142:680-7.
132. Indice de la qualité de l'air | Atmo Hauts-de-France. Disponible sur: <https://www.atmo-hdf.fr/article/indice-de-la-qualite-de-lair>

133. Saleh Y, Antherieu S, Dusautoir R, Y. Alleman L, Sotty J, De Sousa C, et al. Exposure to Atmospheric Ultrafine Particles Induces Severe Lung Inflammatory Response and Tissue Remodeling in Mice. *Int J Environ Res Public Health* [Internet]. avr 2019;16(7). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6479904/>
134. Bilan Territorial de la Métropole Européenne de Lille. Amo Hauts de France. 2020. Disponible sur : <https://cartotheque-atmo-hdf.hub.arcgis.com/apps/bae7fb60f8f746a08e1b98b8c9a1a6df/explore>
135. Effets sanitaires liés à la pollution générée par les feux de végétation à l'air libre. ANSES. Mai 2012. Disponible sur: <https://www.anses.fr/fr/system/files/AIR2010sa0183Ra.pdf>
136. Liu L, Ma X, Wen W, Sun C, Jiao J. Characteristics and potential sources of wintertime air pollution in Linfen, China. *Environ Monit Assess.* 8 avr 2021;193(5):252.
137. Liu L, Liu Y, Wen W, Liang L, Ma X, Jiao J, et al. Source Identification of Trace Elements in PM_{2.5} at a Rural Site in the North China Plain. *Atmosphere.* févr 2020;11(2):179.
138. Gardner DK. *Environmental Pollution in China: What Everyone Needs to Know.* Oxford University Press; 2018. 305 p.
139. An Z, Huang RJ, Zhang R, Tie X, Li G, Cao J, et al. Severe haze in northern China: A synergy of anthropogenic emissions and atmospheric processes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 30 avr 2019;116(18):8657-66.
140. Southam DS, Dolovich M, O'Byrne PM, Inman MD. Distribution of intranasal instillations in mice: effects of volume, time, body position, and anesthesia. *Am J Physiol-Lung Cell Mol Physiol.* avr 2002;282(4):L833-9.
141. A quantitative comparison of intranasal and intratracheal administration of coarse PM in the mouse. *Integr Pharmacol Toxicol Genotoxicol.* 2015;1(1). Disponible sur: <http://oatext.com/A-quantitative-comparison-of-intranasal-and-intratracheal-administration-of-coarse-PM-in-the-mouse.php>
142. Xu M, Wang X, Xu L, Zhang H, Li C, Liu Q, et al. Chronic lung inflammation and pulmonary fibrosis after multiple intranasal instillation of PM_{2.5} in mice. *Environ Toxicol.* juill 2021;36(7):1434-46.
143. Nrf2 deficiency exacerbates PM 2.5-induced olfactory bulb injury - PubMed. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/ressources-electroniques.univ-lille.fr/30318116/>
144. Li J, Zhang Y, Zhang L, An Z, Song J, Wang C, et al. Fine particulate matter exposure exacerbated nasal mucosal damage in allergic rhinitis mice via NLRP3 mediated pyroptosis. *Ecotoxicol Environ Saf.* 16 nov 2021;228:112998.
145. Shang Y, Sun Q. Particulate air pollution: major research methods and applications in animal models. *Environ Dis.* 2018;3(3):57-62.
146. Dergham M, Lepers C, Verdin A, Cazier F, Billet S, Courcot D, et al. Temporal-spatial variations of the physicochemical characteristics of air pollution Particulate Matter (PM_{2.5-0.3}) and toxicological effects in human bronchial epithelial cells (BEAS-2B). *Environ Res.* 28 févr 2015;137.
147. Mbengue S, Alleman LY, Flament P. Size-distributed metallic elements in submicronic and ultrafine atmospheric particles from urban and industrial areas in northern France. *Atmospheric Res.* 1 janv 2014;135-136:35-47.

