



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



Thèse Présentée en vue de l'obtention du
DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PAUL VERLAINE DE METZ
DISCIPLINE : TOXICOLOGIE DE L'ENVIRONNEMENT

Soutenu publiquement le 7 juillet 2009

***EFFET DES PARTICULES FINES ATMOSPHERIQUES SUR LA
SECRETION DES CYTOKINES PRO-INFLAMMATOIRES PAR
LES CELLULES THP-1 ET MESURES DE MARQUEURS DU
STRESS OXYDANT***

Stéphane Goulaouic

Directeur : Pr. Jairo Falla

Co-encadrant scientifique : Dr. Laurent Foucaud

ECOLE DOCTORALE RESSOURCES PROCEDES PRODUITS ENVIRONNEMENT
Laboratoire des Interactions Ecotoxicologie, Biodiversité, Ecosystème
CNRS UMR 7146

Devant la Jury d'examen composé de :

M. Jean-Luc BUEB, Professeur, Université du Luxembourg (rapporteur)

M. Jairo FALLA, Professeur, Université Paul Verlaine de Metz

M. Laurent FOUCAUD, Maître de Conférences, Université Paul Verlaine de Metz

M. Wahib MAHANA, Professeur, Université de Bretagne Occidentale (rapporteur)

Mme Sandrine MARCHAIS-OBERWINKLER, Chercheur, Université de la Sarre

M. Jean-François MULLER, Professeur, Université Paul Verlaine de Metz

Je tiens à remercier tout d'abord les membres du jury qui m'ont fait l'honneur d'examiner ce travail.

Merci aux Professeurs Jean-Luc Bueb et Wahib Mahana pour avoir accepté d'analyser ce travail en tant que rapporteurs.

Je remercie le Docteur Sandrine Marchais-Oberwinkler pour avoir pris part à ce jury.

Je tiens à remercier le Professeur Jean-François Muller pour l'intérêt qu'il a porté à ce travail et également pour avoir accepté de siéger dans ce jury.

Un grand merci à mon directeur de thèse, le Professeur Jairo Falla. Je le remercie bien évidemment pour m'avoir permis de réaliser ce travail au sein de cette sympathique équipe mais également pour la confiance qu'il m'a apportée en me laissant une grande liberté dans la pratique de mon travail de recherche. Merci aussi pour les moments qu'il a su m'accorder quand cela était nécessaire, et cela malgré un emploi du temps plutôt chargé.

Je tiens à remercier très sincèrement le Docteur Laurent Foucaud, co-encadrant de thèse pour son encadrement scientifique. Au cours de ces années de travail, il a su me mettre la pression et « lâcher du lest » au bon moment mais toujours avec ce fameux « bon courage Stéphane ». Merci pour sa (très grande) patience, sa disponibilité sans pareille et sa compréhension, notamment lors de l'écriture de cette thèse.

Merci au Docteur Philippe Laval-Gilly pour sa bonne humeur, ses relectures et corrections de publication, manuscrit de thèse et autres posters.

Je souhaite remercier chaleureusement le Docteur Amar Bennasroune. Je pense qu'il ne sait pas à quel point il a pu m'aider durant ces années, aussi bien au laboratoire, qu'en dehors. Merci pour pleins de choses Amar. Vivement Terminator 5, toutoum toutoum.

Je souhaite remercier le Docteur Sébastien Plançon, Ingénieur de recherche à l'Université du Luxembourg (Life Science Research Unit), pour m'avoir initié aux techniques de microscopie confocale.

Merci aux Professeurs Jean-Jacques Gaumet et Jean-François Muller ainsi qu'aux Docteurs Gabriel Krier et Lionel Vernex-Loset du Laboratoire de Spectrométrie de Masse et de Chimie Laser de l'Université de Metz pour les analyses chimiques réalisées.

Je remercie M. Dolisy, le Docteur Jonathan Signoret et Bérénice Lefèvre de Atmo Lorraine Nord d'avoir permis les nombreuses collectes de particules atmosphériques PM_{2,5}.

Mes remerciements vont également à M. Thierry Zimni, Directeur de l'IUT de Moselle Est qui m'a permis de réaliser des expériences relatives au traitement thermique de mes particules de noir de carbone.

Merci à toute l'équipe du département Génie Biologique de l'IUT de Thionville Yutz, pour les nombreuses aides et conseils fournis mais aussi pour leur sympathie et l'humour décapant de certains...

Plus largement, merci à toutes les personnes travaillant à l'IUT de Thionville-Yutz qui ont rendu ces années très enrichissantes. Remerciements spéciaux à Ghislaine pour les nombreux services/conseils rendus et donnés, à Pierre Petit pour ses drôles de jeux de mots (bonne chance pour la thèse !) et au Professeur François-Xavier Royer qui s'est toujours intéressé à l'état d'avancement de ma thèse.

Je remercie Catherine et Sabrina, les meilleures techniciennes de laboratoires du monde. Merci pour leur bonne humeur, leur gentillesse et leur aide précieuse et indispensable.

Un très grand merci à Claudia et Didier, amis « thésards », champions de MxG. Courage à vous deux. Merci aussi à Laura, la plus adorable des filles pour ses « cheer up » depuis le mois de février 2009...

Merci pour leur sympathie, leur aide et les nombreuses petites discussions à tous les étudiants, stagiaires, thésards, ATER et « post doc » que j'ai rencontré au cours de ces années à l'IUT. Dans le désordre, Clément, avec qui je fais chaque année un marathon photo, Marie, Vinciane, Natacha, Vivien, Lili-Anne, Kathleen, Janie, Thérèse, Hassan, Jérôme, Perrine, Christophe, Marc, Pavel, Gehan, Angie (pour sa super bonne humeur) et une spéciale dédicace à Percy alias Monsieur Plomb.

Un sympathique merci à tous les étudiants de l'IUT dont certains me demandaient régulièrement des nouvelles sur l'avancement de mes travaux. Merci à Carine et Chloé pour être venues assister à ma soutenance.

Un immense merci à mes amis sans qui je n'aurais jamais fini la rédaction de cette thèse. Remerciements spéciaux à Amar, Laura, Claudia, Didier, Morgane et ma ptite Cathy qui ont fortement contribué d'une manière directe et/ou indirecte à la rédaction de cette thèse. Merci, merci, merci.

Un paragraphe pour elle toute seule, pour l'unique, la superbe, la gentille, la sympathique, la meilleure amie dont l'on puisse rêver, Cathy. Tu m'as été indispensable (tu l'es toujours). Hâte de retourner voir un bon nanar avec toi.

Merci à Caroline, qui sans le savoir m'a rendu plus fort, plus déterminé et plus tranchant que jamais. Bonne continuation à cette fille aussi belle que nature (...).

Pour finir, je souhaite remercier ma famille qui m'a bien évidemment très fortement soutenu tout le long de ce travail, notamment lors des moments difficiles. Merci.

Merci à tous ceux qui m'ont aidé de quelque façon que ce soit, de près comme de loin.

SOMMAIRE

SOMMAIRE	P.4
-----------------	------------

LISTE DES ABREVIATIONS	P.10
-------------------------------	-------------

AVANT PROPOS	P.13
---------------------	-------------

I. INTRODUCTION	P.14
------------------------	-------------

I.1. Les particules atmosphériques et leurs effets sur la santé	p.15
--	-------------

<i>I.1.1. Définitions et caractérisations des particules atmosphériques</i>	<i>p.15</i>
--	--------------------

<i>I.1.1.1. Les différents types de particules</i>	<i>p.15</i>
--	-------------

<i>I.1.1.2. Prélèvement des particules dans l'environnement</i>	<i>p.19</i>
---	-------------

<i>I.1.1.2.1. Les méthodes de prélèvement des particules</i>	
--	--

<i>I.1.1.2.2. Méthodes de récupération de particules sur filtre pour les tests biologiques</i>	
--	--

<i>I.1.1.3. Méthodes d'analyse des particules</i>	<i>p.22</i>
---	-------------

<i>I.1.1.3.1. Considérations générales</i>	
--	--

<i>I.1.1.3.2. Mesures physiques</i>	
-------------------------------------	--

<i>I.1.1.3.3. Mesures chimiques</i>	
-------------------------------------	--

<i>I.1.1.4. La réglementation</i>	<i>p.25</i>
-----------------------------------	-------------

<i>I.1.2. Impacts de la pollution particulaire sur la santé</i>	<i>p.27</i>
--	--------------------

<i>I.1.2.1. Les études épidémiologiques</i>	<i>p.27</i>
---	-------------

<i>I.1.2.2. L'appareil respiratoire et les pathologies respiratoires</i>	<i>p.29</i>
--	-------------

<i>I.2.2.2.1. Description de l'appareil respiratoire</i>	
--	--

<i>I.2.2.2.2. Pénétration des particules dans l'appareil respiratoire</i>	
---	--

<i>I.2.2.2.3. Pathologies</i>	
-------------------------------	--

<i>I.1.2.3. Les pathologies cardiovasculaires</i>	<i>p.33</i>
---	-------------

<i>I.1.3. Cellules cibles et atteintes cellulaires</i>	<i>p.34</i>
---	--------------------

<i>I.1.3.1. Les cellules pulmonaires épithéliales</i>	<i>p.34</i>
---	-------------

<i>I.1.3.2. Les cellules des alvéoles pulmonaires</i>	<i>p.35</i>
---	-------------

I.2. Réponse inflammatoire et effets des particules **p.37**

I.2.1. La réaction inflammatoire **p.38**

I.2.1.1. Déroulement de la réaction inflammatoire *p.38*

I.2.1.2. La réaction inflammatoire pulmonaire *p.39*

I.2.1.3. Les médiateurs de l'inflammation *p.40*

I.2.2. Les cytokines **p.41**

I.2.2.1. Les familles de cytokines *p.41*

I.2.2.2. Caractéristiques générales des cytokines *p.42*

I.2.2.3. Les récepteurs des cytokines *p.43*

I.2.2.4. Les macrophages : un rôle central *p.44*

I.2.2.5. Cytokines d'intérêts *p.47*

I.2.2.5.1. L'interleukine 1

I.2.2.5.2. L'interleukine 8

I.2.2.5.3. Le facteur nécrosant des tumeurs α (TNF- α)

I.2.2.5.4. L'interleukine 6

I.2.2.5.5. L'interleukine 10

I.2.2.5.6. L'interleukine 12

I.2.3. Effets inflammatoires des particules **p.51**

I.2.3.1. In vivo *p.51*

I.2.3.2. In vitro *p.52*

I.2.3.3. Effets inflammatoires dus aux caractéristiques physiques : influence de la taille et de la réactivité de surface *p.53*

I.2.3.4. Effets inflammatoires dus aux différents composés adsorbés sur les particules *p.54*

I.3. Induction du stress oxydant par les particules **p.56**

I.3.1. Le stress oxydant **p.56**

I.3.1.1. Définition *p.56*

I.3.1.2. Dommages membranaires et formation du HNE *p.58*

I.3.1.3. Les mécanismes de défense antioxydants *p.60*

I.3.2. Particules et stress oxydant **p.62**

I.3.2.1. Généralités *p.62*

I.3.2.2. Influences des caractéristiques physiques des particules : rôle de la taille *p.62*

I.3.2.3. Influence de la composition des particules *p.64*

II. MATERIELS ET METHODES p.66

II.1. Les particules utilisées p.67

II.1.1. Les particules atmosphériques PM_{2,5} p.67

II.1.1.1. La campagne de prélèvements p.67

II.1.1.2. Récupération des PM_{2,5} déposées sur les filtres p.68

II.1.1.3. Quantification des PM_{2,5} récupérées p.69

II.1.1.4. Préparation des suspensions de particules p.69

II.1.1.5. Chimie analytique p.70

II.1.1.5.1. Dosage en HAP

II.1.1.5.2. Dosage en métaux

II.1.2. Les particules de noir de carbone p.70

II.1.2.1. Caractéristiques p.70

II.1.2.2. Dopages des particules fines et ultrafines de noir de carbone p.71

II.1.2.2.1. Dopage des HAP

II.1.2.2.2. Dopage des métaux

II.2. Matériel biologique p.72

II.2.1. Caractéristiques de la lignée cellulaire THP-1 p.72

II.2.2. Culture de cellules p.72

II.2.3. Différenciation des cellules THP-1 en macrophages p.73

II.2.4. Expositions in vitro p.73

II.3. Tests de viabilité cellulaire p.74

II.3.1. Test LDH p.74

II.3.2. Test MTT p.75

II.4. Dosage des cytokines p.76

II.5. Evaluation du stress oxydant p.78

II.5.1. Dosage des protéines p.78

II.5.2. Mesure du potentiel oxydant p.79

II.5.3. Dosage du glutathion p.79

<u>II.5.4. Etude du niveau d'expression de la HO-1 par Western Blotting</u>	<u>p.80</u>
<i>II.5.4.1. Préparation des protéines totales</i>	<i>p.80</i>
<i>II.5.4.2. Migration et transfert sur membrane PVDF</i>	<i>p.81</i>
<i>II.5.4.3. Hybridation avec des anticorps</i>	<i>p.81</i>
<u>II.5.5. Détection du HNE par immunohistochimie</u>	<u>p.82</u>
<i>II.5.5.1. Hydrolyse du HNE-DA</i>	<i>p.82</i>
<i>II.5.5.2. Immunohistochimie et observations au microscope confocal</i>	<i>p.82</i>
<u>II.6. Analyses statistiques des résultats</u>	<u>p.84</u>

III. RESULTATS **p.85**

III.1. Caractérisation des particules **p.86**

III.1.1. Réalisation des suspensions de PM_{2,5} **p.86**

III.1.1.1. Choix du filtre *p.86*

III.1.1.2. La campagne de prélèvements *p.86*

III.1.1.3. La mise en suspension des PM_{2,5} *p.88*

III.1.2. Composition en HAP et métaux des PM_{2,5} **p.90**

III.1.2.1. Analyse des métaux *p.90*

III.1.2.2. Analyse des HAP *p.91*

III.1.3. Particules de noir de carbone **p.91**

III.1.3.1. Données de la littérature : caractéristiques des CB et ufCB *p.91*

III.1.3.2. Dopages des particules de noir de carbone *p.92*

III.1.3.2.1. Dopage des particules avec des métaux

III.1.3.2.2. Dopage des particules avec des HAP

III.2. Effets des particules sur la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires **p.94**

III.2.1. Effets des PM_{2,5} **p.95**

III.2.1.1. Effet des PM_{2,5} prélevées lors des différentes saisons sur la sécrétion d'IL-1 β *p.95*

<i>III.2.1.2. Effet des PM_{2,5} prélevées lors des différentes saisons sur la sécrétion d'IL-8</i>	<i>p.97</i>
<i>III.2.1.3. Effet des PM_{2,5} prélevées lors des différentes saisons sur la sécrétion d'IL-6</i>	<i>p.98</i>
<i>III.2.1.4. Effet des PM_{2,5} prélevées lors des différentes saisons sur la sécrétion du TNF-α</i>	<i>p.99</i>
<u>III.2.2. Effets des métaux adsorbés sur les particules fines et ultrafines de noir de carbone</u>	<u>p.101</u>
<i>III.2.2.1. Effet des métaux, des CB et des ufCB, dopées ou non sur la sécrétion d'IL-1β</i>	<i>p.102</i>
<i>III.2.2.2. Effet des métaux, des CB et des ufCB, dopées ou non sur la sécrétion d'IL-8</i>	<i>p.105</i>
<i>III.2.2.3. Effet des métaux, des CB et des ufCB, dopées ou non sur la sécrétion d'IL-6</i>	<i>p.108</i>
<i>III.2.2.4. Effet des métaux, des CB et des ufCB, dopées ou non sur la sécrétion du TNF-α</i>	<i>p.110</i>
<u>III.2.3. Effets des HAP adsorbés sur les particules fines et ultrafines de noir de carbone</u>	<u>p.112</u>
<i>III.2.3.1. Effet des HAP, des CB et des ufCB, dopées ou non sur la sécrétion d'IL-1β</i>	<i>p.113</i>
<i>III.2.3.2. Effet des HAP, des CB et des ufCB, dopées ou non sur la sécrétion d'IL-8</i>	<i>p.115</i>
<i>III.2.3.3. Effet des HAP, des CB et des ufCB, dopées ou non sur les sécrétions d'IL-12 et d'IL-10</i>	<i>p.118</i>
<u>III.3. Mesures de marqueurs du stress oxydant induit par les particules et le HNE</u>	<u>p.121</u>
<u>III.3.1. Potentiel oxydant des particules</u>	<u>p.121</u>
<u>III.3.2. Induction du stress oxydant par les particules sur les cellules THP-1</u>	<u>p.122</u>
<i>III.3.2.1. Test de cytotoxicité par mesure de l'altération membranaire</i>	<i>p.122</i>
<i>III.3.2.2. Mise en évidence de la formation du HNE</i>	<i>p.123</i>
<i>III.3.2.3. Mise en évidence de l'expression de la HO-1</i>	<i>p.125</i>
<i>III.3.2.4. Effet des particules sur les concentrations intracellulaires en GSX et GSSG</i>	<i>p.125</i>
<u>III.3.3. Le HNE : inducteur du stress oxydant</u>	<u>p.126</u>
<i>III.3.3.1. Test de cytotoxicité par mesure de l'altération membranaire</i>	<i>p.127</i>
<i>III.3.3.2. Mise en évidence de la HO-1</i>	<i>p.127</i>
<i>III.3.3.3. Effet du HNE sur les concentrations intracellulaires en GSX et GSSG</i>	<i>p.129</i>

IV. ANALYSE ET DISCUSSION **P.131**

V. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES **P.144**

VI. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES **P.146**

LISTES DES TABLEAUX ET FIGURES **P.165**

Liste des abréviations

AA :	Acide Aminé
AASQA :	Association Agréée de Surveillance de la Qualité de l'Air
ACS :	American Cancer Society
ADN :	Acide DésoxyriboNucléique
AFNOR :	Association Française de NORmalisation
ANOVA :	ANalysis Of VAriance
B[a]p :	Benzo[a]pyrène
B[b]f :	Benzo[b]fluoranthène
BPCO :	Broncho-Pneumopathie Chronique Obstructive
CB :	Carbon Black
COV:	Composés Organiques Volatiles
CSF :	Colony Stimulating Factor
DCFH :	2',7'-DiChloroFluorescin
DMSO :	DiMéthylSulfOxyde
DNTB :	5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid)
DPL :	DiPalmitoyl Lécithine (2,3-dipalmitoyl-sn-glycero-1-phosphocholine)
ECD :	Electron Capture Detector (DéTECTeur à Capture d'Electrons)
EDTA :	EthyleneDiamineTetraacetic Acid
ELISA :	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
EUP :	Eau Ultra Pure
FID :	Flame Ionisation Detector (DéTECTeur à Ionisation de Flamme)
FPD :	Flame Photometric Detector (DéTECTeur Photométrique de Flamme)
GC :	Gaz Chromatography (Chromatography en phase Gazeuse)
GM-CSF :	Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor
GPX :	Glutathion PeroXydase
GR :	Glutathion Réductase
GSH :	Glutathion
GSSG :	Glutathion disulfide
GST :	Glutathion S-Transférerase
HAE :	4-Hydroxy-2-AlkEnal

HAP :	Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques
HNE :	4-Hydroxy-2-NonEnal
HNE-DA :	(E)-4-HydroxyNonEnal-DimethylAcetal
HO-1 :	Hème Oxygénase 1
HPLC :	High Performance Liquid Chromatography
HRP :	Horse radish Peroxidase ou peroxydase du raifort
HSP :	Heat Shock Protein
ICAM-1 :	Inter-Cellular Adhesion Molecule 1
IFN :	InterFéroN
IL- :	InterLeukine
IRF-3 :	Interferon Regulatory Factor 3
JAK-STAT :	JANus Kinases and Signal Transducers and Activators of Transcription
LAURE :	Loi sur l'Air et l'Utilisation Rationnelle de l'Energie
LBP:	Lipopolysaccharide Binding Protein
LDH :	Lactate DésHydrogénase
LEA :	Loi sur l'Environnement Atmosphérique
LPS :	LipoPolySaccharide
OMS :	Organisation Mondiale de la Santé
MAPK :	Mitogen-Activated Protein Kinase
MDA :	MalonDiAldehyde
MEB :	Microscopie Electronique à Balayage
MTT :	thiazolyl blue tetrazolium bromide (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)
NADH :	Nicotinamide Adenine Dinucleotide
NADPH :	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate réduit
Nf-κB :	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NK :	Natural Killer
PAGE :	PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
PBS :	Phosphate Buffered Saline ou tampon phosphate salin
PBST :	PBS Tween 20
PDi :	Particule de Diesel
PDU :	Plan de Déplacement Urbain
PIXE :	Particle-Induced X-ray Emission
PM :	Particulate Matter
PM _{0,1} :	Particules atmosphériques prélevées avec un impacteur dont l'efficacité de prélèvement est de 50 % pour les particules de 0,1 µm

PM ₁₀ :	Particules atmosphériques prélevées avec un impacteur dont l'efficacité de prélèvement est de 50 % pour les particules de 10 µm
PM _{2,5} :	Particules atmosphériques prélevées avec un impacteur dont l'efficacité de prélèvement est de 50 % pour les particules de 2,5 µm
PMA :	Phorbol 12-Myristate 13-Acétate
PPA :	Plan de Protection de l'Atmosphère
PRQA :	Plan Régional de la Qualité de l'Air
PVDF :	PolyVinyliDene Fluoride
Pyr :	Pyrène
ROS :	Reactive Oxygen Species
RPMI :	Roswell Park Memorial Institute (milieu de culture)
SAB :	Sérum-Albumine Bovine
SDS :	Sodium Dodécyl Sulfate
SOD :	SuperOxyde Dismutase
SSA :	5-SulfoSalicylic Acid
SVF :	Sérum de Veau Fœtal
TEMED :	TEtraMéthylEthylèneDiamine
TEOM :	Tapered Element Oscillating Microbalanced
TLR :	Toll-Like Receptor
TMB :	TétraMéthyl Benzidine dihydrochloride
TNF :	Tumor Necrosis Factor
ufCB :	ultrafine Carbon Black
UV :	Ultra Violet

Avant propos

La pollution atmosphérique est considérée comme pouvant représenter un danger pour la santé humaine. Au cours des dernières décennies, de nombreuses études ont mis en évidence l'importance de la pollution particulaire dans de nombreuses maladies cardio-pulmonaires et l'apparition de cancers des poumons. De nombreuses études épidémiologiques ont mis en relation la pollution particulaire avec des effets sur la santé à court terme (lors d'épisode de pollution particulaire, augmentation des hospitalisations) mais aussi à long terme (morbidité, cancers des poumons, maladies cardio-pulmonaires). Une étude épidémiologique réalisée dans l'union européenne en 2000 pour l'OMS a montré une corrélation entre l'augmentation de la mortalité et de la morbidité et la hausse de la quantité de particules atmosphériques. Ainsi, il a été estimé que la composante particulaire de la pollution de l'air serait à l'origine de 3 millions d'années de vie perdues ce qui représente 288 000 décès prématurés. Aujourd'hui, les recherches menées visent à déterminer quelles caractéristiques des particules seraient responsables des effets biologiques observés. Ainsi, de nombreuses études ont mis en avant l'importance de la taille des particules pour deux raisons : ce paramètre joue un rôle important d'une part sur leur capacité à pénétrer dans les voies aériennes (les plus fines pénètrent le plus profondément) et d'autre part sur leur capacité à réagir avec les composants cellulaires. La taille influe directement sur la capacité des particules à induire une inflammation mais aussi un stress oxydant. D'autres études insistent également sur l'importance de la composition des particules dans la génération de ces phénomènes biologiques (métaux, composés organiques comme les hydrocarbures aromatiques polycycliques et les quinones). Dans le cadre de ce travail, le potentiel inflammatoire des PM_{2,5} a été étudié par une approche *in vitro* utilisant la mesure de cytokines inflammatoires sécrétées par des cellules THP-1. L'influence de la taille des particules ainsi que leur composition en métaux et hydrocarbures aromatiques polycycliques sur la sécrétion des cytokines de l'inflammation a également été étudiée. Deux types de particules de noir de carbone, formées d'un corps carboné, ont été utilisés en vue d'évaluer l'effet de la taille uniquement. L'étude des composés adsorbés sur les particules a été réalisée selon une approche expérimentale consistant à doper ces particules avec différents métaux et hydrocarbures aromatiques polycycliques. Les particules atmosphériques en contact avec les cellules peuvent induire un stress oxydant. Cette propriété a été mesurée en utilisant le modèle de particules ultrafines de noir de carbone. L'implication d'un biomarqueur de peroxydation lipidique, l'hydroxy-2-nonanal a été envisagée, ce qui a conduit à évaluer son rôle possible dans le déclenchement de la réponse oxydante aux particules.

I. INTRODUCTION

I.1. Les particules atmosphériques et leurs effets sur la santé

I.1.1. Définitions et caractérisations des particules atmosphériques

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), les particules atmosphériques peuvent être définies ainsi : « les particules en suspension ou les matières particulaires sont des polluants atmosphériques consistant en un mélange complexe de substances organiques et minérales en suspension dans l'air, sous forme solide et/ou liquide. Ces particules sont de tailles, de compositions et d'origines diverses. Leurs propriétés se définissent en fonction de leur diamètre aérodynamique appelé taille particulaire ». Le diamètre aérodynamique d'une particule est égal au diamètre d'une sphère de masse volumique 1 g/cm^3 et dont la vitesse de chute est égale à celle de la particule considérée, en absence de vent et de turbulences (AFNOR, 1985). En d'autre terme, ce diamètre définit le diamètre d'une hypothétique particule d'eau sphérique possédant les mêmes caractéristiques aérodynamiques que la particule concernée. Cette définition générale révèle à quel point ce type de pollution recouvre une diversité importante de composés et donc la difficulté de caractériser précisément cette dernière. En effet bien que le diamètre aérodynamique soit un paramètre de classification communément admis, celui-ci ne traduit en rien la diversité d'origine, les composés présents ainsi que les propriétés chimiques des particules considérées. En revanche du point de vue toxicologique, cette définition selon la taille a une signification quand au potentiel de pénétration de ces particules dans l'appareil respiratoire.

I.1.1.1. Les différents types de particules

Le diamètre aérodynamique des particules atmosphériques varie de $0,02 \mu\text{m}$ à $100 \mu\text{m}$. Dans le cas où les mesures de particules sont réalisées à des fins sanitaires, la collecte des particules ne concerne que la fraction inhalable, c'est-à-dire les particules ayant une taille inférieure à $10 \mu\text{m}$.

Dans la littérature deux grands types de classification sont utilisés, la dénomination métrologique faisant référence à la taille des particules (Monn & Becker, 1999; Choi *et al.*, 2004), correspondant à l'abréviation PM pour Particulate Matter avec un indice de taille et

une dénomination plus imagée utilisée en toxicologie par l'utilisation des adjectifs « grosse, fine, ultrafine et/ou nano » :

- Les PM₁₀ (particules dont le diamètre aérodynamique est inférieur à 10 µm) ou grosses particules. Ces particules correspondent à la fraction qui va pénétrer dans l'appareil respiratoire jusque dans les voies aériennes supérieures (Donaldson & Stone, 2003).
- Les PM_{2,5} (particules dont le diamètre aérodynamique est inférieur à 2,5 µm) ou particules fines. Cette fraction parcourt l'appareil respiratoire jusqu'aux alvéoles pulmonaires (Donaldson & Stone, 2003; Choi *et al.*, 2004).
- Les PM_{0,1} (particules dont le diamètre aérodynamique est inférieur à 0,1 µm) ou particules ultrafines (origine anthropique non contrôlée). Leur taille inférieure aux structures cellulaires leur confère des propriétés de pénétration au niveau intracellulaire spécifique (MacNee & Donaldson, 2003; Geiser *et al.*, 2005). Ces particules sont également dénommées nanoparticules bien que cette dernière dénomination soit plutôt réservée aux particules manufacturées à l'échelle nanométrique (moins de 100 nm) (Borm *et al.*, 2006).