148. Amil N, Latif MT, Khan MF, Mohamad M. Seasonal variability of PM_{2.5}; composition and sources in the Klang Valley urban-industrial environment. *Atmospheric Chem Phys*. 29 avr 2016;16(8):5357-81.
149. Kelly FJ, Fussell JC. Size, source and chemical composition as determinants of toxicity attributable to ambient particulate matter. *Atmos Environ*. 1 déc 2012;60:504-26.
150. Valavanidis A, Fiotakis K, Vlachogianni T. Airborne particulate matter and human health: toxicological assessment and importance of size and composition of particles for oxidative damage and carcinogenic mechanisms. *J Environ Sci Health Part C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev*. déc 2008;26(4):339-62.
151. Bates JT, Fang T, Verma V, Zeng L, Weber RJ, Tolbert PE, et al. Review of Acellular Assays of Ambient Particulate Matter Oxidative Potential: Methods and Relationships with Composition, Sources, and Health Effects. *Environ Sci Technol*. 16 2019;53(8):4003-19.
152. Conte E, Canepari S, Frasca D, Simonetti G. Oxidative Potential of Selected PM Components. In: *Proceedings of the 2nd International Electronic Conference on Atmospheric Sciences*. MDPI; 2017. p. 108. Disponible sur: <https://www.mdpi.com/2504-3900/1/5/108>
153. Fang T, Verma V, Bates JT, Abrams J, Klein M, Strickland MJ, et al. Oxidative potential of ambient water-soluble PM_{2.5} in the southeastern United States: contrasts in sources and health associations between ascorbic acid (AA) and dithiothreitol (DTT) assays. *Atmospheric Chem Phys*. 23 mars 2016;16(6):3865-79.
154. Janssen NAH, Yang A, Strak M, Steenhof M, Hellack B, Gerlofs-Nijland ME, et al. Oxidative potential of particulate matter collected at sites with different source characteristics. *Sci Total Environ*. févr 2014;472:572-81.
155. Charrier JG, Anastasio C. On dithiothreitol (DTT) as a measure of oxidative potential for ambient particles: evidence for the importance of soluble transition metals. *Atmospheric Chem Phys*. 3 mai 2012;12(5):11317-50.
156. Yu S, Liu W, Xu Y, Yi K, Zhou M, Tao S, et al. Characteristics and oxidative potential of atmospheric PM_{2.5} in Beijing: Source apportionment and seasonal variation. *Sci Total Environ*. 10 févr 2019;650:277-87.
157. Visentin M, Pagnoni A, Sarti E, Pietrogrande MC. Urban PM_{2.5} oxidative potential: Importance of chemical species and comparison of two spectrophotometric cell-free assays. *Environ Pollut*. déc 2016;219:72-9.
158. Yang A, Jedynska A, Hellack B, Kooter I, Hoek G, Brunekreef B, et al. Measurement of the oxidative potential of PM_{2.5} and its constituents: The effect of extraction solvent and filter type. *Atmos Environ*. févr 2014;83:35-42.
159. Øvrevik J. Oxidative Potential Versus Biological Effects: A Review on the Relevance of Cell-Free/Abiotic Assays as Predictors of Toxicity from Airborne Particulate Matter. *Int J Mol Sci*. 26 sept 2019;20(19).
160. Guo Z, Hong Z, Dong W, Deng C, Zhao R, Xu J, et al. PM_{2.5}-Induced Oxidative Stress and Mitochondrial Damage in the Nasal Mucosa of Rats. *Int J Environ Res Public Health*. févr 2017;14(2):134.
161. Gangwar RS, Bevan GH, Palanivel R, Das L, Rajagopalan S. Oxidative stress pathways of air pollution mediated toxicity: Recent insights. *Redox Biol*. 1 juill 2020;34:101545.
162. Williams KM, Franzi LM, Last JA. Cell-Specific Oxidative Stress and Cytotoxicity after Wildfire Coarse Particulate Matter Instillation into Mouse Lung. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1 janv 2013;266(1):48-55.

163. Leclercq B, Happillon M, Antherieu S, Hardy EM, Alleman LY, Grova N, et al. Differential responses of healthy and chronic obstructive pulmonary diseased human bronchial epithelial cells repeatedly exposed to air pollution-derived PM₄. *Environ Pollut.* 1 nov 2016;218:1074-88.
164. Mazzoli-Rocha F, Fernandes S, Einicker-Lamas M, Zin WA. Roles of oxidative stress in signaling and inflammation induced by particulate matter. *Cell Biol Toxicol.* 1 oct 2010;26(5):481-98.
165. Balakrishna S, Lomnicki S, McAvey KM, Cole RB, Dellinger B, Cormier SA. Environmentally persistent free radicals amplify ultrafine particle mediated cellular oxidative stress and cytotoxicity. *Part Fibre Toxicol.* 17 avr 2009;6:11.
166. Jelic M, Mandic A, Maricic S, Srdjenovic B, Jelic MD, Mandic AD, et al. Oxidative stress and its role in cancer. *J Cancer Res Ther.* janv 2021;17(1):22-8.
167. Danielsen PH, Møller P, Jensen KA, Sharma AK, Wallin H, Bossi R, et al. Oxidative Stress, DNA Damage, and Inflammation Induced by Ambient Air and Wood Smoke Particulate Matter in Human A549 and THP-1 Cell Lines. ACS Publications. American Chemical Society; 2011. Disponible sur: <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/tx100407m>
168. X D, W R, F Z, W D. PM_{2.5} induces Nrf2-mediated defense mechanisms against oxidative stress by activating PIK3/AKT signaling pathway in human lung alveolar epithelial A549 cells. *Cell Biol Toxicol.* 24 mars 2013;29(3):143-57.
169. Lawal AO. Air particulate matter induced oxidative stress and inflammation in cardiovascular disease and atherosclerosis: The role of Nrf2 and AhR-mediated pathways. *Toxicol Lett.* 15 mars 2017;270:88-95.
170. Pardo M, Porat Z, Rudich A, Schauer JJ, Rudich Y. Repeated exposures to roadside particulate matter extracts suppresses pulmonary defense mechanisms, resulting in lipid and protein oxidative damage. *Environ Pollut Barking Essex 1987.* mars 2016;210:227-37.
171. Valavanidis A, Vlachogianni T, Fiotakis C. 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG): A critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis. *J Environ Sci Health Part C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev.* avr 2009;27(2):120-39.
172. Vattanasit U, Navasumrit P, Khadka MB, Kanitwithayanun J, Promvijit J, Autrup H, et al. Oxidative DNA damage and inflammatory responses in cultured human cells and in humans exposed to traffic-related particles. *Int J Hyg Environ Health.* 1 janv 2014;217(1):23-33.
173. André V, Billet S, Pottier D, Le Goff J, Pottier I, Garçon G, et al. Mutagenicity and genotoxicity of PM_{2.5} issued from an urbano-industrialized area of Dunkerque (France). *J Appl Toxicol.* 2011;31(2):131-8.
174. Saleh Yara. Étude de la pathogénicité pulmonaire des polluants atmosphériques nanoparticulaires. Juillet 2019. Disponible sur: <https://pepite-depot.univ-lille.fr/LIBRE/EDBSL/2019/2019LILUS014.pdf>
175. Zheng Y, Fan J, Chen H wei, Liu E qi. *Trametes orientalis* polysaccharide alleviates PM_{2.5}-induced lung injury in mice through its antioxidant and anti-inflammatory activities. *Food Funct.* 2019;10(12):8005-15.
176. Cao L, Lin H, Li Q, Han S, Yin H, Zhang N, et al. Study on Lung Injury Caused by Fine Particulate Matter and Intervention Effect of *Rhodiola wallichiana*. *Evid Based Complement Alternat Med.* 6 avr 2022;2022:e3693231.
177. Tanaka M, Takano H, Fujitani Y, Hirano S, Ichinose T, Shimada A, et al. Effects of exposure to nanoparticle-rich diesel exhaust on 8-OHdG synthesis in the mouse asthmatic lung. *Exp Ther Med.* 1 sept 2013;6(3):703-6.