Pour le développement qui suit, on utilisera préférentiellement la dénomination toxicologique mais les données relatives à la composition sont souvent associées à la dénomination métrologique.

Suivant leur mécanisme de formation, les particules seront de type primaire (directement émises dans l'atmosphère) ou de type secondaire (générées par des réactions chimiques impliquant les polluants gazeux). Les particules primaires proviennent directement des émissions dans l'atmosphère par des procédés naturels ou anthropiques, de ce fait leur composition est très différente (Alastuey *et al.*, 2006). Les volcans et les sources terrigènes constituent les origines naturelles principales. Pour les sources anthropiques, elles se déclinent par ordre décroissant d'importance comme suit : la combustion du diesel et de l'essence des véhicules automobiles, l'utilisation de combustibles domestiques solides (charbon, bois), les activités industrielles (constructions, cimenteries, fonderies), la circulation routière (abrasion de la route, des pneus et des freins), les travaux d'excavation et les activités minières (Choi *et al.*, 2004; Rodriguez *et al.*, 2004; OMS, 2005). De plus, la taille, la masse et la composition de ces particules dépend non seulement de la source mais aussi des conditions climatiques (Pozzi *et al.*, 2003).

Les particules secondaires sont d'origines anthropiques et naturelles ; elles sont générées dans l'atmosphère par des réactions mettant en jeu les polluants gazeux. En effet, les particules secondaires résultent entre autre de la transformation des NO_x (oxydes d'azote), émis par la circulation automobile et certains procédés industriels, en nitrates mais aussi de la transformation du SO₂ issu de combustibles contenant du soufre en sulfates (OMS, 2005; Vassilakos *et al.*, 2005). Plus généralement, il existe trois mécanismes de formation des particules secondaires (Baulig, 2004b; Borm *et al.*, 2006) :

- L'accumulation : c'est la transformation dans l'atmosphère des gaz en particules.
- La nucléation : ce phénomène se produit après l'accumulation. Il consiste en une croissance des particules secondaires (qui après la nucléation vont de 1 à 10 nm) en taille par coagulation ou condensation.
- La formation mécanique : plus spécifique des particules secondaires d'origine naturelle car il s'agit de l'érosion éolienne, des météorites et des embruns contenant des particules de sels provenant du bris des vagues.

Les particules primaires sont essentiellement retrouvées dans la fraction des grosses particules alors que les particules secondaires sont principalement présentes dans les classes des particules fines et ultrafines.

Les substances majoritaires composant les particules sont les sulfates, les nitrates, l'ammonium, le chlorure de sodium, le carbone, des matières minérales ainsi que l'eau. Mais la composition des particules est en lien direct avec leurs origines, il peut donc être utile d'associer pour chaque classe de particules, les sources, le mode de formation et leur composition (Tableau 1).

Tableau 1 : Caractéristiques des différentes classes de particule

Dénomination		Origine	Type de formation	Composition
Toxico- logique	Métrolo- gique			
Grosses particules	PM₁₀	Naturelle et anthropique	- Erosion minérale - Usure de la chaussée, des pneus, des garnitures de freins	- Matériaux terrigènes (oxydes d'aluminium, silice) - Carbone organique - Carbone élémentaire - Sulfates, nitrates et ammonium - Embruns (HCl)
Particules fines	PM_{2,5}	Anthropique essentiellement	- Déchets de combustion - Condensation - Nucléation	- Matériaux terrigènes - Carbone organique - Carbone élémentaire - Sulfates, nitrates et ammonium - HAP** - Métaux lourds (Pb, Zn, Cd)*
Particules ultrafines	PM_{0,1}	Anthropique essentiellement	- Déchets de combustion	- Carbone élémentaire - HAP** - Métaux lourds (Pb, Zn, Cd)*

* près de 80 % des particules contenant du plomb sont inférieures à 2 µm

** environ 82 % des particules contenant des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) ont un diamètre inférieur à 2 µm

On constate ainsi que **les grosses particules** (PM₁₀) sont d'origine aussi bien naturelle qu'anthropique : embruns marins, suspension de terre et de sable, pollens, résidus de combustion de centrale électrique, cimenterie, poussière lors d'excavation de matériaux, émissions diverses des véhicules, usure de la route et des pneus (Rodriguez *et al.*, 2004). Cependant, la fraction PM₁₀ est plutôt considérée comme composée de particules d'origine naturelle en comparaison des particules de plus petit diamètre (Choi *et al.*, 2004). En milieu urbain, cette fraction va être augmentée au cours d'épisodes localisés de pollution, par exemple à proximité des axes de circulation aux heures d'affluences (Baulig, 2004b). Il est important de souligner l'hétérogénéité des PM₁₀ liée au fait que cette fraction de particules est un mélange de différents composés qui varient avec le lieu de formation ainsi que des conditions de formations (variations climatiques et saisons) (Donaldson & Stone, 2003; Hutchison *et al.*, 2005). De plus, en considérant l'ensemble des particules atmosphériques, elles sont peu nombreuses comparées à leur masse qui elle est importante (Baulig, 2004b).

Les **particules fines** font exclusivement partie de la classe des particules en suspension, c'est-à-dire qu'elles ne se déposent pas. En nombre, elles représentent une part importante de la fraction PM₁₀ qui est mesurée en routine par les réseaux de qualité de l'air. Cependant, en terme de masse elle représente une part beaucoup moins importante. En ce qui concerne leur composition, on retrouve la même que les PM₁₀ (Rodriguez *et al.*, 2004). Au

contraire de la fraction PM_{10} , la fraction $PM_{2,5}$ résulte d'activités anthropiques : émissions des moteurs diesel, les suies des processus de combustion, la transformation chimique des gaz polluant en sulfates et en nitrates et tous déchets de combustion (Imrich *et al.*, 2000; Choi *et al.*, 2004). A toutes ces particules pourront s'adsorber différentes substances comme les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) ou des métaux (Pb, Ni, etc.).

Les **particules ultrafines** ou la fraction des $PM_{0,1}$ en terme de masse représente une petite partie des PM_{10} , par contre leur nombre est très important. Le prélèvement de ces particules fait encore face à des difficultés techniques du fait de leur taille. Elles proviennent principalement de systèmes de combustion : ce sont des particules de carbone sur lesquelles sont adsorbés des HAP et des métaux (Donaldson & Stone, 2003; Koike & Kobayashi, 2006).

Après leur production, les particules en suspension vont être transportées par les flux d'air. La distance de transport des particules est essentiellement fonction de leur taille et de leur densité. Ainsi, les particules grosses et lourdes vont sédimenter rapidement, d'où le qualificatif de particules sédimentables. Au contraire, les particules plus fines vont avoir un comportement s'apparentant à celui des gaz et de ce fait ne sédimentent quasiment pas ; elles sont appelées particules en suspension et peuvent parcourir d'importantes distances car incapables de se déposer au sol sous l'effet de la gravitation. Par convention, les particules prélevées pour les études toxicologiques sont les particules en suspension.

1.1.1.2. Prélèvement des particules dans l'environnement

1.1.1.2.1. Les méthodes de prélèvement des particules

Comme mentionné précédemment, dans le cas où les mesures de particules sont réalisées à des fins de prédictions sanitaires, leur collecte ne concerne que la fraction inhalable, c'est-à-dire celles avec une taille inférieure à $10\ \mu\text{m}$, une sélection en fonction de la taille est donc nécessaire. Les principales techniques permettant de récupérer les particules en suspension dans l'air sont, la filtration et l'impaction. La méthode de sédimentation basée sur le principe de la gravité est principalement utilisée pour la mesure des particules sédimentables qui sont celles d'un diamètre supérieure à $50\ \mu\text{m}$ donc moins intéressantes dans le cas d'études sanitaires car incapables de pénétrer dans l'appareil respiratoire (Quisefit & Gaudichet, 1998).

La sélection des particules en fonction de leur taille

L'air est aspiré à travers une tête de prélèvement placée à l'entrée du système de prélèvement d'air qui, de par sa conception, permet d'éliminer les particules dont le diamètre aérodynamique est supérieure à une valeur définie ; on parle de seuil de coupure granulométrique¹. Les seuils de coupure les plus fréquents sont 2,5 et 10 μm ; on parle alors respectivement de tête $\text{PM}_{2,5}$ et PM_{10} . Cependant, il faut souligner qu'aucune tête de prélèvement n'est strictement sélective. A titre d'exemple, lors d'un prélèvement de $\text{PM}_{2,5}$, aucun appareil ne permet une sélectivité stricte, ainsi, l'appareil ne collecte jamais 100 % des particules inférieures à 2,5 μm et à l'opposé l'appareil n'exclut pas 100 % des particules de taille supérieures à 2,5 μm . C'est pourquoi, l'essentiel de la masse d'un échantillon de $\text{PM}_{2,5}$ est dû aux particules les plus grosses (qui font plus de 2,5 μm) (Mathé *et al.*, 1998).

De plus, le seuil de coupure granulométrique est fonction du débit de prélèvement, du colmatage du filtre, ainsi que des conditions ambiantes de température et de pression (Mathé *et al.*, 1998).

La filtration

Ce type de procédé sert à collecter une fraction représentative de la quantité particulaire de l'air. Les particules sont entraînées dans l'appareil *via* une pompe et finissent leur course sur un filtre de porosité connue. Deux types de structures sont utilisées : les structures fibreuses (Figure 1A) et les structures en film (Figure 1B).

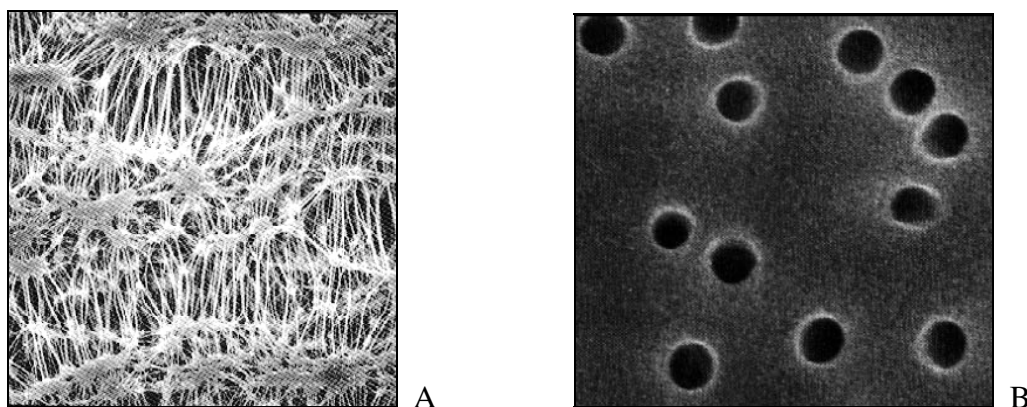


Figure 1 : Photographies en MEB de deux types de filtres. a) filtre en nitrocellulose b) filtre en polycarbonate (Quisefit & Gaudichet, 1998)

¹ : Le seuil de coupure granulométrique ou diamètre de coupure est défini comme suit : la fraction particulaire collectée se caractérise par une courbe qui relie la probabilité qu'une particule franchisse la tête de prélèvement, en fonction de son diamètre aérodynamique. Ce diamètre est appelé diamètre de coupure pour une probabilité de 50 %.

De ce fait, la filtration est fonction de la structure du filtre, si elle est fibreuse, de la densité de fibre, si elle est en film, de la densité des pores et du débit de prélèvement (Quisefit & Gaudichet, 1998). Le choix des filtres doit suivre un certain nombre de critères dont notamment : le matériaux du filtre, la structure, la porosité, le risque de colmatage, la stabilité chimique, l'aptitude à la manipulation et au transport ainsi que la facilitation des analyses chimiques et/ou biologiques ultérieures (Mathé *et al.*, 1998).

Associée à une tête de prélèvement, cette technique permet de collecter la fraction particulaire désirée à l'instar du Partisol, Model 2000 Air Sampler (Rupprecht & Patashnick Co., Inc., Albany, NY) utilisé pour cette étude qui peut fonctionner avec un débit équivalent à la respiration de l'homme à savoir 16,7 L/min soit 1 m³/h (Figure 16, p.67). Il existe aussi des échantillonneurs à très haut débit tel le DA-80 (Digitel, Cugy, Suisse) qui prélève à 500 L/min soit 30 m³/h.

L'impaction

Cette méthode permet la séparation des particules collectées en vue d'étudier la répartition granulométrique de l'échantillon. L'appareil utilisé est un impacteur en cascade dont le principe repose sur une succession d'étages d'impaction définis chacun par un diamètre de tuyère entraînant la séparation granulométrique des particules. Perpendiculairement aux tuyères, à chaque étage, se trouve une surface plane sur laquelle les particules qui possèdent une inertie suffisante pour se dégager du flux d'air, vont s'impacter. Les autres, plus fines sont entraînées par le filet d'air qui contourne l'obstacle et parviennent jusqu'à l'étage suivant. Le seuil des plateaux est fonction du débit de l'air (Quisefit & Gaudichet, 1998; Person & Tymen, 2005).

1.1.1.2.2. Méthodes de récupération de particules sur filtre pour les tests biologiques

Dans la perspective de tests biologiques, les particules récoltées doivent être récupérées du filtre ou des plateaux d'impaction. Pour les filtres, les principales procédures consistent en un traitement aux ultrasons suivi d'une lyophilisation (Tableau 2).

Tableau 2 : Méthodes de récupération des particules sur les filtres de collecte

Type de particules	Filtre de collecte	Tampon de remise en suspension	Traitement utilisé	Auteurs
PM _{2,5}	quartz	Eau ultra pure	Ultrason et lyophilisation	(Geng <i>et al.</i> , 2005)
PM _{2,5} et PM ₁₀	téflon	Eau déionisée	Sonication, centrifugation à 1300 g x 10 min, le surnageant est lyophilisé et les particules du culot récupérées	(Soukup & Becker, 2001)
PM _{2,5}	nitrocellulose	Eau ultra pure	Sonication et lyophilisation	(Baulig <i>et al.</i> , 2004)

Les procédures décrites (Tableau 2) pour la récupération des particules sur filtres semblent être applicables à tous types de filtre mais en revanche il est difficile de connaître le pourcentage de récupération. Ce paramètre est cependant déterminant dans le choix du filtre utilisé.

1.1.1.3. Méthodes d'analyse des particules

1.1.1.3.1. Considérations générales

La taille des particules est une donnée essentielle car c'est elle qui va déterminer la capacité de la particule à se déposer plus ou moins en profondeur dans le système respiratoire. La concentration en particules dans l'air est aussi une donnée importante pour déterminer la nocivité d'une atmosphère. Dans certain cas, la morphologie est également une donnée non négligeable, c'est le cas pour les fibres d'amiantes qui sont des fibres fines et longues. Enfin, il faut également s'attacher à la composition des particules. Différentes analyses de particules peuvent révéler la présence de métaux, de sels, de matériaux carbonés, de Composés Organiques Volatiles (COV), d'HAP, d'endotoxines, etc. (Dagher *et al.*, 2006).

A la vue de cette diversité de composés, on comprend bien qu'il n'existe aucune méthode globale pour déterminer la composition d'un échantillon de particules. Cependant, l'utilisation de différentes techniques de détermination des composés organiques et minéraux a permis de bien définir les composés susceptibles d'être rencontrés sur une particule. En revanche, ce qui est moins connu, c'est la localisation des différentes substances sur la particule soit en surface soit à l'intérieur ; c'est-à-dire des données sur l'accessibilité de ces substances et donc leur capacité à interagir avec l'environnement (Masplet & Marchand, 2004).

1.1.1.3.2. Mesures physiques

Les mesures physiques concernent la masse, le nombre, la taille et la morphologie des particules :

- *Mesures de masses* : cette mesure a pour but de déterminer la concentration en particules par m³ d'air. Plusieurs méthodes existent comme les moniteurs Tapered Element Oscillating Microbalanced (TEOM) dont la détermination de la masse est basée sur le changement de fréquence d'un élément oscillant sur lequel se trouve le filtre. Il existe aussi des balances de précision placées sous atmosphère contrôlée en température et humidité pour peser les filtres (Person & Tymen, 2005).
- *Détermination du nombre de particules* : elle se fait entre autres avec un compteur de particules de condensation ou avec un compteur optique (qui peut également mesurer la taille). La première méthode s'effectue en trois étapes : 1) sursaturation d'une vapeur (eau, alcool, etc.), 2) grossissement des particules par condensation de cette vapeur, 3) détection des particules après croissance par une source lumineuse couplée à un photodétecteur. Cette méthode permet de compter des particules qui à la base font 3 nm (Person & Tymen, 2005).
- *Mesure de la taille des particules (granulométrie)* : pour ce paramètre, plusieurs techniques existent également, associant souvent la mesure de la taille au nombre de particules. La méthode inertielle permet par exemple de compter et de mesurer la distribution selon la taille de particules allant de 3 nm à 10 µm. L'échantillon, contenant les particules, passe dans un premier temps par un chargeur électrique puis pénètre dans un impacteur en cascade basse pression dont les étages sont électriquement isolés. Les particules chargées, collectées sur chaque plateau sont comptées en temps réel grâce à la mesure du courant électrique qu'elles produisent (Person & Tymen, 2005).
- *Détermination de la forme des particules* par microscopie électronique à balayage ou à transmission (Quisefit & Gaudichet, 1998).

1.1.1.3.3. Mesures chimiques

Contrairement à l'analyse de gaz, il n'existe pas de méthodes bien adaptées à l'analyse d'un aérosol (suspension de particules solides ou liquides dans un gaz). Les analyses sont différées dans le temps par rapport à la phase de collecte de l'échantillon, ce qui est limitant

en ce qui concerne les COV adsorbés. De plus, les analyses de la phase organique et de la phase minérale font appel à des techniques différentes.

Analyse de la matière organique. La matière organique est généralement extraite du filtre par ultrasons ou dans un Soxhlet par l'utilisation de solvants polaires ou non polaires avant d'être concentrée. L'échantillon est ensuite préparé en fonction de la méthode d'analyse. Deux méthodes sont principalement utilisées pour l'analyse (Masclat & Marchand, 2004) :

- *La Chromatographie en phase Gazeuse (GC)* souvent couplée avec un détecteur universel comme le **Détecteur à Ionisation de Flamme (FID)**. Plus spécifiquement, pour les composés soufrés on utilise un **Détecteur Photométrique de Flamme (FPD)** et pour les composés halogénés et pesticides un **Détecteur à Capture d'Electrons (ECD)**.
- *La Chromatographie en Phase Liquide Haute Performance (HPLC)* : par cette méthode, tous les composés organiques peuvent être séparés et analysés. Toutefois, en pratique elle est utilisée pour l'analyse des composés lourds. Du fait de la variété des détecteurs, il est possible de réaliser des analyses très spécifiques et très sensibles de la plupart des familles de composés. Par exemple, le spectromètre UV ou le spectromètre à fluorescence sont particulièrement sensibles lors de l'analyse des HAP.
- *La spectrométrie de masse couplant une source d'ionisation laser assistée par une matrice et un analyseur à temps de vol ou MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation – Time Of Flight mass spectrometry)* : l'échantillon, co-cristallisé avec une matrice, est placé sur une plaque métallique. La matrice absorbe à la longueur d'onde du laser pulsé (laser à azote). Celui-ci provoque le passage à l'état gazeux du complexe matrice-échantillon, ce qui conduit à la formation des ions dont le temps de vol va être mesuré dans le tube à temps de vol. La masse de l'ion est ainsi mesurée en fonction du temps que celui-ci met pour atteindre le détecteur. Ce temps est converti en masse sur charge (m/z).

Analyse des éléments inorganiques et des métaux. Les méthodes les plus utilisées sont (Masclat & Marchand, 2004) :

- *La Fluorescence X* : on dirige sur le filtre un faisceau émis par une cathode spécifiquement choisie pour l'analyse d'un élément. La mesure est rapide et permet ainsi de nombreuses analyses d'échantillons même peu chargés en matière. De plus,

cette méthode est non destructive et simple à réaliser car elle ne nécessite aucun traitement préalable du filtre.

- *L'analyse Particle-Induced X-ray Emission (PIXE) et activation neutronique* : méthodes proches de la fluorescence X, le filtre est bombardé par des protons (PIXE) ou des neutrons (activation neutronique) qui excitent les éléments et induisent un rayonnement X. Le rayonnement induit est mesuré.
- *La spectrométrie d'induction plasma* : contrairement aux précédentes méthodes celle-ci nécessite la destruction du filtre par un acide. Chaque élément absorbe sélectivement la lumière émise par la source et comme chaque élément est sa propre source d'émission, presque tous les éléments peuvent ainsi être analysés.

1.1.1.4. La réglementation

Afin d'aider les responsables politiques, l'OMS publie régulièrement des recommandations de seuils de concentrations. Ces seuils sont définis sur des critères sanitaires (aucun effet adverse sur la santé observé), fixés au regard des publications du moment, donc établie à l'aide de données scientifiques. Actuellement, le seuil de recommandation pour les $PM_{2,5}$ est de $10 \mu g/m^3$ de moyenne annuelle et de $25 \mu g/m^3$ de moyenne sur 24 heures (OMS, 2006).

Concernant les directives européennes, pour les PM_{10} , la Commission a donné deux valeurs limites à respecter : (1) Une concentration de $50 \mu g/m^3$, mesurée sur 24 heures; cette valeur ne doit pas être dépassée plus de 35 jours par an. (2) Une concentration de $40 \mu g/m^3$, mesurée sur une année ; aucun dépassement n'est autorisé. Pour les $PM_{2,5}$, en avril 2008 une commission a fixé des valeurs limites ainsi que des dates butoirs. Ainsi, les États membres seront tenus de réduire, d'ici à 2020, l'exposition aux $PM_{2,5}$ en zone urbaine de 20 % en moyenne par rapport aux chiffres de 2010. De plus, la Commission Européenne leur impose de ramener les niveaux d'exposition au-dessous de $20 \mu g/m^3$ d'ici 2015 dans ces zones. Sur l'ensemble de leur territoire, les États membres devront respecter le plafond de $25 \mu g/m^3$ fixé pour les $PM_{2,5}$. Cette valeur cible doit être atteinte en 2015 ou, dans la mesure du possible, dès 2010 (www.europa.eu).

En France, l'application des directives européennes concernant la pollution atmosphérique est retranscrite dans la LAURE (Loi sur l'Air et l'Utilisation Rationnelle de l'Energie). C'est une loi qui a été votée le 30 décembre 1996. Elle a pour objectif d'améliorer la qualité de l'air, en s'appuyant sur les connaissances concernant la pollution atmosphérique sur la santé et l'environnement. Pour ce faire, la loi vise notamment à intensifier la surveillance de la qualité de l'air en mettant en place les AASQA (Association Agréées de Surveillance de la Qualité de l'Air) qui doivent être présentes dans toutes les régions ou les villes de plus de 100 000 habitants. Cette loi insiste également sur le droit à l'information du public : l'information doit être meilleure, plus fréquente, plus simple. Ainsi, pour les agglomérations de plus de 50 000 habitants, les AASQA ont mis en place l'indice ATMO. Cet indice se base sur les valeurs de quatre polluants qui sont : SO₂, NO₂, O₃ et les particules en suspension. L'indice varie de 1 à 10, la valeur de 1 correspondant à un air d'excellente qualité, alors qu'une note de 10 qualifie un air d'une qualité exécrable. Le dernier point sur lequel insiste la LAURE est la mise en place de système de planification (PRQA, PPA et PDU)². Tous ces systèmes visent à diminuer et contrôler la qualité de l'air au niveau régional pour le PRQA, dans les agglomérations de plus de 250 000 habitants pour le PPA et dans les agglomérations de plus de 100 000 habitants pour les PDU en visant spécifiquement tout ce qui concerne les transports ([www. environnement.gouv.fr](http://www.environnement.gouv.fr)).

Le chantier 33 du Grenelle de l'Environnement sur « Air et Atmosphère » a conduit à un rapport (Richert, 2008) qui établit quelques constats intéressants sur la LAURE. Le bilan est très positif en ce qui concerne les AASQA. Par contre, le rapport note une certaine lenteur dans l'établissement des systèmes de planification qui a peut être empêché de s'attaquer aux nouveaux polluants prioritaires comme les particules fines. C'est pourquoi ce rapport, en plus de proposer la rédaction d'une nouvelle Loi sur l'Environnement Atmosphérique (LEA), insiste sur l'élaboration d'un « plan particules » permettant d'atteindre un objectif de 15 µg/m³ de particules fines (PM_{2,5}) dans l'air ambiant, valeur cible en 2010 et obligatoire en 2015.

² PRQA : Plan Régional pour la Qualité de l'Air ; PPA : Plan de Protection de l'Atmosphère ; PDU : Plan de Déplacement Urbain.

I.1.2. Impact de la pollution particulaire sur la santé

Les particules sont en suspension dans l'air que nous respirons, de ce fait, le système respiratoire est la principale voie d'entrée des particules dans l'organisme. Les poumons sont donc les organes les plus largement exposés. Toutefois, il ne s'agit pas d'une barrière ultime car les particules les plus fines peuvent également traverser l'épithélium pulmonaire et rejoindre le système sanguin. Les risques pour la santé sont donc essentiellement liés aux pathologies respiratoires mais aussi à des pathologies systémiques. Les études épidémiologiques ont en effet mis en évidence des effets significatifs de la pollution particulaire sur différentes pathologies. La toxicologie joue pour sa part un rôle essentiel dans la compréhension des effets biologiques. Elle implique des études *in vivo* et *in vitro* réalisées principalement sur les poumons et leurs cellules pulmonaires (Marano *et al.*, 2004).

I.1.2.1. Les études épidémiologiques

De nombreuses études épidémiologiques ont permis d'établir une relation entre pollution atmosphérique, notamment la pollution particulaire, ainsi que la mortalité et la morbidité chez l'homme. Ces études font apparaître des effets consécutifs à des épisodes d'exposition aiguë mais aussi des effets chroniques. Les études les plus significatives ont été réalisées aux Etats-Unis et concernent essentiellement l'effet des PM₁₀ qui étaient jusqu'en 1997 la seule référence métrologique de la pollution particulaire.

Ainsi, l'examen des admissions dans les hôpitaux de Chicago entre 1988 et 1993, ont révélé une corrélation entre épisodes de forte pollution particulaire et morbidité. Les auteurs ont déterminé qu'une augmentation de 10 µg/m³ de la quantité de PM₁₀ dans l'air entraîne des augmentations d'admissions pour cause de problèmes cardiaques (+1,27 %), d'obstruction pulmonaire (+1,45 %) et de pneumonies (+2,00 %) (Schwartz, 2001). Des observations comparables réalisées dans 10 villes des Etats-Unis durant 9 années établissent une corrélation entre les admissions pour pneumopathies et cardiopathies et la pollution particulaire (Zanobetti *et al.*, 2000a). De même en 2005, une étude a montré qu'un épisode de forte pollution atmosphérique (équivalent à +10 µg/m³ de PM₁₀) entraînerait une augmentation de 0,41 % de la mortalité, étude réalisée en analysant les données des hôpitaux de 90 villes des Etats-Unis (Dominici *et al.*, 2005). A propos des PM_{2,5}, il existe très peu d'études relatives à des expositions épisodiques. Cependant, une étude portant sur 9 grandes villes de Californie de 1999 à 2002 a montré une relation entre la mortalité journalière et une

augmentation de la concentration en $PM_{2,5}$. Les auteurs ont ainsi déterminé qu'une augmentation de la concentration en $PM_{2,5}$ sur deux jours, de $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$ entraîne une hausse de la mortalité journalière de 0,6 % (entraînée par des pneumopathies, cardiopathies ou encore diabètes) (Ostro *et al.*, 2006).

Concernant les effets chroniques, la morbidité (due à une accentuation de la progression de l'athérosclérose) est également affectée suite à de multiples épisodes de forte pollution atmosphérique (Kunzli *et al.*, 2005; Hoffmann *et al.*, 2007). Une étude à grande échelle basée sur le suivi de la mortalité de 8111 adultes (pendant 14 à 16 années) de 6 villes des Etats-Unis a montré un lien entre les niveaux d'exposition aux $PM_{2,5}$ et la mortalité cardio-pulmonaire ainsi que des déclenchements de cancer des poumons (Dockery *et al.*, 1993). L'équipe de Pope et collaborateurs (d'après Simkhovich *et al.* 2008), avec une étude portant sur près de 150 villes des Etats-Unis, a étudié la relation entre mortalité et qualité de l'air. Une des conclusions est la mise en évidence d'une corrélation entre la quantité de $PM_{2,5}$ présente dans l'air et la mortalité (Pope *et al.*, 1995; Laden *et al.*, 2006; Simkhovich *et al.*, 2008).

Certaines personnes sont davantage susceptibles de développer une pathologie liée à la pollution particulaire. En effet, les personnes présentant des troubles asthmatiques, des problèmes cardiaques ou une infection pulmonaire ont un risque deux fois plus élevé de morbidité lorsqu'elles sont exposées à des PM_{10} . Ces résultats sont issus d'une étude portant sur les causes d'admissions dans les hôpitaux de Chicago entre 1985 et 1994 (Zanobetti *et al.*, 2000b). L'analyse de ces mêmes admissions, montre également que les diabétiques, face à une augmentation de $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$ en PM_{10} présentent deux fois plus de risque d'être admis pour des problèmes cardiaques qu'une personne non diabétique (Zanobetti & Schwartz, 2001).

Un certain nombre d'études qui ont pour objectif d'élucider et de comprendre l'effet sur la santé des particules atmosphériques, ont été examinées dans un article de synthèse par Pope et Dockery (Pope & Dockery, 2006). Cet article permet d'apporter des éléments de réponses aux hypothèses relatives aux mécanismes physiopathologiques responsables des effets mentionnés ci-dessus.

1.1.2.2. L'appareil respiratoire et les pathologies respiratoires

1.1.2.2.1. Description de l'appareil respiratoire

L'appareil respiratoire est divisé en deux parties fonctionnelles : tout d'abord la partie proximale ou conductrice qui permet la circulation de l'air jusqu'aux sites d'échanges gazeux. Cette partie commence dans la cavité nasale et se poursuit jusqu'aux bronches secondaires. La partie distale ou respiratoire est le lieu des échanges gazeux, elle commence au niveau des bronches secondaires et se termine par les sacs alvéolaires (Figure 2).

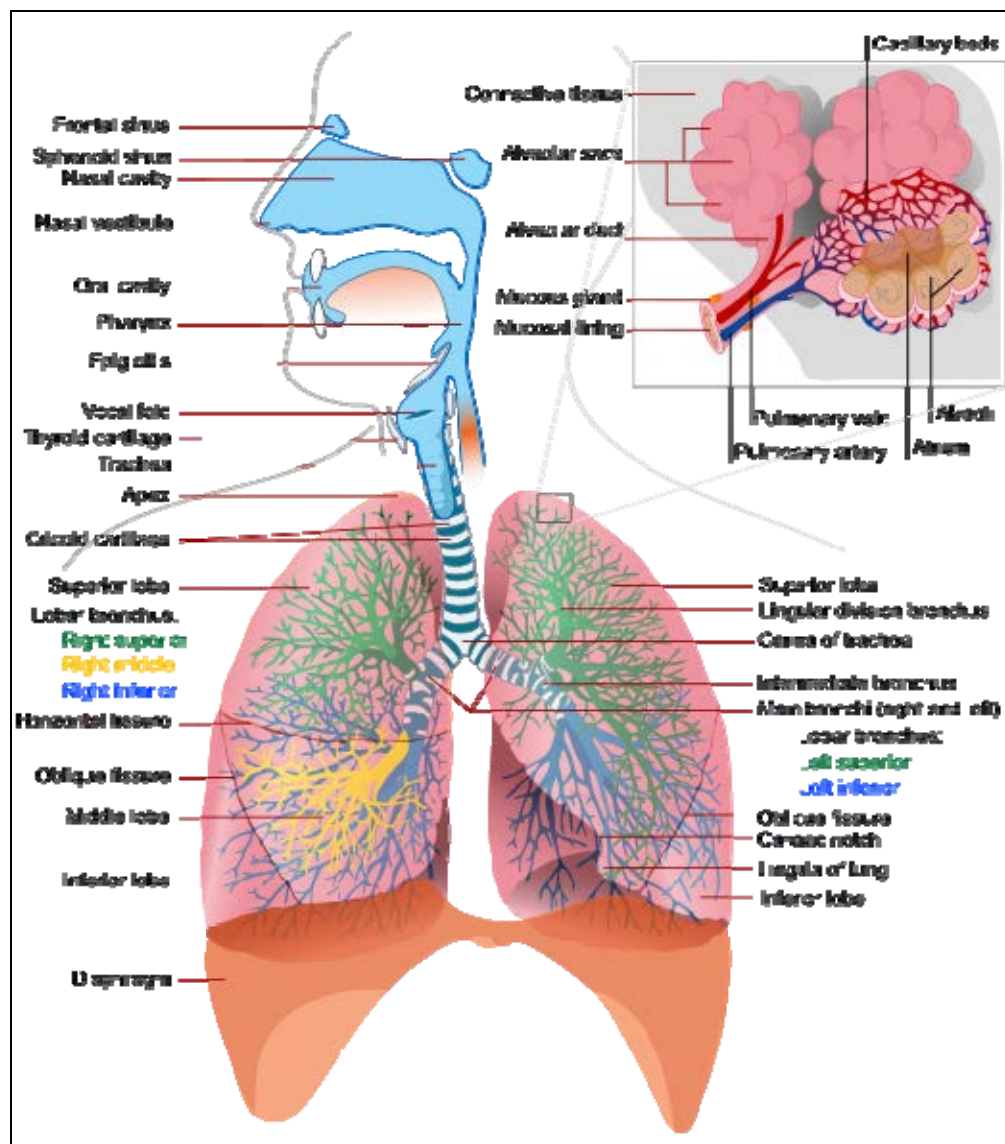


Figure 2 : Schéma de l'appareil respiratoire (www.dentalarticles.com)

Les poumons sont deux organes pairs de la cavité thoracique. Le renforcement dans le poumon gauche où est situé le cœur fait que le poumon droit est plus développé. Il possède d'ailleurs 3 lobes, au lieu de 2 lobes pour le poumon gauche. Au niveau des poumons, la trachée se sépare en deux branches appelées bronches primaires. Elles pénètrent ensuite dans les poumons par le hile et se divisent encore une fois en 3 branches pour le lobe droit et en 2 branches pour le lobe gauche. Ces branches se divisent alors en bronches secondaires et ce entre 23 et 25 fois chez l'homme : c'est l'arborisation pulmonaire. Les 16 premières divisions sont essentiellement dédiées à la conduction de l'air alors que les 7 dernières sont respiratoires et conduisent à des alvéoles pulmonaires. La surface totale d'échange est d'environ 100 m².

1.1.2.2.2. Pénétration des particules dans l'appareil respiratoire

Chaque jour, l'homme respire entre 10 et 20 m³ d'air, cet important volume emprunte le réseau des voies respiratoires décrit précédemment. Plus l'air s'engouffre profondément dans ce réseau, plus sa vitesse sera faible (Salvi & Holgate, 1999). Ainsi, le lieu de déposition des particules sera fonction de 5 mécanismes (Figure 3) :

- (1) impaction : l'air inspiré, à chaque bifurcation change brusquement de direction. Les particules ont alors tendance à continuer leur parcours et s'impactent sur les parois au niveau des bifurcations. Les zones de bifurcations sont donc des zones d'accumulation préférentielle. Toutefois, ce mécanisme concerne uniquement les particules d'un diamètre aérodynamique supérieur à 0,5 µm (Balashazy *et al.*, 2003).
- (2) sédimentation gravitationnelle : ce mécanisme touche toutes les tailles de particules. La particule, du fait de sa masse va sortir de l'écoulement pour sédimenter sur la paroi.
- (3) interception : lorsque la particule sans dévier de son chemin rencontre la paroi, à cause de sa dimension, de sa forme ou de son aspect fibreux.
- (4) diffusion brownienne : lorsque la vitesse de l'air est presque nulle, au niveau des bronchioles et des alvéoles pulmonaires, la trajectoire des particules devient aléatoire et dépend des collisions avec les molécules de gaz. Ce mécanisme touche les particules les plus fines avec un diamètre aérodynamique inférieur à 0,5 µm.
- (5) interaction électrostatique : ce phénomène existe en raison de la charge inverse présente sur les parois, mais uniquement pour des particules fortement chargées.

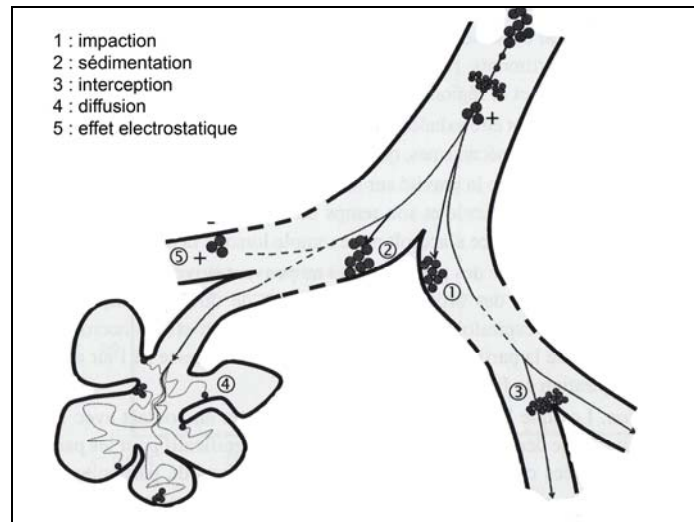


Figure 3 : Schéma des différents mécanismes de dépôts des particules inhalées dans les voies respiratoires (Hervé-Bazin, 2007)

Les recherches en matière de déposition de particules dans l'organisme montrent que la déposition est principalement fonction du diamètre aérodynamique de la particule (Figure 4).

Concernant des particules de l'ordre du μm , il a été montré que la déposition des particules dans les poumons semble inversement proportionnelle à la taille de la particule. En effet, des particules d'un diamètre moyen de $2,5 \mu\text{m}$, $8,2 \mu\text{m}$ et $11,5 \mu\text{m}$ sont retrouvées dans les poumons respectivement à 83 %, 49 % et 31 % (Anderson *et al.*, 1988). Cependant, la déposition varie selon le sujet et les mouvements respiratoires qui peuvent varier au cours d'un exercice par exemple (Daigle *et al.*, 2003). La déposition peut même être accrue si le sujet présente une obstruction pulmonaire (Kim & Kang, 1997).

Concernant les particules ultrafines, 90 % des particules inhalées de 1 nm se déposent dans la région nasopharyngée, 10 % dans la partie trachéobronchique et très peu dans les sacs alvéolaires. Au contraire, les particules de 20 nm se déposent majoritairement dans la région alvéolaire (50 %). Entre les deux, des particules de 5 nm, se déposent de façon équivalente dans ces 3 régions (Figure 4) (Oberdorster *et al.*, 2005).

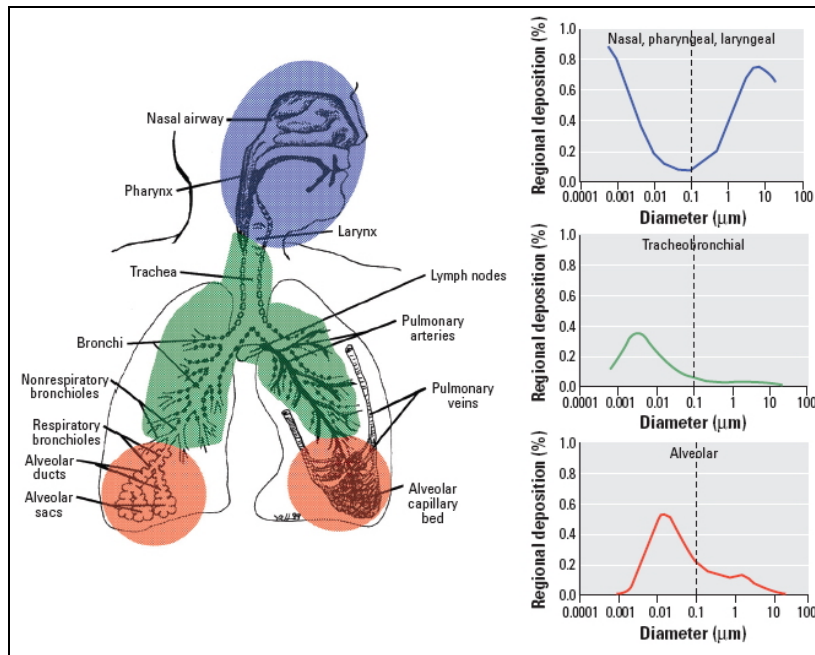


Figure 4 : Zones de déposition préférentielle des particules en fonction de leur taille au niveau de la zone nasopharyngée, trachéobronchique et alvéolaire (Oberdorster *et al.*, 2005)

1.1.2.2.3. Pathologies

Les particules peuvent être responsables de pathologies respiratoires que l'on classe en deux groupes :

- Les pathologies respiratoires aiguës qui se déclenchent en raison d'une action toxique directe ou qui sont dues à une inflammation.
- Les pathologies respiratoires chroniques rassemblant les pathologies dues aux phénomènes de rétention pulmonaire ou de persistance de l'inflammation ainsi que les processus de cancérogenèse.

La pathologie pulmonaire la plus répandue en France est la broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO). Les symptômes de ce type de pathologies sont la réduction du diamètre des voies aériennes, l'air circule moins efficacement et en moins grande quantité, ce qui conduit rapidement à l'essoufflement. Chaque année, ce sont quelques 150 000 personnes qui décèdent suite à ces complications. C'est le tabac qui est responsable dans 90 % des cas, cependant, la pollution atmosphérique particulière semble exacerber cette pathologie (MacNee & Donaldson, 2000).

Une autre pathologie respiratoire chronique pouvant être induite par les particules est l'asthme. Les particules, notamment les PM₁₀ sont également responsables de l'aggravation des symptômes de l'asthme du fait de leur capacité à entraîner une inflammation et à produire un stress oxydant (MacNee & Donaldson, 2000; Long *et al.*, 2005). L'asthme est une maladie qui touche près de 300 millions de personnes dans le monde, plus de 220 000 personnes meurent chaque année de ses complications. L'asthme est une maladie inflammatoire qui touche les bronches, les symptômes sont : une inflammation et la formation d'œdème au niveau de l'épithélium bronchique, une contraction des muscles lisses bronchiques et une hypersécrétion de mucus. Cette affection est en constante augmentation d'après l'OMS. L'hypothèse de l'implication de la pollution particulaire dans ce phénomène a été avancée.

La pollution, et plus particulièrement la pollution particulaire, pourrait favoriser l'apparition de cancers broncho-pulmonaires primitifs bien que la cause la plus importante en soit le tabagisme (Balashazy *et al.*, 2003). De plus, les données d'une étude réalisée par l'ACS (American Cancer Society) sur 1,2 millions d'adultes en 1982 *via* un questionnaire visant à identifier les facteurs de risques, a permis de montrer une corrélation entre des expositions prolongées à des particules fines et des cancers du poumon (Pope *et al.*, 2002). De plus, en 2004 l'équipe de Harrison, en se basant sur cette même étude, a suggéré qu'il était possible que ces cancers soient dus à la présence de molécules reconnues comme carcinogènes (As, Ni, Cr et HAP) sur les PM_{2,5}. Cependant, Elle émet aussi l'hypothèse que les PM_{2,5}, indépendamment de leurs compositions, pourraient entraîner des cancers du poumon (Harrison *et al.*, 2004).

1.1.2.3. Les pathologies cardiovasculaires

De nombreuses publications montrent que la pollution particulaire peut modifier le fonctionnement de l'appareil cardiovasculaire (Brook *et al.*, 2004; Pope & Dockery, 2006).

Ainsi, un épisode d'augmentation de la concentration en particules peut entraîner un changement du rythme cardiaque, un rythme cardiaque variable ou une modification du tonus vasculaire (Zanobetti *et al.*, 2004; O'Neill *et al.*, 2005; Simkhovich *et al.*, 2008). Par exemple, l'équipe de Gold en 2000 a montré, chez des personnes d'une maison de retraite de Boston, une diminution du rythme cardiaque suite à une exposition de 15,5 µg/m³ de PM_{2,5} (Gold *et*

al., 2000). Au contraire, une concentration importante en PM₁₀ (100 µg/m³) accélère le rythme cardiaque de 5 à 10 pulsations par minute (Pope *et al.*, 2004).

Sur le long terme, la pollution particulaire peut entraîner une accélération de la progression de l'athérosclérose (Hoffmann *et al.*, 2007).

Contrairement aux pathologies pulmonaires, les mécanismes et/ou voies d'actions liés aux pathologies cardiovasculaires restent encore très incertains. Deux possibilités sont proposées : (1) une action directe des particules ultrafines par passage dans le système circulatoire sanguin ; elles peuvent alors atteindre le cœur, (2) une action indirecte consécutive au phénomène inflammatoire de l'épithélium pulmonaire, conduisant à la sécrétion de cytokines, de médiateurs du stress oxydant et/ou la diffusion des composés solubles des particules (Brook, 2008; Simkhovich *et al.*, 2008).

I.1.3. Cellules cibles et atteintes cellulaires

I.1.3.1. Les cellules pulmonaires épithéliales

L'appareil respiratoire, des fosses nasales jusqu'aux premières bronchioles, est tapissé d'un épithélium cylindrique pseudostratifié composé de cellules ciliées, de cellules sécrétrices et de cellules basales. Les cellules ciliées sont les plus abondantes. Cependant, leur proportion est très variable selon la zone de l'appareil respiratoire considérée. Ces cellules sont munies de cils, qui, en battant, entraînent le mouvement de la couche de mucus superficielle en direction du nasopharynx. Les cellules calciformes, également réparties tout le long de l'appareil respiratoire, sécrètent le mucus qui va être entraîné par les cellules ciliées. Ces cellules, abondantes dans la trachée et les bronches, sont remplacées par les cellules de Clara dans les bronchioles. Les cellules de Clara sont également des cellules sécrétrices mais elles participent en plus à la métabolisation des xénobiotiques et à la production des composés du surfactant (Jeffery & Li, 1997).

Les particules qui se déposent (celles comprises entre 3 et 10 µm) au niveau de l'appareil respiratoire supérieur (nasopharynx, trachée et bronche), sont pour majorité entraînées par le mucus et le battement des cils vers le larynx afin de permettre leur

expectoration ou bien leur déglutition. Cependant, il a été montré qu'une partie de ces particules sont susceptibles de pénétrer dans l'épithélium des voies respiratoires supérieures (Churg *et al.*, 1990).

Les cellules pulmonaires épithéliales sont donc susceptibles d'être en contact avec les particules atmosphériques. Les effets de ces dernières sur ce type cellulaire ont été étudiés par des approches *in vitro* (Baulig *et al.*, 2003; Baulig *et al.*, 2004). Par exemple, une étude *in vitro*, sur des cellules épithéliales humaines L132 en culture exposées à des PM_{2,5} récoltées en 2000 à Dunkerque, a mis en évidence, pour des durées d'expositions courtes, la mise en place d'une réponse inflammatoire (sécrétion de cytokines pro-inflammatoires) et une cytotoxicité constatée par une augmentation de la libération de LDH (Lactate déshydrogénase) dans le milieu de culture (Dagher *et al.*, 2005). Cette équipe a montré par ailleurs l'occurrence d'un phénomène d'apoptose entraîné par l'exposition aux PM_{2,5}, en mesurant les variations du taux de transcription du gène p53 (Dagher *et al.*, 2006).

1.1.3.2. Les cellules des alvéoles pulmonaires

L'épithélium présent dans les alvéoles pulmonaires présente une paroi continue comme l'épithélium de voies supérieures à la différence près, que les cellules tapissant les alvéoles sont considérablement amincies. Les cellules épithéliales sont de deux types : les pneumocytes de types I ou pneumocytes membraneux. Ces cellules représentent 40 % en nombre des pneumocytes mais tapissent 90 % de la surface des alvéoles. Les pneumocytes de type II représentent 60 % de la population des pneumocytes, mais recouvrent uniquement 10 % de l'alvéole. Ce sont des cellules arrondies, voir cubiques, qui vont sécréter le surfactant qui recouvre la paroi de l'alvéole. Churg et Brauer en 1997 ont montré à l'aide de coupe de poumons observées au microscope électronique que les particules les plus fines (inférieure à 3 µm) qui atteignent les alvéoles pulmonaires peuvent pénétrer le parenchyme (Churg & Brauer, 1997). En cas de surcharge en particules et/ou défaillance du mécanisme de clairance, les pneumocytes peuvent également phagocyter les particules à la manière des macrophages alvéolaires (Boland *et al.*, 1999).

Les macrophages alvéolaires, cellules libres à la surface de l'épithélium pulmonaire, sont les principaux acteurs de la défense non spécifique des poumons et un élément essentiel de l'activation du système immunitaire des poumons face à un xénobiotique. Cette activation

est réalisée grâce à la production/sécrétion de cytokines qui ont un rôle crucial dans le processus inflammatoire (Refsnes *et al.*, 2006). Du fait de leur capacité de phagocytose, ces cellules contiennent souvent des particules inhalées mais aussi des fragments de bactéries entraînant des réactions cytosoliques (Hiura *et al.*, 1999). Une fois chargées en déchets, elles peuvent rejoindre les bronchioles pour être évacuées via le transport mucociliaire ou alors migrer vers les vaisseaux lymphatiques via l'interstitium.

Concernant les atteintes cellulaires, des expositions à des particules fines (collectées de janvier à mars 2004 à Aquila, Italie) montrent des effets génotoxiques sur la lignée cellulaire macrophagique RAW 264.7. En effet des concentrations de 1, 3 et 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (2,2, 6,6 et 22 $\mu\text{g}/\text{mL}$) induisent la formation de micronoyaux de façon dose-dépendante. Cette même étude montre qu'il y a une diminution de la prolifération cellulaire, toujours de manière dose-dépendante (Poma *et al.*, 2006). De plus, les fonctions des macrophages peuvent être altérées. En effet, des macrophages de rat Wistar récupérés (par lavage broncho alvéolaire) après 18 heures d'exposition à des PM_{10} (125 et 250 $\mu\text{g}/\text{m}^3$) montrent une capacité de migration amoindrie donc une efficacité diminuée (Barlow *et al.*, 2008).

I.2. Réponse inflammatoire et effets des particules

Lorsqu'un pathogène pénètre dans l'organisme, il est rapidement éliminé par les phagocytes en place. Cependant, si le pathogène est présent en trop grande quantité ou si il y a des dommages tissulaires, des processus se mettent en place afin de le contenir et de l'éliminer. Un de ces processus majeur est la réponse inflammatoire. L'inflammation est une réponse biologique complexe de type défense immunitaire stéréotypée de l'organisme face à une agression par : (1) un agent pathogène exogène qui peut être infectieux, de type biochimique, une atteinte physique ou chimique, (2) un agent endogène (cellules endommagées).

Les particules sont des agents pathogènes exogènes qui en fonction de leur diamètre aérodynamique, sont capables de pénétrer plus ou moins profondément dans le système respiratoire et de se déposer au contact de l'épithélium qui tapisse ces cavités. Les particules, en temps normal, sont éliminées régulièrement par le phénomène de clairance pulmonaire. Toutefois, en cas de dysfonctionnement de ces systèmes de défenses et/ou en cas d'un épisode de forte concentration en particules, celles-ci peuvent s'accumuler localement. Cette accumulation va déclencher une réaction inflammatoire locale, contrôlée par l'interaction de nombreux médiateurs, qui peut s'étendre au niveau systémique et entraîner les pathologies précédemment citées. De plus, la présence des particules peut entraîner une modulation de la réponse immunitaire vis-à-vis d'un agent pathogène. Ainsi, on peu distinguer deux types d'action potentielle des particules sur la réponse inflammatoire : (1) une action directe en tant qu'agent pathogène exogène (2) une action indirecte en tant que modulateur de la réponse inflammatoire.

I.2.1. La réaction inflammatoire

I.2.1.1. Déroulement de la réaction inflammatoire

L'effet principal de la réaction inflammatoire, que ce soit au niveau pulmonaire ou dans toute autre partie vascularisée de l'organisme, est d'amener les phagocytes sur le lieu de l'inflammation. La mobilisation des phagocytes circulants (polynucléaires neutrophiles, monocytes et macrophages) a lieu lors de la phase vasculo-sanguine qui se déroule comme suit :

- **Congestion active** : vasodilatation artérielle et dilatation des capillaires par un mécanisme nerveux et la sécrétion d'amines vasoactives (histamine, sérotonine) par les mastocytes et les basophiles qui entraînent une augmentation du débit sanguin.
- **Formation d'un œdème inflammatoire** : observation d'une augmentation locale de la pression hydrostatique qui permet le passage de plasma dans le milieu interstitiel et la formation de l'œdème. L'œdème permet une dilution du foyer inflammatoire, la limitation du foyer par une barrière fibrineuse et un ralentissement local du courant circulatoire qui facilite le passage des phagocytes du flux circulatoire au foyer de l'inflammation.
- **Diapédèse** : à la surface des cellules épithéliales on observe, du fait, de l'action de médiateurs chimiques (cytokines pro-inflammatoires telles que l'interleukine 1, IL-1, notamment) l'expression de molécules d'adhésion (sélectine, ICAM-1 (Inter-Cellular Adhesion Molecule 1)). Ces molécules permettent l'adhésion des phagocytes mobilisés arrivant par le flux circulant avant la traversée des parois vasculaires par diapédèse.

A la phase précoce de la réaction inflammatoire, les cellules mobilisées le plus rapidement, donc prédominantes, sont les polynucléaires neutrophiles alors que les macrophages sont présents plus tardivement. Ces cellules phagocytent les pathogènes qu'ils soient endo- ou exogènes ce qui permet par la suite leur élimination. Dans le cas d'une inflammation pulmonaire, les phagocytes chargés en particules sont éliminés par le phénomène de clairance pulmonaire (Bevilacqua *et al.*, 1994; Baulig, 2004a).

I.2.1.2. La réaction inflammatoire pulmonaire

Au niveau pulmonaire, la réaction inflammatoire peut être due au fait que les particules fines peuvent pénétrer jusqu'aux bronches et aux alvéoles (Baulig, 2004b). Celle-ci va se traduire par (Figure 5) :

- (1) une contraction des muscles lisses (congestion active),
- (2) une sécrétion en excès de mucus,
- (3) la contraction des muscles lisses qui favorise l'arrivée massive de cellules du système immunitaire dans le tissu pulmonaire par diapédèse,
- (4) la formation de l'œdème inflammatoire qui provoque un renflement localisé,
- (5) le renflement réduit alors le diamètre du tube bronchique.