178. de Kok TCM, Driessens FCM, Hogervorst JGF, Briedé JJ. Toxicological assessment of ambient and traffic-related particulate matter: a review of recent studies. *Mutat Res.* déc 2006;613(2-3):103-22.
179. Svecova V, Rossner P, Dostal M, Topinka J, Solansky I, Sram RJ. Urinary 8-oxodeoxyguanosine levels in children exposed to air pollutants. *Mutat Res Mol Mech Mutagen.* 9 mars 2009;662(1):37-43.
180. Sørensen M, Autrup H, Hertel O, Wallin H, Knudsen LE, Loft S. Personal Exposure to PM_{2.5} and Biomarkers of DNA Damage. :6.
181. Krisko A, Radman M. Phenotypic and Genetic Consequences of Protein Damage. Viollier PH, éditeur. *PLoS Genet.* 19 sept 2013;9(9):e1003810.
182. Moreno NC, Garcia CCM, Munford V, Rocha CRR, Pelegrini AL, Corradi C, et al. The key role of UVA-light induced oxidative stress in human Xeroderma Pigmentosum Variant cells. *Free Radic Biol Med.* 1 févr 2019;131:432-42.
183. Badran G, Verdin A, Grare C, Abbas I, Achour D, Ledoux F, et al. Toxicological appraisal of the chemical fractions of ambient fine (PM_{2.5-0.3}) and quasi-ultrafine (PM_{0.3}) particles in human bronchial epithelial BEAS-2B cells. *Environ Pollut.* août 2020;263:114620.
184. De Oliveira Alves N, Pereira G, Di Domenico M, Costanzo G, Menezes Benevenuto S, Oliveira A, et al. Inflammation response, oxidative stress and DNA damage caused by urban air pollution exposure increase in the lack of DNA repair XPC protein. *Environ Int.* 17 sept 2020;
185. Abbas I, Badran G, Verdin A, Ledoux F, Roumie M, Lo Guidice JM, et al. In vitro evaluation of organic extractable matter from ambient PM_{2.5} using human bronchial epithelial BEAS-2B cells: Cytotoxicity, oxidative stress, pro-inflammatory response, genotoxicity, and cell cycle deregulation. *Environ Res.* 1 avr 2019;171:510-22.
186. Yue W, Tong L, Liu X, Weng X, Chen X, Wang D, et al. Short term Pm_{2.5} exposure caused a robust lung inflammation, vascular remodeling, and exacerbated transition from left ventricular failure to right ventricular hypertrophy. *Redox Biol.* 1 avr 2019;22:101161.
187. Henderson WR, Chi EY, Teo JL, Nguyen C, Kahn M. A Small Molecule Inhibitor of Redox-Regulated NF- κ B and Activator Protein-1 Transcription Blocks Allergic Airway Inflammation in a Mouse Asthma Model. *J Immunol.* 1 nov 2002;169(9):5294-9.
188. Liu T, Zhang L, Joo D, Sun SC. NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Transduct Target Ther.* 14 juill 2017;2:17023.
189. Dick CAJ, Singh P, Daniels M, Evansky P, Becker S, Gilmour MI. Murine pulmonary inflammatory responses following instillation of size-fractionated ambient particulate matter. *J Toxicol Environ Health A.* 12 déc 2003;66(23):2193-207.
190. Jia H, Liu Y, Guo D, He W, Zhao L, Xia S. PM_{2.5}-induced pulmonary inflammation via activating of the NLRP3/caspase-1 signaling pathway. *Environ Toxicol.* 2021;36(3):298-307.
191. Ouyang W, Rutz S, Crellin NK, Valdez PA, Hymowitz SG. Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease. *Annu Rev Immunol.* 2011;29:71-109.
192. Cox G. IL-10 enhances resolution of pulmonary inflammation in vivo by promoting apoptosis of neutrophils. *Am J Physiol-Lung Cell Mol Physiol.* 1 oct 1996; Disponible sur: <https://journals.physiology.org/doi/10.1152/ajplung.1996.271.4.L566>