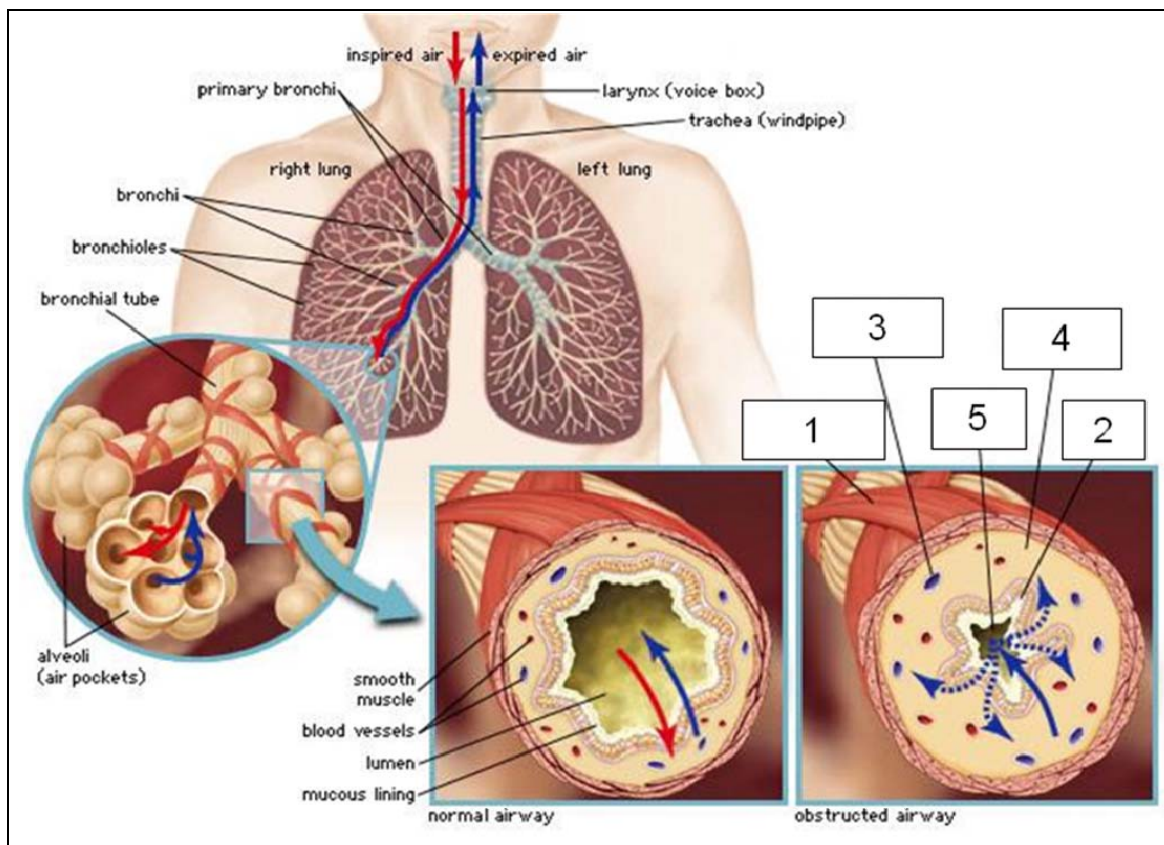


Figure 5 : La réaction inflammatoire au niveau pulmonaire (d'après Encyclopaedia Britannica, Inc.)

Ce phénomène physiologique complexe est induit et entretenu par de nombreux médiateurs sécrétés par les cellules du système immunitaire, à savoir : les macrophages alvéolaires et les cellules immunitaires du système circulatoire.

I.2.1.3. Les médiateurs de l'inflammation

La réponse inflammatoire implique l'interaction de nombreux médiateurs. Ces médiateurs ont soit une action synergique qui a pour effet d'amplifier la réaction, soit une action antagoniste qui freine la réaction. Ces médiateurs sont classés en trois groupes :

- **Médiateurs d'origine cellulaire locale** : amines biogènes (sérotonine et histamine) nécessaires à la vasodilatation mais aussi des médiateurs d'origines lipidiques dérivés de l'acide arachidonique (prostaglandines, thromboxanes et leucotriènes).
- **Médiateurs d'origine plasmatique** : produits du complément (C3b, une opsonine ; C5b-9, complexe d'attaque membranaire) et facteur de coagulation (fibrine).
- **Médiateurs d'origine cellulaire** : cette classe concerne essentiellement les cytokines que nous avons étudié dans le cadre de ce travail. Les cytokines jouent un rôle essentiel dans les interactions entre les cellules.

En conséquence, les cellules des tissus lésés produisent entre autres de l'histamine, de la sérotonine et des prostaglandines. Ces molécules sont à l'origine de la production en cascade de médiateurs indispensables à la mise en place et à l'entretien de l'inflammation. L'IL-1 et le facteur de nécrose tumorale (TNF- α) ont un rôle essentiel au cours d'une inflammation d'origine microbienne. Les macrophages et les polynucléaires recrutés grâce aux médiateurs chimiotactiques (leucotriènes, IL-8) éliminent les pathogènes. La réponse inflammatoire initie aussi le processus de cicatrisation tissulaire par le jeu de médiateurs.

A l'opposé, d'autres facteurs permettant de limiter l'action des médiateurs pro-inflammatoires sont produits. Ces médiateurs anti-inflammatoires sont : d'autres cytokines (IL-10, IL-4), des antagonistes de récepteurs membranaires des cytokines (tel que l'antagoniste du récepteur de l'IL-1), ou des formes solubles de récepteurs des cytokines (Baulig, 2004b).

I.2.2. Les cytokines

I.2.2.1. Les familles de cytokines

Les cytokines sont des glycoprotéines de faibles poids moléculaire (8 à 50 kDa), solubles ou membranaires, qui permettent la communication entre les cellules participant aux divers processus physiologiques (prolifération, différenciation cellulaire, activation cellulaire et apoptose). Les cytokines peuvent être classées en 5 catégories selon leurs fonctions ou les types cellulaires capables de les sécréter :

- **Les Interleukines (IL-)** : elles sont sécrétées par les leucocytes, celles sécrétées par les lymphocytes sont nommées lymphokines et celles sécrétées par les monocytes ou les macrophages sont appelées monokines. Actuellement 35 interleukines ont été identifiées (Gadina *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2006; Niedbala *et al.*, 2007). Les fonctions de quelques une d'entres elles seront précisées au I.2.2.5.
- **Les Interférons (IFN-)** : au nombre de 4 (IFN- α , β , γ et ω), on leur prêtait initialement un rôle uniquement antiviral. Les interférons jouent un rôle dans l'immuno-modulation dans la mesure où ils peuvent inhiber ou induire la production d'anticorps par les lymphocytes B mais également activer les macrophages, les cellules NK (Natural Killer) et les lymphocytes T en participant au processus de présentation de l'antigène (Decker *et al.*, 2002).
- **Les chemokines** : généralement se sont des cytokines de faibles poids moléculaires. La nomenclature est basée sur le nombre de cystéine, mais aussi leur espacement dans l'enchaînement des acides aminés constituant la chemokine (CC-L1 à CC-L28, CXC-L1 à CXC-L16, XC-L1 & 2, CX3C-L1). Elles ont en commun d'avoir un pouvoir chimiotactique et la capacité d'activer les cellules de l'inflammation (Murphy *et al.*, 2000).
- **Facteurs stimulants les colonies (CSF)** : stimulent la prolifération mais jouent aussi un rôle dans l'hématopoïèse. Le granulocyte CSF (G-CSF) est par exemple spécifique à la prolifération et à la différenciation de cellules souches qui donneront des granulocytes. De même, le macrophage CSF (M-CSF) active la différenciation des cellules souches en macrophages (Burgess & Metcalf, 1980; Hamilton, 2008).
- **Facteur de nécrose tumorale (TNF- α et TNF- β)** : sont des cytokines impliquées dans l'inflammation systémique et dans la réaction inflammatoire de phase aiguë (Bazzoni & Beutler, 1996; Tracey *et al.*, 2008).

Bien que les cytokines remplissent un nombre important de fonctions différentes, elles présentent un grand nombre de caractéristiques communes.

I.2.2.2. Caractéristiques générales des cytokines

Certaines de ces molécules sont produites constitutivement (IL-7, CCL19), mais la plupart le sont souvent à l'issue d'une activation cellulaire par l'antigène ou la substance mitogène. Dans ce cas, les cytokines sont synthétisées *de novo* et leur production passe nécessairement par la synthèse d'ARN. Une fois synthétisées, elles sont rapidement sécrétées par la cellule. Ainsi, leur mode d'action peut être autocrine (action sur les cellules sécrétrices elles-mêmes), paracrine (action locale sur d'autres cellules) tandis que les cytokines endocrines peuvent emprunter les systèmes circulatoires et agir sur des cellules éloignées (Miyajima *et al.*, 1992). De plus, les cytokines agissent rarement seules, mais de manière conjointe avec d'autres. Leur mode d'action peut être : (1) additif, une cytokine va venir renforcer l'action d'une autre, (2) synergique, l'effet d'une cytokine va être de multiplier l'effet d'une première cytokine et enfin (3) antagoniste, une cytokine va venir inhiber l'effet d'une autre (Matsumoto & Kanmatsuse, 2000; Foster, 2001).

Ces différents modes d'action sont à l'origine d'un réseau de communication intercellulaire qui conduit souvent à une production en cascade. L'illustration parfaite de ce réseau de communication, qui est également une des principales caractéristiques des cytokines, est la double ubiquité de ce type de molécule. Au niveau des cellules productrices, une même cytokine peut être produite par différents types cellulaires et une cellule peut produire différentes cytokines. D'autre part, au niveau des cellules cibles, les cytokines sont capables d'induire différents effets biologiques sur des types cellulaires distincts, c'est la pléiotropie (Paris *et al.*, 1988; Sun *et al.*, 1999; Foster, 2001). Par exemple, l'IL-4 produite par les lymphocytes T Helper activés stimule la prolifération des lymphocytes B et des mastocytes. Au contraire, plusieurs cytokines peuvent avoir le même effet biologique sur un même type cellulaire, c'est la redondance. Le pléiotropisme et la redondance sont illustrés (Figure 6) avec pour principale cellule productrice de cytokines, un macrophage.

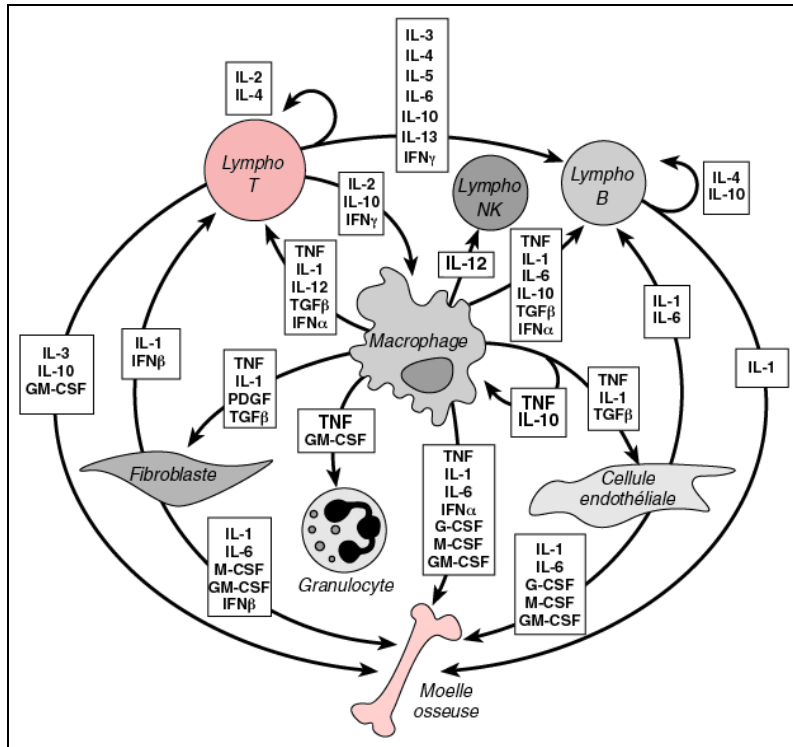


Figure 6 : Pléiotropisme et redondance des cytokines (Chatenoud & Dy, 2002)

I.2.2.3. Les récepteurs des cytokines

Le mécanisme d'action des cytokines sur les cellules cibles est comparable à celui des hormones peptidiques. En se fixant à des récepteurs membranaires spécifiques, une activation de seconds messagers intracellulaires se produit suivie de l'induction d'une chaîne de réactions biochimiques qui aboutit à l'effet attendu de la cytokine. Les récepteurs aux cytokines sont des glycoprotéines transmembranaires constituées d'un domaine extracellulaire (NH₂ terminal), d'un domaine transmembranaire hydrophobe unique (sauf pour les récepteurs des chémokines qui en possèdent 7) et un domaine intracytoplasmique de longueur variable.

La plupart des récepteurs ne possèdent pas d'activité kinase propre qui permet de transduire les signaux d'activation. L'intervention de kinases intracytoplasmiques est alors indispensable pour traduire l'effet de la cytokine considérée. Les kinases de la famille des JAK-STAT (Janus Kinases and Signal Transducers and Activators of Transcription) jouent un rôle majeur dans la chaîne de phosphorylation de transduction du signal (Foster, 2001; O'Shea *et al.*, 2002; Schroder *et al.*, 2004).

1.2.2.4. Les macrophages : un rôle central

Les macrophages sont des cellules différenciées des monocytes, eux même dérivés des cellules de la moelle osseuse. Ce sont des cellules hétérogènes, du fait des mécanismes qui gouvernent leur différenciation, mais aussi du fait de leur distribution dans les tissus et leur capacité de réponse à un stimulus (Gordon, 2003; Russell, 2007). Par exemple, dans les poumons, les macrophages alvéolaires sont continuellement exposés aux différentes substances inhalées (des particules notamment). Ainsi, leur état de quiescence (faible production de cytokines inflammatoires, capacité de phagocytose réduite par une diminution de leur nombre de récepteurs CD11b) permet d'éviter des dommages collatéraux envers les cellules épithéliales des alvéoles en réponse aux innombrables antigènes présents (Lambrecht, 2006).

Les macrophages polarisés sont classés en deux groupes : les macrophages M1 et les macrophages M2. Les macrophages M1 sont classiquement décrits comme répondant à deux types de signaux : les cytokines de type Th1 de l'inflammation (IL-1, IL-2, IFN- γ , IL-12, TNF- α) et des composés microbiens. Ils induisent une réponse de type cellulaire, à tendance pro-inflammatoire et sont bactéricides (Ma *et al.*, 2003). Les macrophages M2 jouent quand à eux un rôle important dans l'inflammation et produisent des médiateurs anti-inflammatoires jouant un rôle d'immuno-modulateur. Au contraire du type M1, ils sont très peu bactéricides et activé par les cytokines de type Th2 (Ma *et al.*, 2003). Suivant la molécule d'activation, il existe divers types de macrophage M2 : M2a induit par l'IL-4 et l'IL-13, M2b induit par des complexes immuns et les agonistes des récepteurs à l'IL-1 et les M2c induit par l'IL-10 et les hormones glucocorticoïdes (Mantovani *et al.*, 2004; Stout & Suttles, 2004; Porcheray *et al.*, 2005; Benoit *et al.*, 2008).

Plus généralement, les macrophages en tant que cellules phagocytaires participent à toutes les phases de la réponse immunitaire. Un des principaux rôles des macrophages, hors inflammation, est l'élimination des corps nécrotiques, de cellules apoptotiques, des particules et autres débris pathogènes notamment dans les poumons par phagocytose ou sécrétion de molécules bactéricides (Figure 6), c'est l'immunité innée. En cas d'un surnombre de pathogènes, les macrophages sont capables de recruter les phagocytes circulants par la sécrétion d'IL-8 et d'autres molécules de l'inflammation conduisant au déclenchement de ce phénomène (Foster, 2001). De plus, les macrophages constituent un lien important entre

l'immunité innée et l'immunité adaptative (ou spécifique) de part leur capacité, après avoir digéré un pathogène, à se comporter comme une cellule présentatrice de l'antigène. Ainsi, le macrophage est capable de stimuler les lymphocytes T spécifique (Figure 7) déclenchant une réponse immunitaire spécifique (Mosser, 2003; Benoit *et al.*, 2008).

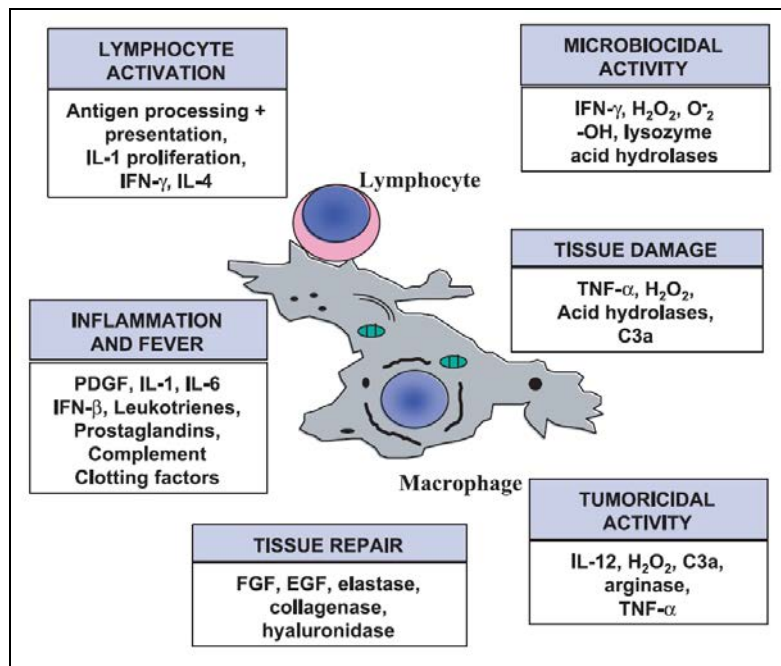


Figure 7 : Interaction entre l'antigène et le macrophage dans l'initiation et la médiation de l'inflammation ainsi que la réparation tissulaire (Foster, 2001)

L'ensemble de ces phénomènes est sous-tendu par la capacité des macrophages à sécréter une grande quantité de cytokines à action autocrine, paracrine et endocrine qui vont activer différents types cellulaires. Certaines de ces cytokines sont sécrétées constitutivement alors que d'autres sont produites après activation du macrophage (Nathan, 1987). La complexité des modes d'action et de régulation de ces différentes cytokines s'illustre par le pléiotropisme et la redondance (Figure 6).

L'interaction des pathogènes, comme les lipopolysaccharides (LPS), avec la membrane cytoplasmique des macrophages implique des récepteurs membranaires dits Toll-Like récepteur (TLR). Le LPS, utilisé dans notre étude comme inducteur d'une réponse immunitaire, est un composant de la paroi des bactéries Gram négatif. Il appartient à un ensemble de composés qualifiés de PAMPs (Pathogen-Associated Molecular Patterns), motifs moléculaires conservés chez les pathogènes, induisant la sécrétion de cytokines de l'inflammation (Baumann & Gauldie, 1994; Heinrich *et al.*, 2003). Le LPS agit sur les TLR et

plus particulièrement sur le TLR-4 qui lui est spécifique (Raetz & Whitfield, 2002). Les TLR sont une famille de récepteurs qui interviennent dans les mécanismes de l'immunité innée. La structure d'un TLR est composée de trois parties : 1) un domaine extracellulaire de liaison avec le PAMP 2) un domaine transmembranaire 3) un domaine intracellulaire qui permet la transduction du signal par la voie du NF- κ B (facteur de transcription impliqué dans la réponse inflammatoire) et des MAPKs (sérine/thréonine kinase activée très rapidement dans les cellules en réponse à une grande variété de signaux extracellulaires induisant une différenciation ou une prolifération cellulaire) notamment (Raetz & Whitfield, 2002; Akira & Takeda, 2004). L'activation du TLR-4 et la cascade de signalisation passant par les voies du facteur de transcription NF- κ B et des MAPKs entraîne la synthèse (facteur de transcription du NF- κ B et de l'AP-1) puis la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 β , l'IL-8, l'IL-6 et le TNF- α (Rietschel *et al.*, 1996; Kawai & Akira, 2006) (Figure 8).

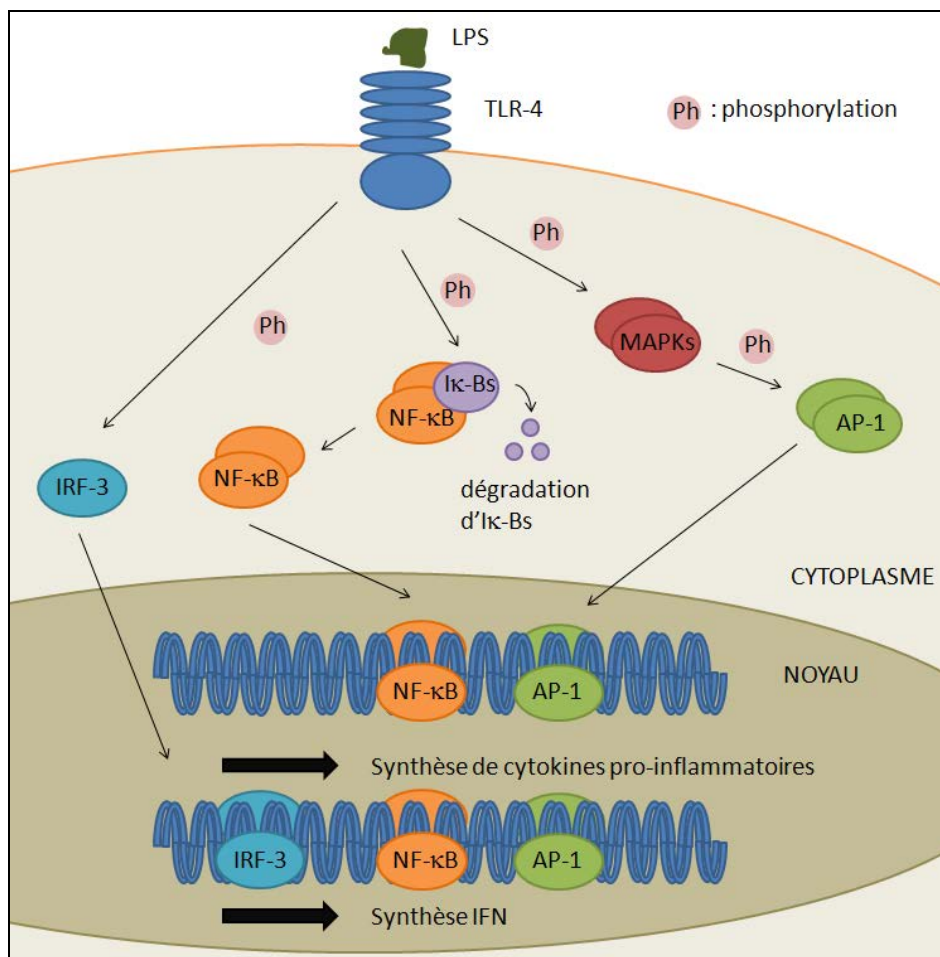


Figure 8 : Voies de transduction du TLR-4. En réponse à des LPS, la transduction du signal passe par l'activation des voies du NF- κ B et des MAPK qui induit la synthèse de cytokines pro-inflammatoires. L'activation de la voie IRF-3 (Interferon Regulatory Factor) en plus de ces 2 voies, est indispensable à la synthèse des IFN de type I, l'IFN- β notamment, d'après Kawai & Akira (2006).

I.2.2.5. Cytokines d'intérêts

Dans le cadre de ce travail, 6 cytokines ont été mesurées : l'IL-1 β , l'IL-8, le TNF- α , l'IL-6, l'IL-12 et l'IL-10 du fait de leurs rôles dans le processus inflammatoire.

L'IL-1 β est une cytokine pro-inflammatoire souvent considérée comme une molécule d'alarme. Elle est rapidement produite par les macrophages en réponse à un stimulus et induit l'expression de nombreux gènes aboutissant à la synthèse de protéines qui participent à l'induction de l'inflammation (Dinarello, 2002).

L'IL-8 est un médiateur indispensable de l'activité inflammatoire des neutrophiles du fait de son rôle de chimioattracteur. De plus, l'IL-8 intervient dans les pathogénèses liées à l'inflammation des voies respiratoires (Mukaida, 2003).

Le TNF- α est une cytokine qui participe à la phase aiguë de l'inflammation, en effet, elle stimule la phagocytose des macrophages mais aussi la production d'IL-1 et de lipides pro-inflammatoires comme les prostaglandines (Tracey & Cerami, 1993; Tracey *et al.*, 2008).

L'IL-6 est une cytokine pro-inflammatoire qui intervient lors de la phase aiguë de l'inflammation (fièvre, mobilisation des leucocytes) (Heinrich *et al.*, 1990) ; cependant elle intervient également comme une cytokine anti-inflammatoire dans la mesure où elle a un effet inhibiteur sur l'action de l'IL-1 et du TNF- α qui sont des cytokines pro-inflammatoires (Tilg *et al.*, 1994).

L'IL-12 est une cytokine sécrétée en réponse à un antigène bactérien et induit la sécrétion d'autres cytokines inflammatoires comme l'IFN- γ (Trinchieri, 1995). A l'opposé, l'IL-10 est un puissant inhibiteur des fonctions des monocytes/macrophages, inhibant la sécrétion de nombreuses cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 β et l'IL-8 ; c'est pourquoi l'IL-10 est souvent qualifiée de cytokine anti-inflammatoire (Chung, 2001; Mege *et al.*, 2006).

I.2.2.5.1. L'interleukine 1

C'est une cytokine de 159 acides aminés (AA) ou 153 AA (17 kDa) (forme mature) suivant que l'on considère sa forme moléculaire α ou β . L'homologie de ces deux formes au niveau de leur séquence d'AA est assez faible (26 %). Cependant, malgré cette faible homologie de séquence, l'IL-1 α et l'IL-1 β se lient aux mêmes récepteurs. L'IL-1 est sécrétée par les macrophages mais aussi par les neutrophiles, les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses et les lymphocytes T et B. Elle est sécrétée en réponse à différents stimuli

tels que : le TNF- α , IFN- α , IFN- β , IFN- γ , les LPS (Lipopolysaccharides), des virus et tout autre antigène. C'est un médiateur incontournable de la réponse immunitaire et de l'inflammation : adhésion des monocytes et neutrophiles, chimio-attracteur des leucocytes, activation des cellules T helper, prolifération des lymphocytes B, etc. Son effet principal est d'induire la cyclo-oxygénase 2 (COX-2) qui converti l'acide arachidonique des membranes cellulaires en prostaglandines directement impliquées dans le processus inflammatoire (phase aiguë de l'inflammation), c'est une cytokine précoce de la réponse immunitaire face à une agression. L'IL-1 est aussi un puissant inducteur de la production d'un grand nombre de cytokines par différentes cellules. De ce fait, un certain nombre de ses activités biologiques sont vraisemblablement indirectes et résultent de l'effet d'autres cytokines (Figure 9) (Dinarello, 1994, 1996, 2002).

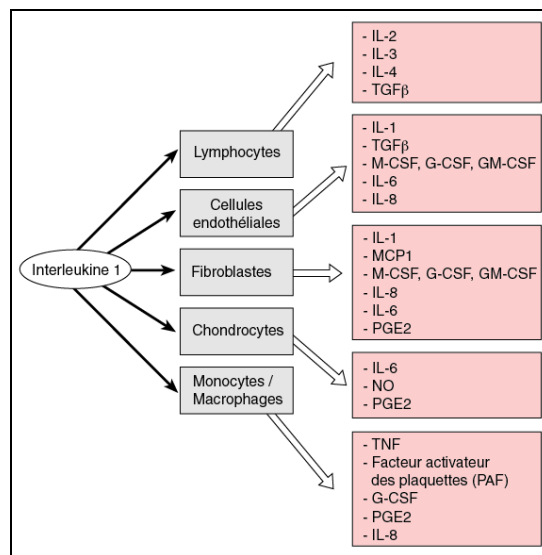


Figure 9 : L'IL-1 est un puissant inducteur à l'origine de nombreuses actions biologiques (Chatenoud & Dy, 2002)

1.2.2.5.2. L'interleukine 8

L'IL-8 fait partie des plus petites cytokines avec 72 AA pour un poids moléculaire de 8 kDa. Cette chémokine, également nommée CXC-L8, est principalement sécrétée par les monocytes activés mais aussi par les macrophages, les fibroblastes et les cellules épithéliales. C'est une cytokine qui a une action chimio-attractrice sur l'ensemble des cellules immunitaires capables de migration (polynucléaires neutrophiles principalement) (Kunkel *et al.*, 1991; Baggiolini *et al.*, 1995; Mukaida, 2003).