193. Zhang N, Li P, Lin H, Shuo T, Ping F, Su L, et al. IL-10 ameliorates PM2.5-induced lung injury by activating the AMPK/SIRT1/PGC-1 α pathway. *Environ Toxicol Pharmacol.* 1 août 2021;86:103659.
194. Ligtenberg AJM, Veerman ECI, Amerongen AVN, Mollenhauer J. Salivary agglutinin/glycoprotein-340/DMBT1: a single molecule with variable composition and with different functions in infection, inflammation and cancer. *1 déc 2007;388(12):1275-89.*
195. Müller H, End C, Weiss C, Renner M, Bhandiwad A, Helmke BM, et al. Respiratory Deleted in Malignant Brain Tumours 1 (DMBT1) levels increase during lung maturation and infection. *Clin Exp Immunol.* janv 2008;151(1):123-9.
196. Kiefer A, Plattner E, Ruppel R, Weiss C, Zhou-Suckow Z, Mall M, et al. DMBT1 is upregulated in cystic fibrosis, affects ciliary motility, and is reduced by acetylcysteine. *Mol Cell Pediatr.* 5 mars 2022;9:4.
197. Mollenhauer J, Helmke B, Müller H, Kollender G, Lyer S, Diedrichs L, et al. Sequential changes of the DMBT1 expression and location in normal lung tissue and lung carcinomas. *Genes Chromosomes Cancer.* 2002;35(2):164-9.
198. Müller H, Hu J, Popp R, Schmidt MHH, Müller-Decker K, Mollenhauer J, et al. Deleted in Malignant Brain Tumors 1 is Present in the Vascular Extracellular Matrix and Promotes Angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* févr 2012;32(2):442-8.
199. Zhang S, Huo X, Zhang Y, Huang Y, Zheng X, Xu X. Ambient fine particulate matter inhibits innate airway antimicrobial activity in preschool children in e-waste areas. *Environ Int.* 1 févr 2019;123:535-42.
200. Cui Y, Wang X, Lin F, Li W, Zhao Y, Zhu F, et al. MiR-29a-3p Improves Acute Lung Injury by Reducing Alveolar Epithelial Cell PANoptosis. *Aging Dis.* 1 juin 2022;13(3):899-909.
201. Haneklaus M, Gerlic M, O'Neill LAJ, Masters SL. miR-223: infection, inflammation and cancer. *J Intern Med.* sept 2013;274(3):215-26.
202. Jiao P, Wang XP, Luoreng ZM, Yang J, Jia L, Ma Y, et al. miR-223: An Effective Regulator of Immune Cell Differentiation and Inflammation. *Int J Biol Sci.* 4 juin 2021;17(9):2308-22.
203. Feng Z, Qi S, Zhang Y, Qi Z, Yan L, Zhou J, et al. Ly6G⁺ neutrophil-derived miR-223 inhibits the NLRP3 inflammasome in mitochondrial DAMP-induced acute lung injury. *Cell Death Dis.* nov 2017;8(11):e3170-e3170.
204. Zhang D, Lee H, Wang X, Groot M, Sharma L, Dela Cruz CS, et al. A potential role of microvesicle-containing miR-223/142 in lung inflammation. *Thorax.* sept 2019;74(9):865-74.
205. Wang N, Tan HY, Feng YG, Zhang C, Chen F, Feng Y. microRNA-23a in Human Cancer: Its Roles, Mechanisms and Therapeutic Relevance. *Cancers.* 20 déc 2018;11(1):7.
206. Cao M, Seike M, Soeno C, Mizutani H, Kitamura K, Minegishi Y, et al. MiR-23a regulates TGF- β -induced epithelial-mesenchymal transition by targeting E-cadherin in lung cancer cells. *Int J Oncol.* sept 2012;41(3):869-75.
207. Rodosthenous RS, Coull BA, Lu Q, Vokonas PS, Schwartz JD, Baccarelli AA. Ambient particulate matter and microRNAs in extracellular vesicles: a pilot study of older individuals. *Part Fibre Toxicol.* 8 mars 2016;13:13.