1.2.2.5.3. Le facteur nécrosant des tumeurs α (TNF- α)

C'est une cytokine de 157 AA (17 kDa). Le TNF- α est libéré principalement par les leucocytes et les lymphocytes T activés mais aussi dans une moindre mesure par les cellules endo- et épithéliales. Il possède plusieurs actions pro-inflammatoires sur divers organes et systèmes, généralement en coopération avec l'IL-1 et l'IL-6 :

- sur le foie, stimulation de la phase de réponse aiguë de l'inflammation qui provoque notamment l'augmentation de la concentration en protéine C réactive. Ce sont des protéines qui permettent notamment d'opsoniser les antigènes en vue de leur phagocytose et donc de recruter les neutrophiles,
- sur les macrophages en stimulant la phagocytose. Une activité biologique majeure du TNF est de provoquer la lyse de cellules tumorales par nécrose ou apoptose (Tracey & Cerami, 1993; Barbara *et al.*, 1996; Tracey *et al.*, 2008).

1.2.2.5.4. L'interleukine 6

C'est une cytokine de 185 AA (21,5 à 28 kDa). Bien qu'elle soit sécrétée par différents types cellulaires, l'IL-6 est majoritairement sécrétée par les monocytes, les fibroblastes et les cellules épithéliales stimulées ; après stimulation, les macrophages, les lymphocytes B et les lymphocytes T sont capables de sécréter l'IL-6. Tout comme l'IL-1 β , elle est impliquée dans la phase aiguë de l'inflammation en induisant la production de protéines par les hépatocytes. Les protéines de la phase aiguë de l'inflammation sont constituées d'une trentaine de protéines aux diverses fonctions : des protéines inhibitrices de protéases (alpha-1 antitrypsin), des protéines modulatrices de la coagulation (antithrombine-3), des protéines composante du complément (C2, C4, C9, Facteur B) et des protéines activatrices des macrophages (LPS Binding Protein (LBP)) (Ruminy *et al.*, 2001). Il existe deux types de protéines de la phase aiguë :

- le type I, qui pour être synthétisé en quantité, nécessite l'action synergique de l'IL-1 et de l'IL-6,
- le type II, qui pour une induction maximale ne nécessite que l'action de l'IL-6 (Gruys *et al.*, 2005).

L'IL-6 est le médiateur le plus important lors de la phase aiguë de l'inflammation de part son nombre de fonction (fièvre notamment). Cette cytokine intervient dans la réponse immunitaire innée et est sécrétée par les macrophages en réponse à un PAMP. Cette cytokine

possède également un rôle régulateur dans la mesure où elle induit la différenciation des lymphocytes B et l'activation/différenciation des lymphocytes T en cellules cytotoxiques.

I.2.2.5.5. L'interleukine 10

L'IL-10 est une cytokine homodimérique de 160 AA (18,5 kDa). Elle est sécrétée par les lymphocytes T et B, les cellules Natural Killer (NK) et les monocytes/macrophages. Cette cytokine a un caractère anti-inflammatoire puisqu'elle inhibe entre autre la sécrétion par les monocytes de l'IL-1, l'IL-6 et du TNF- α (qui sont, elles, pro-inflammatoires). Au contraire, chez les macrophages stimulés par des LPS, l'IFN- γ va augmenter la sécrétion de l'IL-6 en inhibant la sécrétion de l'IL-10. De plus, l'IL-10 induit la prolifération des lymphocytes B et la production d'anticorps (Moore *et al.*, 2001). L'IL-10 est donc un régulateur de l'immunité innée et va orienter la réponse immunitaire vers une réponse à dominante humorale (Mege *et al.*, 2006).

I.2.2.5.6. L'interleukine 12

C'est une cytokine de 505 AA (70 kDa), hétérodimérique composée d'une chaîne α (p35 : 35 kDa, 197 AA) et d'une chaîne β (p40 : 40 kDa, 306 AA). L'IL-12 est sécrétée par les cellules présentatrices de l'antigène (cellules dendritiques, monocytes/macrophages et lymphocytes B) en réponse aux bactéries, produits bactériens et parasites intracellulaires. Ce médiateur va alors induire la sécrétion de l'IFN- γ par les lymphocytes T et les cellules NK. Le spectre de cellules productrices de l'IL-12 reflète le rôle majeur de l'IL-12 comme cytokine pro-inflammatoire, mais aussi le rôle immuno-modulateur, nécessaire pour l'initiation et le maintien de la réponse immunitaire cellulaire. De plus, l'IL-12 augmente l'activité cytotoxique des cellules NK et des lymphocytes T cytotoxiques qui permettent l'élimination des cellules infectées par un pathogène intracellulaire, (Trinchieri *et al.*, 1992). Ainsi, l'IL-12, à l'instar de l'IL-10 joue ainsi un rôle dans la polarisation de la réponse immunologique Th1/Th2, mais dans le sens de l'immunité cellulaire (Lucey *et al.*, 1996; Collison & Vignali, 2008) (Figure 10).

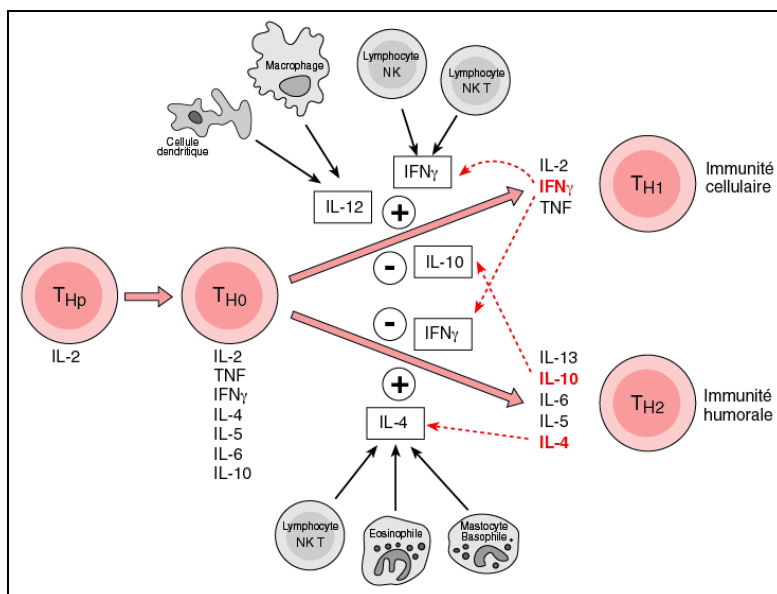


Figure 10 : Polarisation de la réponse immunitaire par le jeu de l'IL-10, l'IL-12 et l'IFN- γ (Chatenoud & Dy, 2002)

1.2.3. Effets inflammatoires des particules

1.2.3.1 In vivo

Afin d'élucider la relation de cause à effet entre une exposition à des particules et la réponse de l'organisme, des études *in vivo* ont été réalisées sur des animaux de laboratoire, mais aussi dans quelques cas, sur des volontaires humains exposés à des particules dans des conditions contrôlées.

La plupart des études relatives à la relation entre les particules et la réponse inflammatoire réalisées *in vivo* portent sur les particules de Diesel (PDi) (Salvi *et al.*, 1999; Saber *et al.*, 2006), les PM₁₀ (Li *et al.*, 1997; Barlow *et al.*, 2008) et plus récemment sur les PM_{2.5}. A titre d'exemple, concernant les PM_{2.5}, suite à des instillations intra-trachéales de suspension de particules, une augmentation de la production en TNF- α et IL-6 a été mesurée dans les lavages broncho-alvéolaires de rats Wistar, de même qu'une diminution de la capacité de phagocytose des macrophages traduisant le déclenchement d'une réaction inflammatoire (Huang *et al.*, 2008). Chez l'Homme, des expositions chez un sujet sain pendant 2 heures (concentrations en PM_{2.5} comprises entre 23 et 311 $\mu\text{g}/\text{m}^3$), induisent une augmentation du nombre de polynucléaires neutrophiles dans les lavages broncho-alvéolaires,

ainsi qu'une diminution de viabilité de ces cellules correspondant également à des symptômes inflammatoires (Ghio *et al.*, 2003; Holgate *et al.*, 2003).

Ces études *in vivo* montrent que les particules atmosphériques et notamment les PM_{2,5} ont un effet inflammatoire. L'étude mécanistique du processus d'action des particules nécessite quant à lui une approche *in vitro*.

1.2.3.2. In vitro

Les particules atmosphériques induisent une inflammation au niveau pulmonaire, les études *in vitro* portent donc principalement sur des cellules de types épithéliales (16-HBE, A549, AEC, L132, NHBE,...) et de type monocytes/macrophages (HPBMC, J774.4, RAW364.7, THP-1, U937, macrophages alvéolaires humains ou d'animaux issus de lavages broncho-alvéolaires,...). Les particules étudiées sont de deux types : (1) des particules standards de caractéristiques connues comme les PDI (Mazzarella *et al.*, 2007; Wichmann, 2007) et les particules de carbone (Printex 90 et Hubber 990 notamment) (Brown *et al.*, 2004a; Monteiller *et al.*, 2007) utilisées comme modèles de particules, (2) des particules de l'environnement, à savoir les PM₁₀ (Brown *et al.*, 2004b) et plus récemment les PM_{2,5} (Payne *et al.*, 2004; Garcon *et al.*, 2006).

Plus particulièrement, les particules atmosphérique PM_{2,5} ont ainsi révélé un effet pro-inflammatoire, à la fois sur des cellules épithéliales en culture et sur les cellules de types macrophages. Des cellules humaines épithéliales L132, exposées pendant 24 heures à des PM_{2,5} (collectées dans la région de Dunkerque) à des concentrations allant de 18,84 à 75,36 µg/mL, sécrètent des quantités de TNF-α supérieures aux cellules témoins (Garcon *et al.*, 2006). De même, il a été montré que des cultures primaires de cellules épithéliales bronchiques humaines exposées à des particules atmosphériques canadiennes standards (EHC-93), d'un diamètre moyen de 0,5 µm (Vincent *et al.*, 1997), libèrent différentes cytokines pro-inflammatoires (GM-CSF, IL-1β et IL-8). Une étude sur des cultures primaires de macrophages alvéolaires humains, montre une sécrétion accrue des cytokines pro-inflammatoires IL-8, IL-6 et TNF-α pour des doses de PM_{2,5} de 5 et 50 µg/mL. De même, des expositions aux particules atmosphériques EHC-93 induisent la sécrétion de TNF-α, IL-1β, IL-6 et GM-CSF par des monocytes humains provenant de lavages broncho-alvéolaires (van

Eeden *et al.*, 2001). Au contraire, à la concentration de 500 µg/mL, les auteurs ont constaté une chute significative de la sécrétion de ces trois cytokines (Payne *et al.*, 2004).

La plupart des résultats, montrent une induction significative de la sécrétion de cytokines et indiquent donc un processus d'inflammation initié par les cellules épithéliales et les monocytes/macrophages suite à une exposition (entre 9 et 24 heures) à des particules (de 50 à 100 µg/mL). Les résultats ne semblent pas être différents que l'on considère le type cellulaire et/ou le type de particule. Aucun effet ne semble observable pour des concentrations de particules inférieures à 10 µg/mL. Cependant, très peu d'études portent sur de telles concentrations (Mitschik *et al.*, 2008). Outre les particules elles-mêmes, c'est le rôle des caractéristiques physiques et des composés constituant les particules qui est maintenant le plus étudié.

1.2.3.3. Effets inflammatoires dus aux caractéristiques physiques : influence de la taille et de la réactivité de surface

Actuellement, beaucoup de recherches s'appliquent à déterminer les caractéristiques qui rendent un type de particules plus toxique qu'un autre. Plusieurs études mettent ainsi en évidence des effets biologiques délétères plus importants pour les particules les plus fines (à composition identique). Les particules de noir de carbone (Carbon Black, CB) printex 90 (particule ultrafine, ufCB) et Hubber 990 (particule fine, CB) sont souvent utilisées comme modèle de particules atmosphériques et diffèrent essentiellement de part leur taille (Tableau 3). Une étude comparative de leurs effets sur des cellules épithéliales humaines (A549) à des concentrations allant de 15 à 250 µg/mL, durant 24 heures, montre des augmentations de sécrétions d'IL-8 variables selon la taille. Pour les cellules exposées aux CB, seule la dose la plus élevée conduit à une augmentation significative. Au contraire, les ufCB induisent une sécrétion croissante pour les concentrations de 15, 31 et 63 µg/mL, mais les concentrations en IL-8 dans le milieu diminuent pour les concentrations de 125 et 250 µg/mL (Monteiller *et al.*, 2007).

Tableau 3 : Surfaces spécifiques des particules de noir de carbone en fonction de la taille des particules (Wilson *et al.*, 2002; Koike & Kobayashi, 2006)

Dénomination des particules	Diamètre moyen des particules en nm	Surface spécifique en m ² /g	Ratio de carbone élémentaire
Printex 90	14	300	0,98
Printex 25	56	45	0,99
Frammuruss 101	95	20	0,99
Hubber 990	260	7,9	-

Brown et collaborateurs (2004) ont exposé des macrophages alvéolaires de rat, à des concentrations d'ufCB (Printex 90) de 25 à 200 µg/mL pendant 4 heures pour étudier l'effet des particules ultrafines. L'effet pro-inflammatoire des ufCB a été suivi par la mesure de TNF-α dans le milieu. Les résultats montrent un effet-dose dès 25 µg/mL (Brown *et al.*, 2004a).

In vivo, des rats Wistar ont été exposés à des concentrations identiques de 1 mg/m³ de particules fines et ultrafines de carbone, pendant 7 heures, par inhalation dans une enceinte à température et humidité régulée (21-22°C et 55 % d'humidité). Les rats exposés aux particules ultrafines présentent un nombre plus important de leucocytes pulmonaires que ceux exposés aux particules fines (Gilmour *et al.*, 2004). Au-delà de la taille, c'est la surface spécifique qui détermine l'activité biologique des particules ; plus cette surface est élevée, plus il y aura de sites de réactions possibles avec le milieu environnant (Koike & Kobayashi, 2006). De plus, des cellules épithéliales A549 exposées à des particules de quartz de différentes réactivités de surfaces sécrètent d'autant plus d'IL-6 et d'IL-8 que la réactivité est élevée (Hetland *et al.*, 2001)

I.2.3.4. Effets inflammatoires dus aux différents composés adsorbés sur les particules

Les composés organiques tels les HAP constituent une part importante de la masse des particules formées par combustion (Schwarze *et al.*, 2006). Il a été montré grâce à l'étude des PDi, connues pour leur forte teneur en HAP, que ces composés étaient responsables de réactions pro-inflammatoires (Diaz-Sanchez, 1997; Bonvallot *et al.*, 2001; Nel *et al.*, 2001).

Les métaux associés aux particules sont également responsables de phénomènes inflammatoires au niveau des poumons. Ainsi, des extraits aqueux de particules collectées pendant le fonctionnement intermittent d'une aciérie (dans la vallée de l'Utah), ont été instillés à des volontaires sains. Il en a résulté une inflammation pulmonaire pour les volontaires exposés aux extraits de particules collectées lors du fonctionnement de l'aciérie alors que les extraits collectés lors des périodes de non activité de l'aciérie n'ont pas eu d'effet. Cette inflammation a été mise en relation avec les fortes teneurs en métaux (Fe, Cu, Ni, Pb et Zn principalement) des particules (Dye *et al.*, 2001; Ghio & Devlin, 2001; Ghio, 2004). Une approche *in vitro*, avec ces mêmes extraits sur des cellules épithéliales humaines (BEAS-2B) révèle une induction de l'expression de l'IL-6 et de l'IL-8 pour les extraits datant de la période de fonctionnement de l'aciérie, toujours en relation avec les métaux présents (Frampton *et al.*, 1999).

Les particules atmosphériques contiennent également un grand nombre de molécules d'origines biologiques telles les endotoxines et des spores (Schwarze *et al.*, 2006). Ces molécules sont ubiquistes et s'adsorbent plus particulièrement sur les PM₁₀, et dans une moindre mesure sur les PM_{2,5} (Soukup & Becker, 2001). Dans tous les cas, le niveau d'endotoxine, change considérablement suivant les saisons et le taux d'humidité (Carty *et al.*, 2003). Ces composés ont aussi un effet pro-inflammatoire. En effet, par l'utilisation d'un inhibiteur du TLR-2 (Toll-like récepteur 2), un des récepteurs aux endotoxines, la sécrétion d'IL-8 par des macrophages alvéolaires humains exposés à des particules atmosphériques a été diminuée (Becker *et al.*, 2005a; Becker *et al.*, 2005b).

Il apparaît donc que le rôle des différents composés d'une particule dans l'inflammation n'est pas clairement identifié. C'est vraisemblablement l'association de tous les composés, mais aussi les caractéristiques physiques de la particule qui vont dicter les effets biologiques.

I.3. Induction du stress oxydant par les particules

De nombreuses études ont permis d'identifier le stress oxydant comme principal médiateur des effets toxiques des polluants atmosphériques. Ainsi, la réponse inflammatoire au niveau des poumons serait médiée pour partie par les voies de signalisations associées au stress oxydant (Kelly, 2003). Concernant les particules, le stress oxydant intervient également dans la réponse des cellules face à ce polluant (Tao *et al.*, 2003; Gonzalez-Flecha, 2004).

I.3.1. Le stress oxydant

I.3.1.1. Définition

Le terme stress oxydant est relativement récent, il a été décrit en 1991 par Sies (Sies, 1991). Il décrit le stress oxydant comme un déséquilibre dans la balance des pro- et anti-oxydant (balance redox) qui peut conduire à des altérations cellulaires (Figure 11).

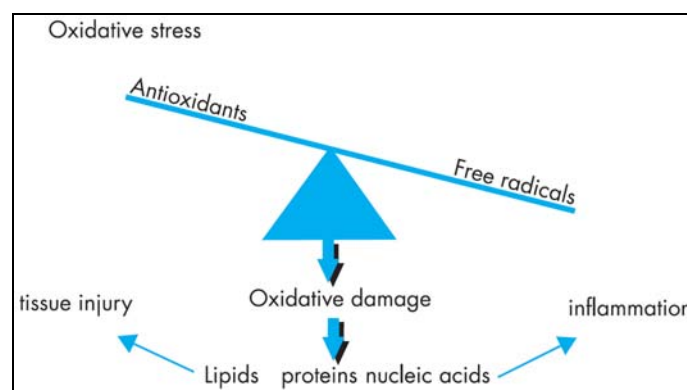


Figure 11 : Déséquilibre dans la balance redox d'une cellule (Kelly, 2003)

Dans les conditions physiologiques, l'oxygène, indispensable à la respiration, produit au niveau des mitochondries des espèces réactives oxygénées (dans la littérature, on rencontre fréquemment le terme de ROS pour Reactive Oxygen Species) pro-oxydantes qui peuvent affecter l'intégrité des cellules si elles sont en excès (Figure 12).

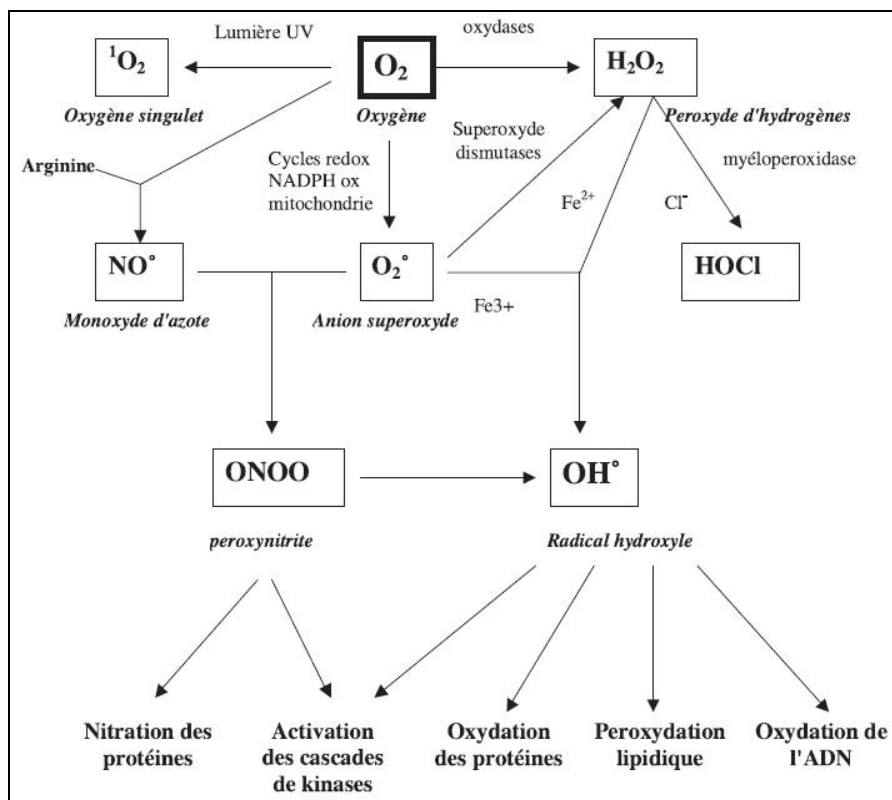


Figure 12 : Origines des différents radicaux libres oxygénés, nitrogénés et des espèces réactives de l’oxygène produits au niveau cellulaire (Favier, 2003)

Ces molécules sont issues de la métabolisation de l’oxygène, elles incluent des espèces chimiques radicalaires possédant un ou plusieurs électrons non appariés (Tableau 4) et de ce fait elles vont réagir indifféremment avec les autres molécules proches de leur lieu de production. Ces molécules sont essentiellement des composés des membranes cellulaires (lipides, glucides et protéines) et dans une moindre mesure l’ADN (Kelly, 2003). C’est pourquoi, les ROS sont impliqués dans de multiples processus biologiques tels que le vieillissement et l’inflammation mais aussi des pathogénèses comme la carcinogénèse et l’athérosclérose.

Tableau 4 : Principales espèces réactives de l’oxygène

Type de ROS	Espèces
ROS radicalaires, c’est une espèce chimique (atome ou molécule) possédant un électron non apparié sur son orbitale externe. Du fait de sa très grande réactivité, un radical libre a une durée de vie très courte (10^{-3} à 10^{-6} seconde)	<ul style="list-style-type: none"> Anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) Radical hydroxyle (OH^{\bullet}) Monoxyde d'azote (NO^{\bullet}) Radical peroxyde (ROO^{\bullet}) Radical alkoxyde (RO^{\bullet})
ROS non radicalaires	<ul style="list-style-type: none"> Oxygène singulet (1O_2) Peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) Nitroperoxyde ($ONOOH$) Peroxynitrite ($ONOO$)

Outre le transfert d'électrons au niveau mitochondrial à partir de l'O₂, d'autres facteurs endogènes responsables de la production de ROS existent comme une altération de la chaîne respiratoire mitochondriale qui intervient avec le vieillissement ou lors de phénomènes d'ischémie. L'activation des cellules immunitaires est également une source importante de production de ROS. En effet, la présence d'agents étrangers active les macrophages ce qui entraîne une augmentation de la consommation en oxygène (appelé poussée respiratoire). Cet oxygène, par l'action de processus enzymatiques, va être transformé en radicaux libres qui vont s'attaquer non seulement à l'agent étranger mais aussi aux tissus sains (Torres & Forman, 1999; Thannickal & Fanburg, 2000).

Il existe également des facteurs exogènes amenant à la production de ROS et donc à une induction du stress oxydant : expositions prolongées au soleil et aux radiations, contacts avec des agents cancérigènes, tabagisme, prise de médicaments (dont la pilule contraceptive), pratique intense ou mal gérée d'un sport, consommation excessive d'alcool, stress intellectuel ou thermique, agents infectieux et les polluants atmosphériques gazeux (NO₂, O₃) et particulaires (Imrich *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2008).

1.3.1.2. Dommages membranaires et formation du HNE

Une des atteintes cellulaires les plus caractéristiques du stress oxydant est la réaction des ROS, OH[•] notamment, avec les lipides insaturés des membranes en milieu aérobie qui conduit à une peroxydation lipidique et à la formation d'aldéhydes comme le malondialdéhyde (MDA) et les 4-hydroxyalkenals (HAE) dont le 4-hydroxy-2-nonenal (HNE) (Forman *et al.*, 2008; Valavanidis *et al.*, 2008).

Le HNE a été décrit pour la première fois en 1980 par Esterbauer comme une molécule cytotoxique provenant de la peroxydation lipidique (Comporti, 1998). Durant ces dix dernières années, le HNE a ainsi été étudié à la fois comme biomarqueur du stress oxydant (Zarkovic, 2003) mais aussi en tant que médiateur cellulaire. Il fait partie de la famille des 4-hydroxy-2-alkenal (HAE) et constitue l'aldéhyde le plus spécifique de la peroxydation lipidique. Le HNE est produit plus précisément à partir de l'oxydation de l'acide linoléique et/ou de l'acide arachidonique (acides gras poly-insaturés). C'est une molécule très réactive

du fait de son groupement aldéhyde, de sa liaison éthylène et de son groupement hydroxyle (Figure 13) (Enoiu *et al.*, 2002; Schaur, 2003). La présence de ces différentes fonctions réactives sur une même molécule potentialise la réactivité de chacune. Par exemple, le groupe hydroxy (C=O) sur le carbone 4 permet de polariser le groupement C=C de la liaison éthylène augmentant ainsi sa réactivité (Poli & Schaur, 2000). Si le HNE est moins réactif que les radicaux libres tel que OH[•], il est de ce fait plus stable et il a une capacité de diffusion plus importante. En effet, il peut affecter non seulement les cellules où il est généré mais aussi les cellules avoisinantes (Uchida, 2003).

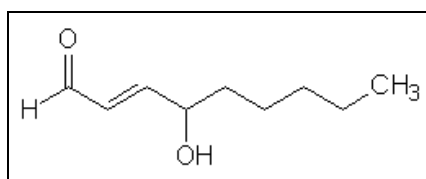


Figure 13 : Formule semi-développée du 4-hydroxy-2-nonal

Le HNE réagit très facilement avec l'ADN, les protéines et les phospholipides avec lesquels il va générer des adduits. De par sa nature électrophile le HNE va réagir non seulement avec les groupements nucléophiles, mais aussi avec les fonctions thiols des molécules (Enoiu *et al.*, 2002). *In vivo*, lors d'un stress oxydant, le HNE forme des adduits avec les acides aminés des protéines tels que la cystéine (fonction thiol), la lysine et l'histidine (fonction amine nucléophile) (Uchida, 2003).

Le HNE produit peut être neutralisé par voie enzymatique. Les principales enzymes intervenant dans ces voies sont les glutathion S-transférases (GST), l'aldéhyde déshydrogénase et l'alcool déshydrogénase. Les GST catalysent la conjugaison du glutathion réduit (GSH) avec le HNE par une addition de Michael sur le carbone 3 ce qui empêche les additions nucléophiles entre le HNE et les biomolécules (Uchida, 2003).

A faibles concentrations, le HNE peut avoir un rôle de second messenger au niveau intracellulaire. Un de ces rôles serait de participer à la régulation de la réponse immunitaire (Forman *et al.*, 2002; Forman *et al.*, 2008).