208. Xu S, Zheng L, Kang L, Xu H, Gao L. microRNA-let-7e in serum-derived exosomes inhibits the metastasis of non-small-cell lung cancer in a SUV39H2/LSD1/CDH1-dependent manner. *Cancer Gene Ther.* avr 2021;28(3-4):250-64.
209. Zhu WY, Luo B, An JY, He JY, Chen DD, Xu LY, et al. Differential expression of miR-125a-5p and let-7e predicts the progression and prognosis of non-small cell lung cancer. *Cancer Invest.* oct 2014;32(8):394-401.
210. Gerdes J. Ki-67 and other proliferation markers useful for immunohistological diagnostic and prognostic evaluations in human malignancies. *Semin Cancer Biol.* 1 juin 1990;1(3):199-206.
211. Martin B, Paesmans M, Mascaux C, Berghmans T, Lothaire P, Meert AP, et al. Ki-67 expression and patients survival in lung cancer: systematic review of the literature with meta-analysis. *Br J Cancer.* 13 déc 2004;91(12):2018-25.
212. Wang D, Ye W, Shi Q. Prognostic Value of Ki-67 Expression in Advanced Lung Squamous Cell Carcinoma Patients Treated with Chemotherapy. *Cancer Manag Res.* 14 août 2021;13:6429-36.
213. Chirieac LR. Ki-67 expression in pulmonary tumors. *Transl Lung Cancer Res.* oct 2016;5(5):547-51.

Université de Lille

FACULTE DE PHARMACIE DE LILLE
DIPLOME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE
Année Universitaire 2022/2023

Nom : BARBIER

Prénom : Emeline

**Titre de la thèse : ÉTUDE *IN VIVO* DE LA PATHOGÉNICITÉ PULMONAIRE
DES PARTICULES FINES ATMOSPHÉRIQUES.**

Mots-clés : Pollution atmosphérique ; Particules fines ; Souris A/J ; Poumon ; Stress oxydant ; Inflammation ; Altérations transcriptomiques ; Remodelage tissulaire ; Cancer.

Résumé : Plus de 7 millions de décès prématurés par an sont imputables à la pollution atmosphérique. Bien que les préoccupations sanitaires actuelles soient axées sur les particules fines (PM_{2,5}), les mécanismes de toxicité sous-jacents, de même que la persistance de leurs effets, restent encore peu étudiés. Dans le cadre de ce projet, la pathogénicité pulmonaire des particules fines atmosphériques a été étudiée dans un modèle murin exposé de manière aiguë ou subchronique aux PM_{2,5}, 24 h et/ou deux mois après arrêt des expositions. Pour cela, des mécanismes de toxicité ont été explorés dont le stress oxydant, l'inflammation et les altérations transcriptomiques. Les résultats obtenus à ce jour suggèrent que le potentiel oxydant élevé des PM_{2,5} active une grande variété de défenses antioxydantes qui ne sont pas suffisantes pour maintenir l'homéostasie redox et éviter la génération de lésions oxydatives et inflammatoires, même après l'arrêt des expositions particulières. Les altérations transcriptomiques ont révélé une inflammation 24h après l'exposition subchronique et un remodelage tissulaire, susceptible de contribuer à l'apparition de cancers, deux mois après l'arrêt des expositions. De manière intéressante, malgré l'arrêt des expositions, la persistance de ces effets suggère une rétention élevée et une élimination lente des PM_{2,5}, qui peuvent alors continuer à exercer leur toxicité dans les poumons.

Membres du jury :

Président : ALLORGE Delphine, PU-PH en Toxicologie, Université de Lille.

Directeur de thèse : GARÇON Guillaume, PU en Toxicologie, Université de Lille.

Assesseur(s) :

- FRÉALLE Émilie, PH en Parasitologie-Mycologie, CHU de Lille.
- MONTEIL Christelle, PU en Toxicologie, Université de Rouen-Normandie.
- DEVOS David, PU-PH en Pharmacologie médicale, Université de Lille.
- LO GUIDICE Jean-Marc, Chargé de recherche INSERM, Université de Lille.