I.3.1.3. Les mécanismes de défense antioxydants

La production des ROS est limitée par différents systèmes de défense complémentaires. Les radicaux libres sont neutralisés par des systèmes enzymatiques (superoxyde dismutase (SOD), catalase et glutathion peroxydase (GPX)), ainsi que par des agents antioxydants que sont les vitamines du groupe A, les vitamines C et E. A cela s'ajoutent des enzymes protéolytiques qui dégradent les substrats oxydés. Ainsi, le potentiel oxydant de l' $O_2^{\bullet-}$ issu de l' O_2 est diminué par une série de réactions enzymatiques aboutissant à la formation d' H_2O (Torres & Forman, 1999; Thannickal & Fanburg, 2000). Le GSH va contribuer à la transformation de H_2O_2 , issu de l'oxydation de l' $O_2^{\bullet-}$, en H_2O par une réaction enzymatique catalysée par la GPX. Cette réaction conduit à la production de la forme oxydée du glutathion, le glutathion disulfide (GSSG). Ce dernier sera en retour réduit en GSH par une réaction catalysée par la glutathion réductase (GR). Il existe donc un équilibre entre ces deux formes dont les proportions respectives sont fonctions du potentiel redox global de la cellule. Le rapport GSH/GSSG est ainsi considéré comme un indicateur pertinent du degré de stress oxydant subit par la cellule (Schafer & Buettner, 2001). Ce rapport traduit également le degré de réponse cellulaire consécutive au stress (Figure 14).

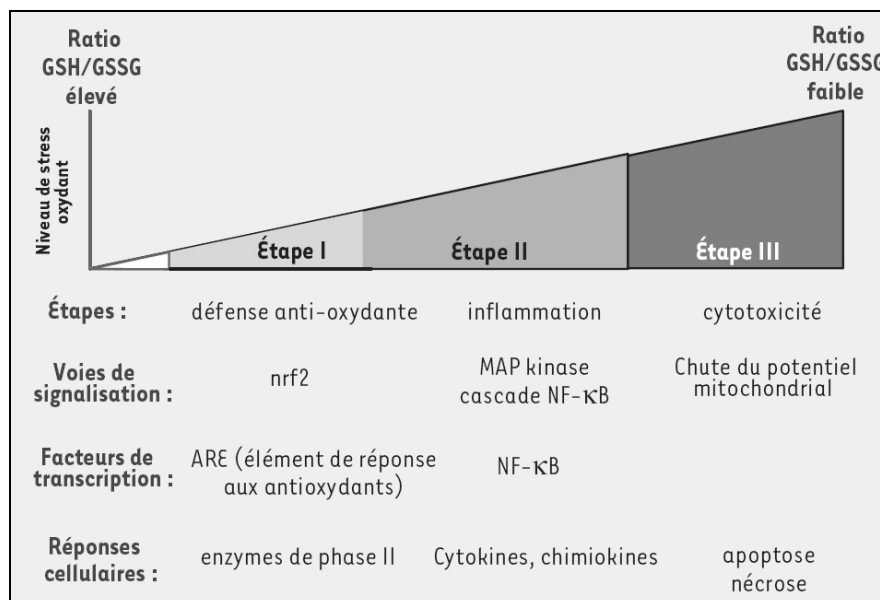


Figure 14 : Hiérarchisation des phénomènes biologiques en fonction du ratio GSH/GSSG (Baeza & Marano, 2007)

Lors d'un faible niveau de stress oxydant (Etape 1), les processus antioxydants permettent de restaurer « l'homéostasie redox » de la cellule, par le facteur de transcription nucléaire Nrf2 notamment, qui induit la formation de plus de 200 enzymes antioxydantes et

détoxifiantes comme la SOD, la GST, la catalase et l'hème oxygénase 1 (HO-1) (Cho *et al.*, 2006; Li & Nel, 2006). Cette dernière enzyme est une Heat Shock Protein (HSP) dont l'expression est induite rapidement lors de stress oxydant. Elle constitue à ce titre un bon marqueur de stress oxydant. La HO-1 a des fonctions antioxydantes et cytoprotectrices car elle dégrade l'hème en bilirubine et biliverdine qui sont de puissants anti-oxydants (Choi & Alam, 1996). Lorsque le déséquilibre est plus important (Étape 2), il y a activation des voies de signalisations MAPKs et Nf-κB, sensibles au potentiel redox de la cellule. Ces facteurs de transcription participent à l'induction de la réponse pro-inflammatoire, notamment par l'induction de l'expression de cytokines et de molécules d'adhésion. Finalement, en cas de stress oxydant important, traduit par un déséquilibre prononcé dans le rapport GSH/GSSG (Étape 3), un effet toxique est mesurable, notamment par des perturbations de perméabilité mitochondriale conduisant à une désorganisation de la chaîne de transport d'électron qui entraîne l'apoptose ou la nécrose de la cellule par relargage de facteurs pro-apoptotique par les mitochondries (Imrich *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2008; Valavanidis *et al.*, 2008).

Au niveau des poumons, les systèmes de défenses contre le stress oxydant sont très importants du fait de leur constante exposition aux polluants atmosphériques. Quand un polluant atteint les poumons, il va tout d'abord entrer en contact avec le surfactant. Ce liquide physiologique contient une quantité importante de différentes molécules anti-oxydantes (Tableau 5) (Kelly, 1999, 2003).

Tableau 5 : Antioxydants contenus dans le surfactant, d'après Kelly (Kelly, 1999, 2003)

Type	Nom de la molécule
Molécules de faibles poids moléculaire	Glutathion Tocophérol (Vitamine E) Acide ascorbique Acide urique
Enzymes	Superoxyde dismutase Glutathion peroxydase Catalase
Protéine de transport et de liaison des métaux	Caeroplasmine Transferrine

Le surfactant pulmonaire constitue donc une première barrière de défense anti-oxydante vis-à-vis des polluants atmosphériques. Toutefois, il peut après une exposition à des polluants être lui-même source d'autres molécules oxydantes telles que les produits de peroxydation lipidique qui peuvent altérer les cellules pulmonaires.

I.3.2. Particules et stress oxydant

I.3.2.1. Généralités

Les premières études concernant les particules et l'implication du stress oxydant dans leur mécanisme d'action ont été réalisées dans le cadre d'expositions professionnelles à des particules de charbon (Dalal *et al.*, 1989), de fibres de verres (Gilmour *et al.*, 1995) et de fibres d'amiante (Jauraud & Lévy, 1999). Du fait de l'augmentation significative ces 30 dernières années, dans les zones urbaines, de particules issues de processus de combustion, les recherches portent maintenant essentiellement sur ce type de particules. De plus, le stress oxydant est considéré comme étant le facteur majeur, par rapport aux gaz polluants, des effets délétères sur la santé humaine, notamment au niveau cardio-pulmonaire (Sunyer & Basagana, 2001; Valavanidis *et al.*, 2008).

A l'heure actuelle, la corrélation entre les particules et la survenance d'infections respiratoires, de cancer des poumons et d'effets chroniques cardio-pulmonaires s'expliquerait principalement par les mécanismes physiopathologiques du stress oxydant issu de la génération de ROS (Valavanidis *et al.*, 2008). En effet, les PDi peuvent être à l'origine de la génération de radicaux libres (HO^\bullet et $\text{O}_2^{\bullet-}$) et de ROS non radicalaires (H_2O_2) par des cellules pulmonaires endothéliales humaines (Bai *et al.*, 2001) ou encore les cardiomyocytes (Knuckles & Dreher, 2007) qui vont prendre part dans des phénomènes de peroxydation lipidique des membranes mais aussi des dommages sur l'ADN (Valavanidis *et al.*, 2008). Des observations similaires ont été constatées avec des $\text{PM}_{2,5}$ (Tao *et al.*, 2003; Risom *et al.*, 2005).

Les recherches visant à identifier les effets des particules impliquent la mesure des caractéristiques des particules pouvant induire un stress oxydant. En effet, les particules sont composées de molécules connues pour avoir un pouvoir oxydant : les composés organiques (les quinones et les HAP) et les métaux (Valavanidis *et al.*, 2008). Mais, la taille et surtout la réactivité de surface seraient également déterminantes dans la production de ROS.

I.3.2.2. Influences des caractéristiques physiques des particules : rôle de la taille

La taille a un rôle important dans l'induction des effets biologiques car les particules les plus fines, vont traverser les barrières de l'organisme, pénétrer dans les cellules, voire dans

les organites qui les composent. En effet, des observations en microscopie électronique comparant la pénétration des PM₁₀, PM_{2,5} et PM_{0,1}, montrent que les particules les plus fines peuvent être localisées dans les mitochondries. La présence des particules ultrafines dans les mitochondries entraîne leur altération (Li *et al.*, 2003). Comme mentionné précédemment, l'altération de ces organites contribue à la production de ROS et donc à l'induction d'un stress oxydant. Parallèlement à la taille, il faut aussi considérer la surface spécifique qui traduit mieux les effets biologiques potentiels des particules (Murphy *et al.*, 1998). En effet, de nombreuses études ont montré que la capacité des particules ultrafines à générer des ROS en condition acellulaire est liée à l'augmentation de surface spécifique (Stone *et al.*, 1998; Brown *et al.*, 2001; Wilson *et al.*, 2002). En effet, l'augmentation de surface spécifique, qui correspond à la surface totale des particules pour une taille donnée, se traduit par une formation plus importante de ROS des Printex 90 (diamètre moyen de 14 nm) par rapport aux Hubber 990 (diamètre moyen de 260 nm) (Wilson *et al.*, 2002; Koike & Kobayashi, 2006).

La génération de ROS, associée à une surface spécifique importante, et le stress oxydant engendré pourraient expliquer les effets toxiques spécifiques aux ultrafines. En effet, des particules ultrafines de carbone induisent une baisse du taux de glutathion dans des cellules épithéliales alvéolaires humaines de type II (A549) indiquant un stress oxydant alors que les fines n'ont pas d'effet sur les taux de glutathion (Stone *et al.*, 1998). *In vivo*, on constate le même effet des particules ultrafines sur les cellules des poumons de rats (Li *et al.*, 1999).

La mesure de l'induction de la HO-1 dans des cultures primaires de macrophages suite à des expositions à des particules de noir de carbone de 14, 56 et 95 nm corrobore la relation entre induction du stress oxydant et surface spécifique. Plus la particule est petite, plus la surface spécifique est importante, plus sa capacité à induire un stress oxydant semble élevée (Koike & Kobayashi, 2006).

La nature carbonée de ce type de particule ne semble pas conditionner la réactivité de surface. En effet, l'utilisation de particules de polystyrène de différentes tailles (64, 202 et 535 nm de diamètre moyen, plus la taille est faible, plus la surface spécifique est élevée) montre une production de ROS en milieu acellulaire proportionnelle à leur surface spécifique (Brown *et al.*, 2001). Une étude sur les cellules A549 et différentes tailles de particules de

TiO₂ montre que les particules les plus fine génèrent un stress oxydant alors que les plus grosses ne l'induisent pas (Singh *et al.*, 2007).

I.3.2.3. Influence de la composition des particules

Une corrélation a été établie entre la composition des particules en molécules à potentiel redox élevé et leur capacité à induire un stress oxydant dans les macrophages et les cellules épithéliales bronchiques (Li *et al.*, 2003). Ces particules, et les substances qui les composent, composés organiques et quinones notamment, sont en partie responsables de la toxicité des particules sur les cellules (Li *et al.*, 2003; Xia *et al.*, 2004).

En effet, le rôle des quinones a été largement décrit dans plusieurs études toxicologiques. Ces études ont montré que la carcinogénéicité des quinones provient de leur potentiel redox susceptible d'entraîner la formation de ROS. En effet, en présence des formes ioniques du fer et de NADH, un cycle redox se met en place et produit de l'H₂O₂ et le radical hydroxyl HO[•] (Figure 15) : c'est la réaction de Fenton (production de HO[•] à partir de H₂O₂ en présence de Fe²⁺ ou Cu⁺) (Qiu & Cadenas, 1997; Bolton *et al.*, 2000; Squadrito *et al.*, 2001).

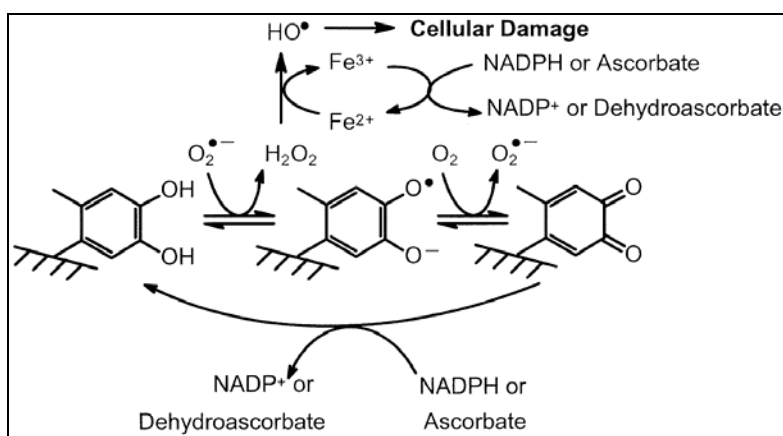


Figure 15 : Cycle redox des quinones et production de ROS (Squadrito *et al.*, 2001)

La grande majorité des études portant sur les HAP adsorbés sur les particules, concernent les PDi car elles présentent une teneur élevée en HAP. De part leur capacité à générer $O_2^{\bullet-}$ et OH^{\bullet} , elles induisent des effets oxydants toxiques (mortalité élevée *via* des oedèmes pulmonaires et l'altération des cellules épithéliales) sur des souris après une instillation intra-trachéale (Sagai *et al.*, 1993; Kumagai *et al.*, 1997). Les HAP présents

peuvent également être convertis en quinones *via* les processus de biotransformation à travers l'action notamment du cytochrome P450 1A1, de l'époxy hydrolase et de la dihydrodiol déhydrogénase (Penning *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2008).

Concernant l'effet des métaux, les PM₁₀ à teneur élevée en cuivre induisent *in vitro* l'activation du facteur de transcription NF-κB, utilisé comme indicateur de l'induction d'un stress oxydant, dans des cellules épithéliales humaines (lignée BEAS-2B) (Baeza-Squiban *et al.*, 1999). Concernant les PM_{2,5}, des instillations chez des humains en bonne santé entraînent une inflammation des voies respiratoires caractérisée par une production de ROS. Les auteurs suggèrent donc l'importance de ce métal dans le déclenchement de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (IL-6 et TNF-α) *via* la production de ROS (Schaumann *et al.*, 2004). D'autres métaux semblent plus spécifiquement impliqués dans des phénomènes de stress oxydant, notamment des dommages à l'ADN. Pendant 1 an, l'exposition aux PM_{2,5} de 49 étudiants de l'université de Copenhague a été suivie. Après analyse de la composition en Cr, Fe, Ni, Cu, V et Pt des PM_{2,5} et des dommages sur l'ADN des lymphocytes prélevés chez les étudiants, les auteurs ont montré l'importance du Cr et du V dans les altérations de l'ADN (Sorensen *et al.*, 2005). Une étude en milieu acellulaire, a montré l'importance des métaux (notamment du fer et du vanadium) en présence de H₂O₂ et de PM_{2,5} dans la génération de OH[•] *via* la réaction de Fenton (Valavanidis *et al.*, 2005).

Les particules atmosphériques induisent donc la formation de ROS qui peuvent conduire à un stress oxydant. Cette génération de molécules toxiques serait liée à la particule elle-même (surface spécifique) mais aussi aux composés adsorbés en surface.

II. MATERIELS ET METHODES

II.1. Les particules utilisées

II.1.1. Les particules atmosphériques PM_{2,5}

II.1.1.1. La campagne de prélèvements

Dans le cadre de notre étude, nous avons choisi de collecter spécifiquement les PM_{2,5} en raison de l'impact sanitaire prépondérant qu'elles ont par rapport aux particules de taille supérieures.

Le site de prélèvement, déterminé en collaboration avec l'association de mesure de la qualité de l'air de Lorraine (ATMO Lorraine Nord), est situé dans une station qualifiée par le réseau de mesure de station de proximité industrielle car située au voisinage immédiat d'un site sidérurgique important de la vallée de la Fensch. La localisation du site entre le site industriel et une voie de circulation importante permet des échantillonnages de pollutions plutôt de caractère mixte industriel et routier. Cette station dispose d'un équipement complet d'analyseur des polluants réglementés et d'une station météorologique.

Les PM_{2,5} ont été prélevées pendant une année (du 21 septembre 2007 au 19 septembre 2008) à raison d'un filtre par semaine dans l'objectif de disposer d'échantillons correspondant aux quatre saisons ce qui a permis de disposer de 12 filtres par saison.

L'appareil utilisé pour la collecte est un Partisol, Model 2000 Air Sampler (Rupprecht & Patashnick Co., Inc., Albany, NY) équipé d'une seule tête de prélèvement permettant de récupérer les PM_{2,5} sur des filtres en nitrocellulose d'un diamètre de 47 mm, de porosité 8 µm (Sartorius, Allemagne) avec un débit constant de 16,7 l.min⁻¹ (soit 1 m³.h⁻¹) pendant 7 jours consécutifs (Figure 16). Les filtres sont pesés avant et après le prélèvement et conservés à température constante de 20°C, à l'obscurité, jusqu'à leur traitement pour la remise en suspension des particules.

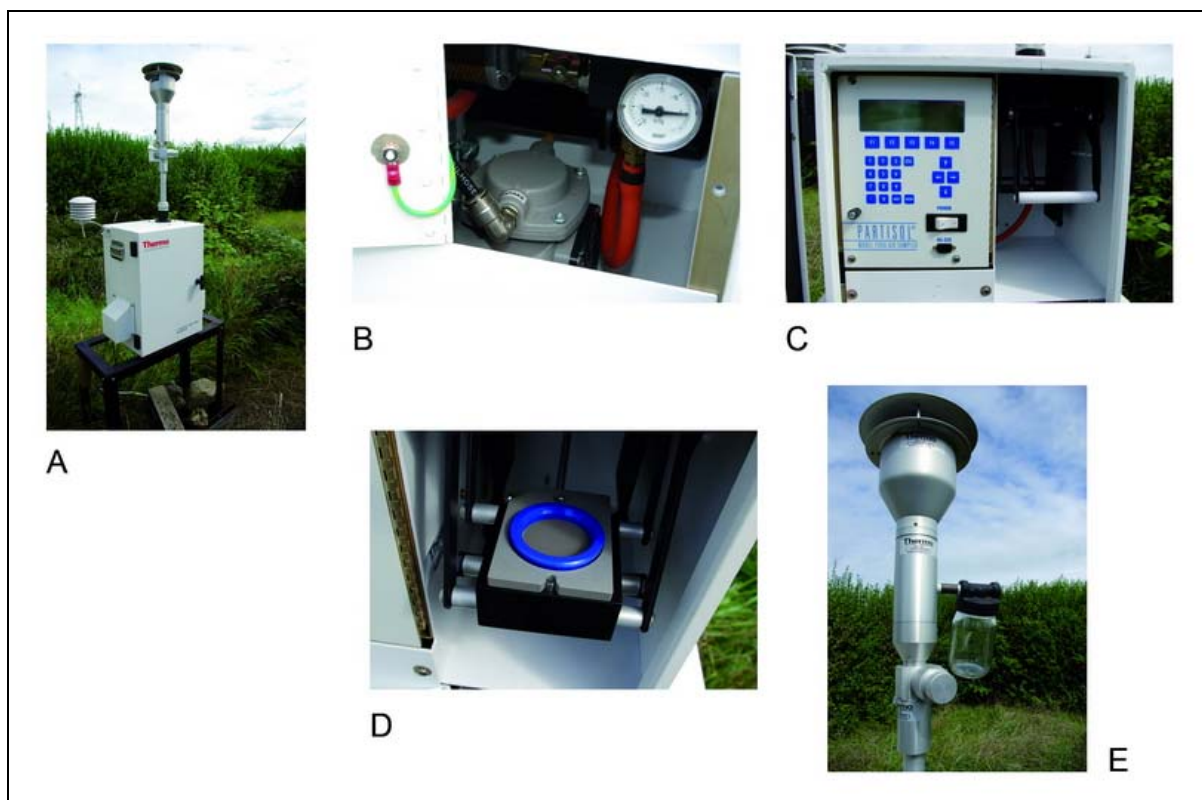


Figure 16 : Eléments du Partisol 2000 et de la tête de prélèvement. A : le partisol en situation B : la pompe, C : l'ordinateur qui régule la pompe, D : le support de filtre, E : la tête de prélèvement permettant de sélectionner les $PM_{2,5}$ par coupure granulométrique.

II.1.1.2. Récupération des $PM_{2,5}$ déposées sur les filtres

Le filtre est placé dans un bécher en verre, la face de dépôt des particules vers le fond du récipient, contenant 5 mL d'eau ultra pure (EUP). L'ensemble est ensuite placé dans un bain à ultrasons (BRANSONIC, 40KHz), pendant 7 minutes puis sur un agitateur orbital pendant 5 minutes. Après récupération des 5 mL d'eau ultra pure contenant les particules, l'opération est renouvelée avec de nouveau 5 mL d'eau ultra pure. La figure 17 montre que la répartition des particules sur le filtre avant sonication est homogène (Figure 17A) tandis qu'après sonication on observe clairement les zones d'altération dues aux ultrasons (Figure 17A). Les 10 mL d'eau ultra pure contenant les particules ainsi récupérées sont placés à $-20^{\circ}C$ pour ensuite être lyophilisés (Freezone 6, LABCONCO). La masse de particules récupérées s'obtient par pesée du récipient de lyophilisation avant et après la lyophilisation. Les $PM_{2,5}$ de quatre filtres prélevés consécutivement dans le temps ont été préparées simultanément de manière à disposer d'un échantillon par mois.

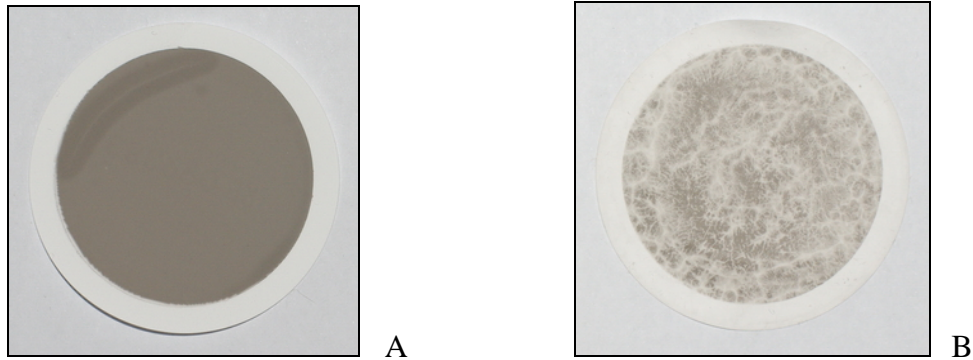


Figure 17 : Photographies d'un même filtre avant (A) et après (B) les deux sonications

II.1.1.3. Quantification des $PM_{2,5}$ récupérées

Les quantités de particules récupérées sont déterminées par pesée comme indiqué ci-dessus. Une seconde méthode a été envisagée pour palier à l'imprécision de pesée des faibles quantités de particules présentes dans le cas de la préparation de $PM_{2,5}$ à partir d'un seul filtre. Elle consiste à mesurer l'absorbance à 340 nm de la suspension de $PM_{2,5}$ et à la comparer à une gamme d'étalonnage réalisée à partir de suspensions de particules de noir de carbone (printex 90) de 1,25 à 80 $\mu\text{g/mL}$. Les suspensions sont réalisées dans le même tampon que les échantillons. Toutes les solutions sont soumises aux ultrasons pendant 10 minutes. 75 μl des suspensions sont déposés en triplicat dans une microplaque de 96 puits pour la mesure d'absorbance à 340 nm. La quantité de particules est alors calculée en $\mu\text{g/mL}$ d'équivalent noir de carbone (Brown *et al.*, 2004b).

II.1.1.4. Préparation des suspensions de particules

Pour les expositions des cellules en culture, les particules sont remises en suspension à une concentration de 5 mg/mL dans une solution saline (NaCl à 0,9 %) contenant du DPL (2,3-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-1-phosphocholine) à 0,02 %, et de la SAB (Sérum-albumine bovine) à 1% (tampon salin DPL/SAB) puis soumis aux ultrasons dans un bain à ultrasons pendant 20 minutes. Les suspensions de particules ainsi obtenues sont immédiatement réparties en fractions aliquotes et conservées -20°C (Foucaud *et al.*, 2007).

Les suspensions réalisées pour cette étude, correspondent au mélange des échantillons mensuels de chaque saison soit les particules collectées sur 12 filtres.

II.1.1.5. Chimie analytique

Pour déterminer la nature et estimer la quantité relative des HAP et métaux présents à la surface des particules collectés, des prélèvements spécifiques ont été réalisés à cette fin pendant une semaine (Août 2005 pour les HAP et Avril 2008 pour les métaux).

II.1.1.5.1. Dosage des HAP

Les dosages en HAP sur les particules ont été réalisés par le Laboratoire de Spectrométrie de Masse et de Chimie Laser (LSMCL) dirigé par Jean-Jacques Gaumet. La technique employée fait appel à un spectromètre de masse MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation – Time Of Flight) (Bruker Daltonics, Allemagne).

II.1.1.5.2. Dosage des métaux

Des particules sur filtre ainsi que des particules lyophilisées ont été analysées par le laboratoire *Micropolluant Technologie S.A.* (Thionville).

Les échantillons sont minéralisés à l'aide d'un mélange d'acide nitrique et de peroxyde d'hydrogène en condition micro-onde. Les métaux sont dosés par spectrométrie de masse à induction plasma (ICP-MS) selon la norme NF EN 14902, X43-026. Les métaux quantifiés sont : Aluminium, Titane, Vanadium, Chrome, Manganèse, Fer, Nickel, Cuivre, Zinc, Arsenic, Cadmium et Plomb.

II.1.2. Les particules de noir de carbone

II.1.2.1. Caractéristiques

Deux types de particules de noir de carbone sont utilisés. Les Huber 990 (H. Haeffner & Co. Ltd (Chepstow, Angleterre), d'un diamètre variant entre 129 nm et 592 nm (diamètre moyen de $260 \pm 13,7$ nm), particules dites fines. Le second type de particules sont les Printex 90 (Degussa, Frankfurt, Allemagne), d'un diamètre compris entre 7,7 nm et 28,2 nm (diamètre moyen $14,3 \pm 0,6$ nm), qualifiées de particules ultrafines (Stone *et al.*, 2000).

Tableau 6 : Caractéristiques des particules fines et des particules ultrafines (Stone *et al.*, 2000)

Particule	Diamètre moyen en nm	Surface en $\text{m}^2.\text{g}^{-1}$	Teneur en fer en $\text{ng}.\text{mg}^{-1}$
Fine	$260,2 \pm 13,7$	7,9	Non détectable
Ultrafine	$14,3 \pm 0,6$	253,9	19

Les suspensions de particules sont préparées dans le tampon salin DPL/SAB et dispersées par ultrasons pendant 10 min (bain à ultrason) juste avant addition à raison de 1 % du volume final lors des expérimentations (50 µg/mL).

II.1.2.2. Dopages des particules fines et ultrafines de noir de carbone

II.1.2.2.1. Dopage en HAP

0,5 g de particules fines et ultrafines de noir de carbone sont mises en contact avec 10 mL d'une solution d'HAP (pyrène, benzo[a]pyrène ou benzo[b]fluoranthène) à 0,5 µg/mL dans du dichlorométhane. Les particules et la solution de HAP sont placées dans un bécher en verre et mis dans un bain à ultrasons pendant 10 minutes puis sous agitation pendant une nuit (sous hotte aspirante). Durant la nuit, le dichlorométhane s'évapore à température ambiante (Jakab *et al.*, 1990). Les particules dopées en HAP nécessaires sont remises en suspension à la concentration de 5 000 µg/mL dans le tampon salin DPL/SAB. La concentration théorique en HAP sur les particules est de 10 µg de HAP par g de particules.

La capacité d'adsorption des HAP par les particules a été évaluée par une méthode d'extraction solide/liquide à l'aide d'un soxhlet, sur des particules dopées avec 150 µg de pyrène par gramme de CB. Le solvant utilisé pour l'extraction est le dichlorométhane et la durée de l'extraction est de 20 heures. Après l'extraction, le dichlorométhane est évaporé par chauffage léger et le pyrène est remis en solution dans de l'acétonitrile (Ryno *et al.*, 2006). Cette solution est analysée par HPLC afin de déterminer la quantité de HAP désorbée, permettant ainsi de calculer celle adsorbée sur les particules. Les conditions opératoires d'analyses sont les suivantes : volume d'injection de 20 µL, phase stationnaire apolaire (colonne utpisphere 5 µm 250*4,6 mm, INTERCHIM) phase mobile 100 % acétonitrile à un débit de 1 mL/min à 20°C, méthode isocratique, pression constante de 1000 psi.

II.1.2.2.2. Dopage en métaux

0,5 g de particules fines ou ultrafines de carbone sont mises en contact avec 20 mL d'une solution aqueuse de sel métallique à laquelle on ajoute 600 µl d'acétone afin de favoriser la dispersion des particules hydrophobes. Quatre solutions de sels métalliques sont utilisées : 1) une solution de sulfate de fer (FeSO₄, 7H₂O) à 500 µg de fer par mL soit 20 mg de fer par g de particules 2) une solution d'oxalate de plomb (Pb(CH₃CO₂)₂, 3H₂O) à 10 µg de

plomb par mL soit 0,4 mg de plomb par g de particules 3) une solution de sulfate de zinc ($\text{ZnSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$) à 100 μg de zinc par mL soit 4 mg de zinc par g de particules. 4) une solution de sulfate de cuivre ($\text{CuSO}_4, 5\text{H}_2\text{O}$) à 5 μg de cuivre par mL soit 0,2 mg de cuivre par g de particules. Les suspensions de particules sont ensuite placées à 100°C jusqu'à évaporation totale (une nuit). Les particules récupérées subissent ensuite un traitement thermique à 600°C pendant 8 heures sous atmosphère inerte (azote) dans un four tubulaire (CARBOLITE) (Probst *et al.*, 2004). Les particules sont pesées avant et après ce traitement thermique pour déterminer la perte de matière carbonée éventuelle.

II.2. Matériel biologique

II.2.1. Caractéristiques de la lignée cellulaire THP-1

Les cellules utilisées appartiennent à la lignée monocyttaire humaine THP-1 (ATCC, American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA). Elles sont issues du sang, d'un enfant âgé de 1 an atteint d'une leucémie aiguë. Ces cellules capables de division *in vitro* au stade indifférencié pendant au moins 14 mois sont souvent qualifiées de « macrophage like cells » (Abrink *et al.*, 1994). Les cellules THP-1 possèdent à leur surface des récepteurs Fc et C3b, des immunoglobulines cytoplasmiques, sont capables de produire de l'IL-1 et peuvent être différenciées en macrophage (avec des esters de phorbol). Dans cette étude, les THP-1 sont utilisées, après différenciation, comme modèle de macrophage (Auwerx, 1991; Hiura *et al.*, 1999). En effet, les THP-1 possèdent de nombreuses caractéristiques communes aux monocytes et aux macrophages notamment la capacité de phagocytose. Ces cellules sont également capables de sécréter des cytokines et exprimer des récepteurs membranaires comme les CD-4 et CD-14, communs aux macrophages et aux monocytes (Tsuchiya *et al.*, 1980; Auwerx, 1991).

II.2.2. Culture de cellules

Les cellules sont cultivées en suspension dans des flacons de cultures de 25, 75 ou 150 cm^2 (NUNC) à raison de 1.10^6 cellules par mL au maximum. Le milieu de culture est un

milieu RPMI 1640 (Invitrogen) additionné de 10 % de sérum de veau fœtal décomplémenté (SVF) (SIGMA), de 0,5 % de pénicilline/streptomycine (Invitrogen) à 10 000 U/mL de pénicilline et 10 000 µg/mL de streptomycine, de 1 % de L-glutamine (Invitrogen) à $2 \cdot 10^{-1}$ M et de 0,1 % de β-mercaptoéthanol à $2 \cdot 10^{-2}$ M. Le milieu est renouvelé deux fois par semaine par centrifugation de la suspension cellulaire à 150 g pendant 5 min. Le culot cellulaire est remis en suspension dans le milieu de culture de manière à obtenir une concentration de $0,5 \cdot 10^6$ cellules par mL. Les cellules sont incubées à 37°C en atmosphère enrichie à 5 % de CO₂. La viabilité et la concentration cellulaire sont déterminées chaque semaine par un test d'exclusion au bleu trypan suivi d'un comptage en cellule de Malassez.

II.2.3. Différenciation des cellules THP-1 en macrophages

Les cellules THP-1 bloquées au stade monocyte/macrophage peuvent être différenciées en macrophage par addition de Phorbol 12-Myristate 13-Acétate (PMA) entraînant leur adhésion au support de culture.

Au cours de ce travail, deux protocoles ont été utilisés :

- Les cellules ont été cultivées pendant 48 heures en présence de PMA à 8 nM (Park *et al.*, 2007).
- Les cellules ont été cultivées pendant 24 heures en présence de PMA, (SIGMA P8139) à 200 nM (Zhou *et al.*, 2005).

Dans les deux cas, à la fin du temps d'incubation le milieu contenant le PMA est retiré, les cellules adhérentes sont rincées avec du RPMI 1640 afin d'éliminer les traces de PMA et du milieu complet est ajouté pour la suite des expérimentations.

II.2.4. Expositions *in vitro*

Le principe de nos expositions *in vitro* (Figure 18), nécessite dans un premier temps de différencier les cellules THP-1, en 24 heures ou en 48 heures selon le protocole utilisé, dans des plaques de 96 ou 24 puits selon l'expérimentation (270 µL dans les microplaques et 1 mL dans les plaques de 24 puits, dans les deux situations à $1 \cdot 10^6$ cellule/mL). Une fois différenciées, les cellules adhérentes préalablement rincées deux fois au RPMI ou PBS (pour Phosphate Buffered Saline ou Tampon Phosphate Salin) selon l'expérimentation sont incubées 24 heures en présence des différentes suspensions de particules et/ou solutions de

HAP et de métaux (dans du milieu complet de culture sans β -mercaptoéthanol). En fin d'incubation, les surnageants sont récupérés pour être soit analysés dans la même journée ou bien conservés à -20 C. Après deux rinçages au RPMI ou au PBS, les cellules sont incubées 24 heures supplémentaires avec une solution de LPS (Lipopolysaccharide bactérien) à 10 ou 100 ng/mL (dans du milieu complet de culture sans β -mercaptoéthanol) selon la cytokine dosée. A l'issue de cette incubation, les surnageants sont une nouvelle fois prélevés et conservés à -20°C pour les analyses ultérieures.

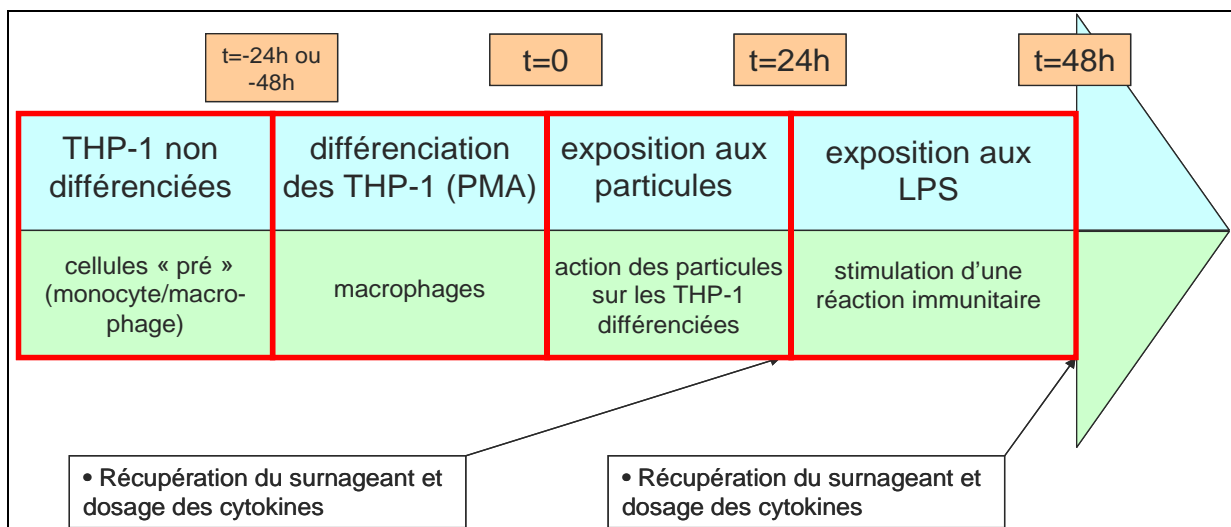


Figure 18 : Schéma du protocole des expositions *in vitro*

Dans le cas des dosages du glutathion et de la mise en évidence de la HO-1, pour des considérations techniques, les cellules THP-1 ne peuvent être différenciées en cellules adhérentes. Les expositions aux particules se font sur des suspensions de THP-1 à une concentration de 1.10^6 cellules/mL.

II.3. Tests de viabilité cellulaire

II.3.1. Test LDH

Après exposition aux particules, les cellules THP-1 sont culotées par centrifugation (5 min à 150 g). Le surnageant est transféré dans un microtube et centrifugé 10 min à 13 000 g afin de culoter les particules. L'activité de la LDH dans le surnageant est mesurée

par réduction du NAD en NADH couplée à l'oxydation du lactate en pyruvate. Cette première réaction est suivie du transfert de l'ion hydrure de NADH au sel de tétrazolium (chlorure de 2-[4-iodophényl]-5-phényltétrazolium) qui est alors réduit en sel de formazan dont l'absorbance est mesurée à 490 nm (Cytotoxicity detection kit, Roche Diagnostics, Ingelheim, Allemagne) à l'aide d'un lecteur de microplaque (Automated Microplate Reader, PowerWave XS, BIOTEK.). La quantité de LDH dans le milieu est proportionnelle au nombre de cellules endommagées (Decker & Lohmann-Matthes, 1988; Klegeris *et al.*, 2003).

Le pourcentage de cytotoxicité est calculé en fonction des activités LDH des surnageants de culture des cellules exposées aux différents composés à tester, des cellules non traitées et des cellules traitées au Triton X-100 à 1 % pendant 30 min (libération maximale de LDH par lyse cellulaire) selon la formule ci-après :

$$\% \text{ de cytotoxicité} = (A_{\text{échantillon}} - A_{\text{témoin}}) / (A_{\text{Triton}} - A_{\text{témoin}}) \cdot 100$$

avec :

- $A_{\text{échantillon}}$: activité LDH de l'échantillon
- $A_{\text{témoin}}$: activité LDH du témoin
- A_{Triton} : activité LDH des cellules traitées au Triton X-100

II.3.2. Test MTT

Le réactif utilisé est le sel de tétrazolium MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide). Le tétrazolium est réduit, par la succinate déshydrogénase mitochondriale des cellules vivantes, en cristaux de formazan insolubles au niveau intracellulaire. Une lyse cellulaire par un solvant organique permet la libération et la resolubilisation du formazan, ce qui induit l'apparition d'une coloration bleu-violette. L'intensité de cette coloration est proportionnelle au nombre de cellules vivantes présentes lors du test et capables d'activités métaboliques.

Après traitement avec les différents polluants dans des microplaques de 96 puits, les cellules THP-1 différenciées sont lavées deux fois au PBS. 100 μ L de solution de sel de tétrazolium à 3 mg/mL dans du PBS sont ajoutés pour une durée de 4 heures. A la fin de l'incubation (37°C, 5% CO₂), la solution de sel de tétrazolium est remplacée par 200 μ L de diméthylsulfoxyde (DMSO). Le DMSO permet la dissolution des cristaux de formazan et l'apparition d'une coloration violette dont on mesure l'absorbance à 570 nm.

II.4. Dosage des cytokines

Pour cette étude, nous avons choisi de doser six cytokines : IL-1 β , IL-8, IL-6, TNF- α , IL-10 et l'IL-12 et les sécrétions de ces cytokines par les cellules dans le milieu de culture ont été mesurées par des dosages immunoenzymatique ELISA (Anticorps, BD Biosciences, San Diego). Les milieux de culture subissent une centrifugation préalable (3 min à 10 000 g) au dosage pour éliminer les débris cellulaires et les particules utilisées au cours des expositions. Ils sont utilisés sans congélation pour le dosage.

Le principe de ce dosage ELISA sandwich, implique la reconnaissance de la cytokine d'intérêt par un anticorps spécifique dit de capture fixé sur une matrice, en l'occurrence une microplaque de 96 puits. Ce complexe anticorps-cytokine est ensuite reconnu par un anticorps dit de détection, biotinylé, également spécifique de la cytokine recherchée. La peroxydase du raifort couplée à l'avidine se fixe sur la biotine (complexe biotine/avidine) va permettre de quantifier la cytokine à l'aide d'un réactif chromogène, le Tétraméthyl Benzidine Dihydrochloride (TMB), dont l'oxydation catalysée par la peroxydase donne une coloration bleue.

Le protocole expérimental décrit figure 19 permet la quantification des cytokines.

Sensibilisation de la plaque

100 µL/puits d'anticorps de capture dilué dans du tampon de coating
→ une nuit à 4°C



3 lavages au PBS Tween 20 0,1 %



Blocage des sites

200 µL/puits d'assay diluent
→ 1 h à température ambiante



3 lavages au PBS Tween 20 0,1 %



Ajout des échantillons

100 µL/puits d'échantillon dilué dans l'assay diluent si nécessaire
→ 2 h à température ambiante



5 lavages au PBS Tween 20 0,1 %



Ajout de la solution de détection

100 µL/puits de « détecteur de travail » dilué dans l'assay diluent
→ 1 h à température ambiante



7 lavages avec 30 sec à 1 min d'attente avec le tampon de lavage PBS Tween 20 0,1 %



Ajout du substrat de la peroxydase du raifort

100 µL/puits de TMB
→ 30 min à température ambiante dans le noir et sans sceller la plaque



Arrêt de la réaction

50 µL/puits de solution stop



Lecture au lecteur de microplaque

Lecture des puits à 450 nm puis soustraire la valeur à 570 nm (PowerWave XS, BIOTEK)

Tampon de coating : 0,1 M Carbonate de sodium pH 9,5, pour 1 L

- NaHCO₃ : 8,40 g
- Na₂CO₃ : 3,56 g

Tampon phosphate PBS : 10 X, pour 1 L

- NaCl : 80,0 g
- Na₂HPO₄ : 11,6 g
- KH₂PO₄ : 2,0 g
- KCl : 2,0 g

→ Pour obtenir la concentration 1 X, diluer avec de l'ED, ajuster le pH à 7,0

Assay diluent : PBS 1 X + 10 % de SVF, pH 7,0, pour 100 mL

- 90 mL d'ED
- 10 mL de SVF

Solution de détection

- anticorps de détection biotinylé
- peroxydase du raifort couplée à l'avidine

Solution stop

- 1 M H₃PO₄ ou 2 N H₂SO₄

Figure 19 : Protocole ELISA sandwich pour les mesures des concentrations des cytokines étudiées (IL-1β, IL-8, IL-6, TNF-α, IL-10 et IL-12)

Les concentrations en cytokines sont déterminées par établissement d'une gamme d'étalonnage à l'aide de cytokines recombinantes standard (BD Biosciences, San Diego). Les dilutions optimales des échantillons ont été au préalable déterminées pour chacune des conditions expérimentales (Tableau 7).

Tableau 7 : Dilutions optimales des milieux de cultures pour chaque condition expérimentale pour les cellules THP-1 ayant été différenciées pendant 48 heures, pour la détermination des concentrations en cytokines selon les gammes définies ci-dessous. Gammes d'étalonnages des différentes cytokines : IL-1 β , de 7,8125 à 250 pg/mL ; IL-6, de 9,375 à 300 pg/mL ; IL-8, de 3,125 à 200 pg/mL ; TNF- α , de 9,375 à 300 pg/mL.

Condition	24 heures	24 heures + 24 heures	24 heures + 24 heures LPS
Témoin	1/1 pour IL-1 β , IL-6 et TNF- α 1/20 pour IL-8	1/1 pour IL-1 β , IL-6 et TNF- α 1/5 pour IL-8	1/5 pour IL-1 β , IL-6 et TNF- α 1/500 pour IL-8
CB	1/1 pour TNF- α 1/2 pour IL-1 β et IL-6 1/20 pour IL-8	1/1 pour TNF- α 1/2 pour IL-1 β et IL-6 1/5 pour IL-8	1/5 pour IL-1 β , IL-6 et TNF- α 1/500 pour IL-8
ufCB	1/1 pour IL-1 β , IL-6 et TNF- α 1/20 pour IL-8	1/1 pour IL-1 β , IL-6 et TNF- α 1/5 pour IL-8	1/1 pour TNF- α 1/5 pour IL-1 β et IL-6 1/100 pour IL-8
PM_{2,5}	1/1 pour IL-1 β , IL-6 et TNF- α 1/200 pour IL-8	1/1 pour IL-1 β , IL-6 et TNF- α 1/20 pour IL-8	1/5 pour IL-1 β , IL-6 et TNF- α 1/500 pour IL-8

II.5. Evaluation du stress oxydant

II.5.1. Dosage des protéines

Le dosage des protéines est réalisé à l'aide de la technique de Smith (Smith *et al.*, 1985). Les ions Cu²⁺ forment des complexes avec les protéines en milieu alcalin avec lesquels l'acide bicinchoninique (SIGMA, B9643) va réagir en prenant une couleur pourpre. L'avantage de cette technique est l'absence de réaction du réactif avec les détergents tels que le Sodium Dodécyl Sulfate (SDS) ou le Triton utilisés lors de la lyse des cellules. Le dosage est réalisé en microplaque, à 25 μ L d'échantillon sont ajoutés 200 μ L de mélange réactionnel (98 % de solution d'acide bicinchoninique avec 2 % d'une solution de sulfate de cuivre II

pentahydraté à 4 % (m/v)). Ce mélange est ensuite incubé 20 min à 37°C avant de mesurer l'absorbance à 560 nm. Afin de déterminer les concentrations en protéines, une gamme d'étalonnage est réalisée à l'aide de solutions de SAB de 0 à 1 mg/mL.

II.5.2. Mesure du potentiel oxydant

L'intérêt de cette technique dans notre étude, est de mesurer le potentiel oxydant de différentes suspensions de particules dans un système acellulaire, en vue d'évaluer le caractère oxydant des suspensions de particules. Le principe de cette technique est le suivi de l'oxydation du DCFH (2',7'-Dichlorofluorescein) par la suspension de particules en présence de HRP (Horseradish Peroxidase ou Peroxydase de Raifort, SIGMA, P6782) par fluorimétrie (Cary Eclipse, VARIAN) pendant une durée de 500 s à une longueur d'onde d'excitation de 485 nm et une longueur d'émission de 530 nm.

Vingt cinq μL de DCFH-DA (2',7'-Dichlorofluorescein, SIGMA, D6883) à 1 mM dans de l'éthanol sont hydrolysés en ajoutant 100 μL de NaOH à 0,01 N à l'obscurité. Après 30 minutes d'incubation à température ambiante, l'ajout de 375 μL de PBS permet de stopper la réaction. Cette solution est utilisée extemporanément. Dans une cuve en quartz, contenant 1,4 mL de solution de SAB à 0,1 % (à 37°C) et 50 μL d'HRP (à 4 U/mL), 400 μL de la solution de DCFH sont ajoutés. Le suivi de la réaction est réalisé dès l'addition des 400 μL de DCFH. Après 100 s de mesure, 200 μL de la suspension de particule (préalablement mis en suspension à l'aide d'un bain à ultrasons) sont ajoutés. Une fois la cinétique terminée (500 s), la pente de l'oxydation sur la période de 100 à 500 s ($d\text{Fluo}/dt$) est calculée et définie comme le potentiel oxydant de la suspension de particules (Foucaud *et al.*, 2007).

II.5.3. Dosage du glutathion

Le dosage du glutathion total (GSH+GSSG) et du glutathion oxydé (GSSG) est réalisé par réaction avec le 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) (DNTB) suivi d'un recyclage enzymatique par la glutathion reductase (GR). Le glutathion total est dosé par réaction avec le DNTB. Le GSSG est dosé après blocage du GSH (glutathion réduit) par le 2-vinyl-pyridine suivi de la réaction avec le DTNB. La réaction cinétique est suivie à 405 nm (Baker *et al.*, 1990).

Les cellules ($5 \cdot 10^6$ cellules) sont centrifugées pendant 5 min à 150 g, le culot est remis en suspension dans 250 μL de PBS à 4°C. 50 μL sont nécessaires pour le dosage des protéines. Au 200 μL restant, 50 μL de PBS-SSA 5 % (5-sulfosalicylic acid) sont ajoutés afin de lyser les cellules pendant 15 min sur glace. Le lysat est centrifugé à 14 000 g pendant 5 min à 4°C et le surnageant est conservé à -20°C.

Pour le dosage du GSSG, à 200 μL de l'échantillon, 6 μL de 2-vinylpyridine sont ajoutés puis 10 μL de triéthanolamine diluée au $\frac{1}{2}$ dans de l'eau ultra pure. 75 μL de ce mélange sont transférés dans une microplaque de 96 puits et 150 μL /puits de mélange réactionnel (3 mL de NADPH à 1 mM, 13,3 U de Glutathion Reductase, 7,75 mL de tampon phosphate de potassium 0,1 M + EDTA 1 mM et 2,5 mL de DNTB) sont additionnés. Le suivi de la cinétique de la réaction est réalisé immédiatement pendant une durée de 10 à 15 min par mesure de l'absorbance à 405 nm.

Pour le dosage du GSH, 10 μL d'échantillon et 190 μL de mélange réactionnel par puits sont utilisés. Le suivi de la cinétique de réaction est réalisé comme pour le dosage du GSSG.

Les résultats obtenus sont comparés à une gamme d'étalonnage préparée à partir de GSSG (de 0 à 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) sur la même microplaque pour chaque dosage.

II.5.4. Etude du niveau d'expression de la HO-1 par Western Blotting

L'immunomarquage permet de mettre en évidence une ou plusieurs protéines (simple ou double marquage) aussi bien membranaires qu'intracellulaires par l'utilisation d'un fluorochrome porté par un anticorps. L'anticorps primaire se fixe sur la protéine d'intérêt et l'anticorps secondaire, qui porte le fluorochrome se fixe spécifiquement sur le premier anticorps.

II.5.4.1. Préparation des protéines totales

Les extraits protéiques nécessaires à l'analyse de l'expression des protéines par Western blotting sont réalisés à partir de $1 \cdot 10^7$ cellules.

Les cellules sont lavées deux fois avec un tampon PBS froid par centrifugations successives (5 min, 150 g) puis reprises dans 150 µL de tampon de lyse à pH = 8 (Tris 20 mM, NaCl 137 mM) contenant un mélange d'antiprotéases (chymostatine, leupeptine, aprotinin, antipain à 5 mg/l et E64 à 1 mg/l). Le lysat cellulaire est homogénéisé par sonication (3 fois 10 s), puis centrifugé pendant une minute à 14 000 x g. 25 µl du surnageant recueilli sont utilisés pour le dosage des protéines.

II.5.4.2. Migration et transfert sur membrane PVDF

Quatre vingt dix µg pour la détection de la HO-1 et 20 µg pour la détection de la β-actine de protéines totales par échantillon sont séparés par SDS-PAGE (Sodium Dodécyl Sulfate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis) sur un gel à 12 % de polyacrylamide dans des conditions dénaturantes :

- Gel de séparation : 2,5 mL de tris HCl (1,5 M pH 8,8), 3,5 mL d'eau ultra pure, 4 mL d'acrylamide/bisacrylamide 30 % et 100 µl de SDS 10 %. La polymérisation se fait grâce à l'ajout de 50 µl d'ammonium persulfate 10 % (w/v) et 7 µL de Temed.
- Gel de concentration : 2,5 mL de tris HCl (0,5 M pH 6,8), 6,1 mL d'eau ultra pure, 1,33 mL d'acrylamide/bisacrylamide 30 % et 100 µl de SDS 10 %. La polymérisation se fait grâce à l'ajout de 50 µl d'ammonium persulfate 10 % (w/v) et 7 µL de Temed.
- Tampon de migration : 50 mL de Tris/glycine/SDS (Biorad) et 450 mL d'eau ultra pure.

Après migration (45 min, 200 V), les protéines sont transférées par électro-transfert (une heure, 100 V) sur une membrane de PVDF (Polyvinylidene fluoride) (Sequi-Blot PVDF Membrane, 0,2 µM, BIORAD) avec pour tampon de transfert : 0,1 % de SDS 10 %, 20 % d'éthanol et 10 % de tris/glycine 10X, complété à l'eau ultra pure.

II.5.4.3. Hybridation avec des anticorps

La membrane est ensuite saturée en SAB par incubation dans une solution de PBS Tween 20 (0,1 %) (PBST) contenant 4 % de SAB, une nuit à 4°C. La membrane est alors incubée pendant deux heures avec l'anticorps primaire anti-HO-1 (Anti-Hem-Oxygenase-1, Stressgen BIOTECHNOLOGIES) dilué au 1/2 000^{ème} dans du PBST et 1 % de SAB ou

l'anticorps primaire β -actine (monoclonal Anti- β -Actine, Clone AC-15, SIGMA) dilué au 1/10 000^{ème}. La membrane est lavée trois fois au PBST avant d'être incubée avec l'anticorps secondaire anti IgG de souris marqué à la peroxydase (Goat Anti-Mouse IgG1, Tebu-Bio) dilué au 1/5 000^{ème} dans une solution PBST pendant une heure.

La révélation des protéines est réalisée par chimioluminescence (Chemiluminescent Peroxidase Substrate-1, SIGMA) par impression sur un film auto radiographique (BioMax Light Film, KODAK). Les films sont numérisés et les intensités relatives des bandes obtenues sont déterminées par analyse densitométrique (Gel Doc 2000, BIORAD).

II.5.5. Détection du HNE par immunohistochimie

II.5.5.1. Hydrolyse du HNE-DA

Le HNE est fourni sous une forme acétal, le (E)-4-Hydroxynonenal-diméthylacétal (HNE-DA) (ALEXIS BIOCHEMICALS), conservé à -20°C sous forme liquide dans du n-hexane. Pour obtenir le HNE, le n-hexane est évaporé sous atmosphère neutre (hélium) à 4°C. De l'HCl à 1 mM (à 4°C) est ajouté pour réaliser l'hydrolyse de la molécule pendant 45 min. Le produit de cette réaction est une solution aqueuse de HNE (pH = 3, solution stable 24 heures à 4°C) dont la concentration est déterminée à 221 nm après dilution au 200^{ème} dans de l'éthanol ($\epsilon = 13\ 100\ \text{mM}\cdot\text{cm}^{-1}$ à 221 nm, dans l'éthanol) (Esterbauer *et al.*, 1991). Une solution mère à 5 mM est préparée dans de l'éthanol pour les traitements. Cette solution est diluée selon les besoins pour être ajoutée dans les expériences à hauteur de 1 %.

II.5.5.2. Immunohistochimie et observations au microscope confocal

Des cellules THP-1 non différenciées à 1.10^6 cellules par mL sont exposées à une concentration de 10 μM de HNE dans le milieu de culture pendant 0 - 0,5 - 1 - 2 - 4 heures ou à des particules ultrafines de carbone à une concentration de 50 $\mu\text{g/mL}$ pendant 0 - 2 - 4 - 12 - 24 heures. Toutes les incubations sont réalisées dans des plaques de 24 puits à raison de 1 mL par puits. Une fois la période d'incubation terminée, les cellules sont rincées deux fois avec du PBS et reprises dans 400 μL de PBS froid. La fixation des cellules et la détection des adduits au HNE sont réalisées selon le protocole expérimental décrit par la figure 20.

Adhésion des cellules THP-1

Sur une lame traitée à la poly-L-lysine,
déposer 5 à 15 μL de suspension de cellules THP-1
→ 45 min à température ambiante



Fixation des cellules THP-1

Recouvrir la lame une solution de para-
formaldéhyde (4 % dans du PBS à pH 7,3)
→ 10 min à température ambiante sous hotte
→ 2 lavages rapides (10 s) au PBS



Perméabilisation des THP-1

Recouvrir la lame une solution de perméabilisation
→ 10 min à température ambiante sous hotte
→ 2 lavages rapides (10 s) au PBS



Blocage des sites

Recouvrir la lame une solution de PBS SAB 2,5 %
→ 30 min à 37°C
→ 1 lavage rapide (10 s) au PBS + un lavage long (5 min) au PBS



Ajout de l'anticorps I^{aire}

Déposer sur la lame, 5 μL de la solution d'anticorps I^{aire}
→ 45 min à température ambiante
→ 1 lavage rapide (10 s) au PBS + un lavage long (5 min) au PBS



Ajout de l'anticorps II^{aire}

Déposer 10 μL de l'anticorps II^{aire}
→ 30 min à température ambiante
→ 1 lavage rapide (10 s) au PBS + un lavage long (5 min) au PBS



Montage entre lame et lamelle

Déposer 10 μL de solution antifading et mettre du vernis afin d'étanchéifier le montage et
conserver à 4°C

Poly-L-lysine

- SIGMA-ALDRICH , P8920

Solution de perméabilisation : dans du PBS pH 7,3

- 4 % de paraformaldéhyde
- 0,2 % de Triton X-100

Anticorps I^{aire}

- anticorps I^{aire} anti-4-HNE
(OXIS 24327) à 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$

Anticorps II^{aire}

- anticorps II^{aire} (Anti Mouse
IgG-FITC (Fluorescein
isothiocyanate), UPTIMA
UP382510) diluée au 1/50^{ème}

Antifading

- 1 mL de Tris HCl à 200 mM
- 9 mL de glycérol
- 0.233 g de DABCO

Figure 20 : Protocole de marquage d'immunocytologie pour la mise en évidence des adduits aux HNE

Les observations des lames en vue de mettre en évidence la formation de HNE par l'observation des adduits HNE ont été réalisées au laboratoire du Campus Limpertsberg à Luxembourg Ville par l'utilisation d'un microscope confocal (LSM 510 META, ZEISS). Les observations réalisées en fluorescence nécessitent pour le fluorochrome FITC d'utiliser une longueur d'onde d'excitation de 496 nm et une longueur d'onde d'émission de 521 nm.

II.6. Analyses statistiques des résultats

Les résultats correspondent à la moyenne \pm écart type de 3 ou 4 valeurs indépendantes. Pour vérifier que l'échantillonnage suit la loi normale, les tests de Kolmogorov-Smirnov et de Lillefords ($p < 0,05$) ont été effectués. Après vérification de la normalité de la distribution, les échantillons sont comparés par une ANOVA à un facteur ou deux facteurs ($p < 0,05$) selon les expériences. Si une différence significative entre les échantillons est observée, le test de Tukey ($p < 0,05$ ou $p < 0,01$) est réalisé pour déterminer entre quels échantillons se situe la différence.

III. RESULTATS

III.1. Caractérisation des particules

III.1.1. Réalisation des suspensions de PM_{2,5}

III.1.1.1. Choix du filtre

Avant de débiter la campagne de prélèvement, un certain nombre de paramètres relatifs à l'appareillage utilisé ont dû être calibrés. La première contrainte, compte tenu de la durée imposée du prélèvement de 7 jours, a été de sélectionner un type de filtre qui ne colmate pas durant ce laps de temps. A cet égard, les seuls filtres possibles sont en quartz, téflon et nitrocellulose. La deuxième contrainte est la résistance aux conditions utilisées pour la remise en suspension des particules. Pour cela, différents protocoles de récupération des PM_{2,5} sur ces 3 types de filtres ont été testés (Tableau 8). Le premier protocole utilise un bain à ultrasons (BRANSONIC) : le filtre est placé dans un bécher contenant de l'eau ultra pure et est soumis à une sonication pendant de 2 heures. Le second protocole utilise une sonde à ultrasons, le filtre est placé dans un tube en verre avec 26 mL d'eau ultra pure, la sonication dure 2 fois 6 minutes. Les protocoles sont testés sur des filtres avec particule, mais aussi sans particules. Les résultats de cette expérience ont permis (Tableau 8) de déterminer que le protocole utilisant le bain à ultrason est le plus efficace sur les filtres en nitrocellulose pour récupérer un maximum de particules sans altération visible du filtre. Pour limiter au maximum cette altération visible, la durée du traitement aux ultrasons a été réduite à 2 fois 7 minutes.

III.1.1.2. La campagne de prélèvements

La campagne de prélèvement, réalisée avec un Partisol, Model 2000 Air Sampler, a débuté le 21 septembre 2007, premier jour de l'automne pour se terminer le 19 septembre 2008. Tous les 7 jours, les filtres ont été changés. Pour chaque saison, 12 filtres ont été collectés, soit 48 filtres sur toute l'année légale. Le graphique représente la concentration dans l'atmosphère en PM_{2,5} calculée à partir des différences de pesées des filtres avant et après prélèvement rapportées au volume total d'air prélevé mesuré par le Partisol (Figure 19).

Tableau 8 : Tests de deux protocoles de traitement aux ultrasons pour la récupération des PM_{2,5} sur différents types de filtres

Types de filtres			Traitements			
Matière	Porosité (µm)	Distributeur	<i>Bain à ultrasons</i>		<i>Sonde à ultrasons</i>	
			<i>Filtre vierge</i>	<i>Filtre avec particules</i>	<i>Filtre vierge</i>	<i>Filtre avec particules</i>
Fibre de verre	1,2	Sartorius	relargage de fibre	COLMATAGE	relargage de fibres filtre abîmé	COLMATAGE
Quartz			relargage de quartz	relargage de quartz filtre très altéré pas ou peu de décrochage de particules	fibres de quartz dans le milieu filtre abîmé	
Téflon	0,45	Pallflex	fibres de téflon dans le milieu	relargage de téflon filtre altéré pas ou peu de décrochage de particules	relargage de fibres de téflon	relargage de téflon filtre abîmé pas ou peu de décrochage de particules
Nitro-cellulose	8	Sartorius	pas de relargage visible filtre intact	filtre peu altéré décrochage important de particules	filtre attiré par la sonde : destruction du filtre	
Poly-carbonate	0,45	Sartorius	COLMATAGE à j=24 h : filtre inutilisable pour un prélèvement de 7 jours			

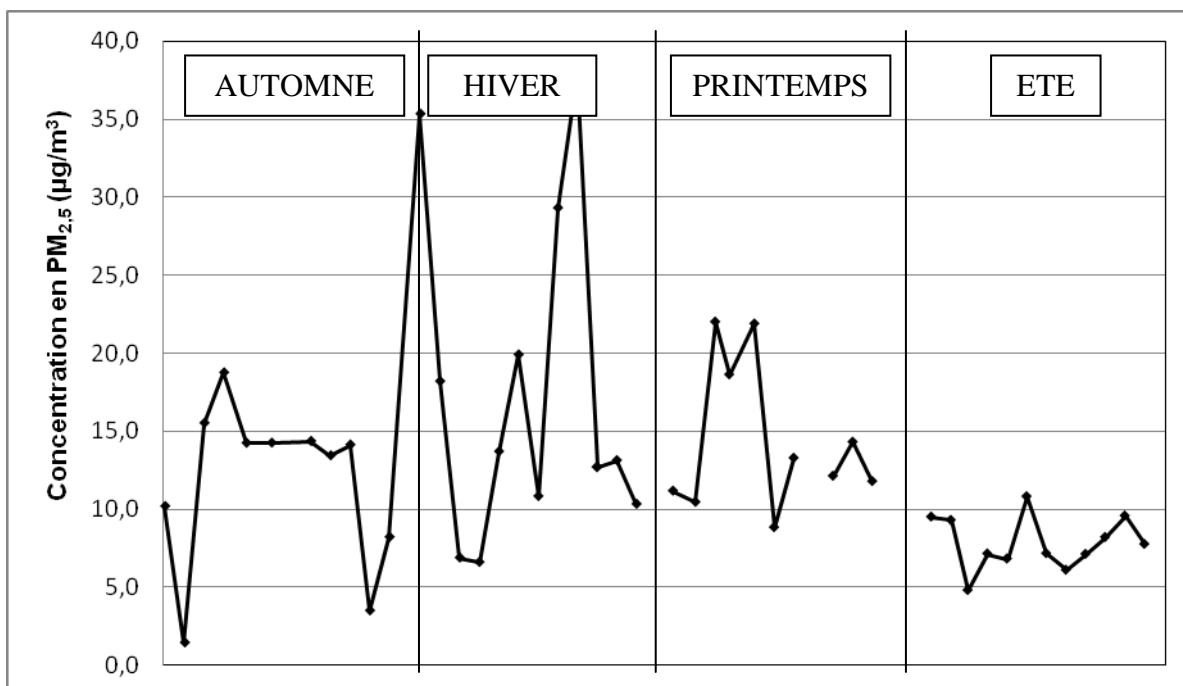


Figure 21 : Concentrations en PM_{2,5} en fonction de la saison (en µg/m³). Déterminées par mesure gravimétrique indirecte des filtres obtenus après prélèvement à l'aide d'un Partisol dans une station mixte de proximité industrielle et routière.

Les résultats montrent une variabilité inter-échantillons importante qui peut en partie s'expliquer par la technique de mesure indirecte gravimétrique employée (Figure 21). On peut tout de même constater une plus forte concentration en PM_{2,5} durant les mois d'hiver et une plus faible concentration durant les mois d'été. Les moyennes sont les suivantes : Automne, $11,6 \pm 5,3 \mu\text{g}/\text{m}^3$; Hiver, $17,9 \pm 10,7 \mu\text{g}/\text{m}^3$; Printemps, $14,5 \pm 4,7 \mu\text{g}/\text{m}^3$ et Été, $7,9 \pm 1,7 \mu\text{g}/\text{m}^3$.

III.1.1.3. La mise en suspension des PM_{2,5}

Les PM_{2,5} sont détachées des filtres par sonication dans un bain à ultrasons et chaque saison est représentée par un lot de 12 filtres afin de réaliser une suspension saisonnière unique. A partir de chacun de ces lots de 12 filtres, une suspension de PM_{2,5} à 5 mg/mL est réalisée (une partie des particules sous forme lyophilisée est conservée à -20°C pour des analyses chimiques ultérieures). Le tableau ci-dessous (Tableau 9) indique la quantité de PM_{2,5} pour chaque lot de 12 filtres et la quantité de PM_{2,5} récupérée à partir de ce lot.

Tableau 9 : Bilan de récupération des PM_{2,5} sur les filtres

Saisons	Masse de PM _{2,5} sur les filtres (mg)	Masse de PM _{2,5} récupérée (mg)	Rendement (%)
Automne	21,83	20,15	92
Hiver	34,44	26,84	78
Printemps	23,38	14,57	62
Eté	15,8	11,77	74

Un lot de 12 filtres vierges a subi le même traitement aux ultrasons, la lyophilisation et une remise en suspension. Ainsi, après lyophilisation, la masse pesée est de 1,47 mg ce qui correspond à la mesure de nitrocellulose dispersée au cours du traitement aux ultrasons. Ce lot est utilisé comme « témoin filtres » dans les expérimentations *in vitro*.

Une fois la remise en suspension dans le tampon salin DPL/SAB effectuée, les quantités de PM_{2,5} sont estimées par une mesure d'absorbance à 340 nm reportée sur une gamme d'étalonnage de particules ufCB (15,625, 31,25, 62,5, 125 et 250 µg/mL). Ainsi, les solutions de PM_{2,5} à 50 µg/mL correspondent en équivalent ufCB à : $34,5 \pm 4,8$ µg/mL pour l'automne ; $35,8 \pm 1,9$ µg/mL pour l'hiver ; $34,8 \pm 1,6$ µg/mL pour le printemps et $33,4 \pm 4,4$ µg/mL pour l'été. Les valeurs obtenues en équivalent ufCB correspondent à environ 65 % des valeurs obtenues par mesures gravimétriques. La différence de concentration entre chaque saison est inférieure à 7 %, il n'y a donc pas d'effet de la saison sur la capacité d'absorption des différentes suspensions obtenues. Compte tenu de la bonne reproductibilité des résultats, les valeurs obtenues par la méthode gravimétrique ont été utilisées pour le calcul des concentrations en PM_{2,5}. Toutefois, la mesure d'absorbance peut être envisagée pour un prélèvement de faible masse. Dans ce cas, un facteur de correction de 1,5 doit être appliqué pour la détermination de la concentration de la suspension.

III.1.2. Composition en HAP et métaux des PM_{2,5}

III.1.2.1. Analyse des métaux

La concentration en métaux a été analysée sur un échantillon collecté en avril 2008. Après une digestion acide du filtre, 12 métaux ont été analysés par ICP-MS (norme : NF EN 14902, X43-026) (Tableau 11).

Tableau 10 : Résultats d'analyses en métaux de PM_{2,5} sur filtre

Métaux	mg/filtre	mg/g de PM_{2,5}
Al	3,2920	1,9029
Ti	<0,1250	<0,1250
V	<0,1250	<0,1250
Cr	<0,1250	<0,1250
Mn	1,0420	0,6023
Fe	24,9950	14,4480
Ni	0,1289	0,0745
Cu	0,3030	0,1751
Zn	6,9350	4,0087
As	0,0486	0,0281
Cd	0,0691	0,0400
Pb	0,6530	0,3759

Parmi les 12 métaux retenus au regard des données de la littérature, 9 d'entre eux ont été détectés à des concentrations supérieures au seuil de sensibilité de la méthode. Les valeurs sont comparables à celles observées pour d'autres PM_{2,5} sans spécificité d'origine. Dans le cas de l'échantillon prélevé, une teneur élevée en métaux supérieure aux valeurs habituellement retrouvées était suspectée du fait de la proximité d'un site sidérurgique. Mais aucune différence significative pour ces métaux n'a été constatée.

Le choix des métaux utilisés pour le dopage des particules modèles de noir de carbone s'est donc appuyé sur des données quantitatives pour le Fer et le Zinc, mais aussi sur le caractère toxique avéré de certains métaux pour le Plomb et le Cuivre.

III.1.2.2. Analyse des HAP

La concentration en HAP a été analysée sur un échantillon collecté en 2005 sur la même station de mesure pour une période de 7 jours (Tableau 10).

Tableau 11 : Résultats d'analyses en HAP de PM_{2,5} sur filtre

HAP	µg/filtre	µg/g de PM_{2,5}
Phénanthrène	<0,008	<6,075
Anthracène	<0,008	<6,075
Fluoranthène	<0,02	<15,190
Pyrène	<0,02	<15,190
Benzo(a)anthracène	0,022	16,709
Chrysène	0,026	19,747
Benzo(b)fluoranthène	0,062	47,089
Benzo(k)fluoranthène	0,022	16,709
Benzo(a)pyrène	0,025	18,987
Indenol(1,2,3-c,d)pyrène	0,021	15,949
Benzo(g,h,i)perylène	<0,02	<15,190

Onze HAP différents ont été détectés dont 5 à l'état de trace. Les 6 HAP les mieux représentés sont classiquement retrouvés sur les PM_{2,5} quel que soit leur origine. Dans notre cas, on constate que les valeurs estimées sont relativement similaires entre elles. Le Benzo(a)anthracène, le benzo(k)fluoranthène et le indenol(1,2,3-c,d)pyrène sont présents à des concentrations d'environ 16 µg de HAP par g de PM_{2,5}, le chrysène et le benzo(a)pyrène à une concentration d'environ 19 µg de HAP par g de PM_{2,5} et le benzo(b)fluoranthène à une concentration en moyenne 2,5 fois plus élevée que les autres HAP mesurables (47 µg/g de PM_{2,5}).

Ainsi, au vu de ces résultats et des données de la littérature, 3 HAP ont été sélectionnés pour le dopage des particules modèles de noir de carbone (CB et ufCB) : le benzo(b)fluoranthène (B[b]f) pour son importance quantitative, le benzo(a)pyrène (B[a]p) pour son effet toxique avéré et le pyrène (Pyr) pour le peu d'études portant à son sujet.

III.1.3. Particules de noir de carbone

III.1.3.1. Données de la littérature : caractéristiques des CB et ufCB

Pour rappel, deux types de particules de noir de carbone sont utilisés. Les Huber 990 (H. Haefner & Co. Ltd (Chepstow, Angleterre), avec un diamètre variant entre 129 nm et 592 nm (diamètre moyen de 260 ± 13,7 nm). Ces particules sont dites fines. Les Printex 90

(Degussa, Frankfurt, Allemagne), ont un diamètre compris entre 7,7 nm et 28,2 nm (diamètre moyen $14,3 \pm 0,6$ nm), se sont des particules ultrafines (Tableau 3 p.54) (Stone *et al.*, 2000).

III.1.3.2. Dopages des particules de noir de carbone

III.1.3.2.1. Dopage des particules avec des métaux

La capacité d'adsorption des métaux sur les particules a été vérifiée sur des particules ufCB dopées avec une concentration théorique de 20 mg de fer par gramme de particule. Après une digestion acide des particules, la concentration en fer de l'échantillon a été analysée, par ICP-MS (norme : NF EN 14902, X43-026). Ainsi, la concentration effective en fer sur les particules est de 18,7 mg/g. Le dopage en fer sur des particules ufCB est donc efficace à près de 95 %. À la vue de ce résultat, on peut penser que le dopage avec d'autres métaux (à des concentrations inférieures) est aussi efficace.

III.1.3.2.2. Dopage des particules avec des HAP

Afin de vérifier la capacité d'adsorption des HAP sur les particules de noir de carbone, un dopage a été réalisé à la concentration de 150 μ g de pyrène par gramme de CB. Après une extraction au soxhlet de 0,49487 g de particule CB, l'échantillon obtenu dissout dans 1,5 mL d'acétonitrile a été analysé par HPLC. L'analyse du chromatogramme révèle la présence de deux pics, le premier a un temps de rétention de 3,15 min correspond à une impureté dans l'acétonitrile ayant servi à dissoudre l'échantillon ; le second pic à 4,157 min correspond au pyrène (Figure 22).

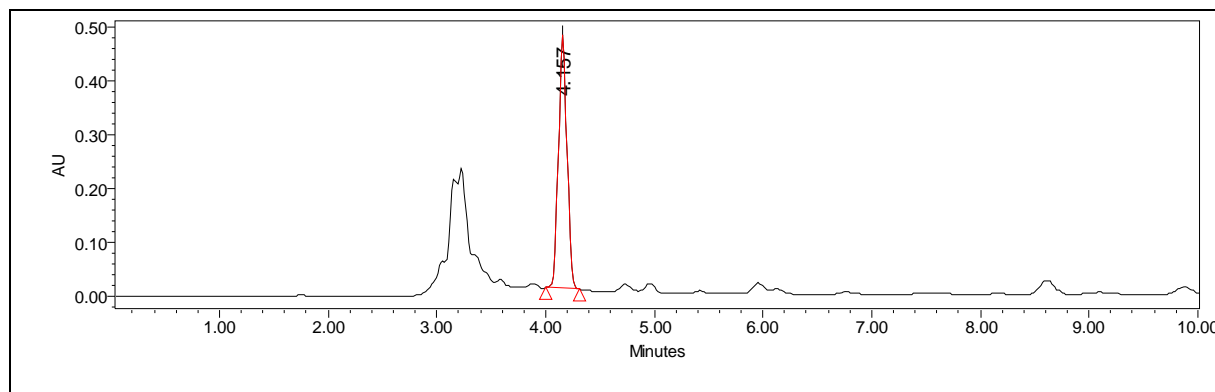


Figure 22 : Chromatogramme correspondant à l'analyse par HPLC des échantillons obtenus à partir des particules dopées en pyrène. Temps de rétention du pyrène : 4,157 min.

La concentration en pyrène a été déterminée à l'aide d'une gamme d'étalonnage de pyrène allant de 2,5 à 80 µg/mL (Figure 23).

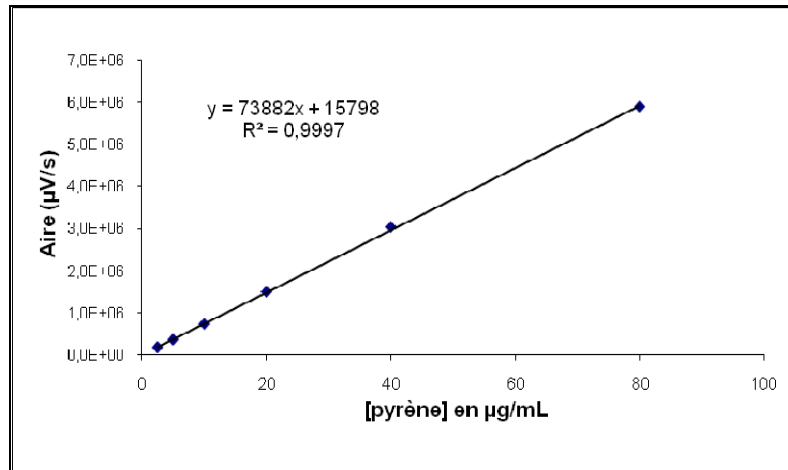


Figure 23 : Gamme d'étalonnage du pyrène réalisée par HPLC. Conditions : phase mobile 100 % acétonitrile à un débit de 1 mL/min à 20°C, méthode isocratique, pression constante de 1000 psi.

La concentration calculée correspond à 34,6 µg/mL, soit 51,9 µg au total pour 0,49487 g de particules CB. Ceci correspond à 104,9 µg de pyrène par gramme de particules CB. Le rendement calculé est donc de 69,9 %. Sachant que le rendement théorique de l'extraction par soxhlet est de l'ordre de 70 % (Gilles Frache, communication personnelle), on peut en conclure que la quasi-totalité du pyrène ajouté en solution s'est adsorbée sur les particules CB. Les particules utilisées pour les mesures *in vitro* ont été dopées à 10 µg/g de particules. On peut donc supposer que dans ce cas l'adsorption des HAP a été totale.

III.2. Effet des particules sur la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires

Afin d'étudier différents aspects de la sécrétion des cytokines, deux protocoles de différenciations ont été utilisés. Les premières expériences concernant les PM_{2,5} et les particules dopées aux métaux ont été réalisées sur des THP-1 différenciées pendant 48 heures avec du PMA à $8 \cdot 10^{-3}$ μ M (Park *et al.*, 2007). Les incubations aux LPS (10 ng/mL) réalisées par la suite sur ces cellules permettent d'induire une réponse immunitaire de type innée. Ce protocole de différenciation n'induit pas de sécrétion basale mesurable d'IL-6 et de TNF- α , et le taux d'IL-1 β est pour sa part proche de la limite de détection du dosage (Tableau 12). Pour l'étude des particules dopées en HAP, le protocole de différenciation consiste en une exposition de 24 heures à $2 \cdot 10^{-1}$ μ M (Zhou *et al.*, 2005) de PMA dans le but d'induire une sécrétion de cytokines mesurable après une exposition aux polluants de 24 heures sans stimulation aux LPS. De même que précédemment, la stimulation aux LPS pour la mesure de l'IL-1 β et l'IL-8 est réalisée à une concentration en LPS de 10 ng/mL. Pour l'IL-10 et l'IL-12, la stimulation est réalisée avec une concentration de 100 ng/mL de LPS (Tableau 12).

Tableau 12 : Sécrétion des cytokines inflammatoires par les cellules THP-1 différenciées avec du Phorbol 12-myristate 13-acétate (PMA). Les THP-1 non différenciées ont été incubées avec du PMA selon deux protocoles pour induire leur différenciation en macrophages. La sécrétion de différentes cytokines par ces cellules différenciées a été mesurée par ELISA dans le surnageant de culture des cellules incubées pendant 24 heures dans du milieu complet et après 24 heures supplémentaires en présence de LPS 10 ng/mL. * pour l'IL-10 et IL-12, la concentration en LPS est de 100 ng/mL. Moyennes \pm écart-types de 3 échantillons indépendants. nd : non détecté, - non déterminé.

Cytokines pg/mL	THP-1 différenciées avec du PMA $8 \cdot 10^{-3}$ μ M pendant 48 h		THP-1 différenciées avec du PMA à $2 \cdot 10^{-1}$ μ M pendant 24 h	
	Après 24h de culture	+ LPS 10 ng/mL pendant 24h	Après 24h de culture	+ LPS 10 ng/mL pendant 24h
IL-1 β	5,9 \pm 0,3	123,8 \pm 2,7	1 485,4 \pm 150,2	7 129,7 \pm 762,3
IL-6	nd	905,2 \pm 27,2	-	-
IL-8	3 050 \pm 100	78 410 \pm 1 840	259 500 \pm 32 500	677 200 \pm 58 900
TNF- α	nd	518,8 \pm 33,9	-	-
IL-10	-	-	nd	14,6 \pm 2,5*
IL-12	-	-	nd	113,3 \pm 30,5*

III.2.1. Effet des PM_{2,5}

Préalablement à la mesure des cytokines sécrétées par les cellules THP-1, un test de viabilité a été réalisé après chaque exposition. Ainsi, les effets des PM_{2,5} récoltées au cours des 4 saisons (2007-2008) sur la viabilité des cellules THP-1 différenciées ont été déterminés par la méthode MTT après une exposition de 24 heures à ces particules. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport aux témoins (Tableau 13). Le « témoin filtre » correspond à des cellules THP-1 différenciées exposées à une suspension récupérée en appliquant le protocole de récupération des particules sur des filtres sans PM_{2,5}.

Après 24 heures d'exposition dans du milieu de culture contenant les PM_{2,5} à 50 µg/mL, aucune altération significative de la viabilité des cellules THP-1 n'a été constatée même si les valeurs sont légèrement plus faibles pour les PM_{2,5} automnales et printanières. La viabilité des cellules exposées aux « témoins filtre » est également légèrement diminuée.

Tableau 13 : Effets des PM_{2,5} sur la viabilité des cellules THP-1

Témoin	Témoin filtre	PM_{2,5} automnales	PM_{2,5} hivernales	PM_{2,5} printanières	PM_{2,5} estivales
100 ± 3	92 ± 3	92 ± 6	100 ± 4	90 ± 7	98 ± 4

Les cellules THP-1 différenciées ont été successivement exposées aux particules PM_{2,5} des différentes saisons, puis à des LPS bactériens à 10 ng/mL. Les concentrations en IL-1β, IL-8, IL-6 et TNF-α ont été mesurées dans le milieu de culture à la fin de la première incubation et à la fin de l'incubation de la stimulation aux LPS (10 ng/mL).

III.2.1.1. Effet des PM_{2,5} prélevées lors des différentes saisons sur la sécrétion d'IL-1β

Les expositions des cellules THP-1 aux PM_{2,5} pendant 24 heures induisent une augmentation significative de la concentration en IL-1β dans le milieu de culture quelque soit la saison considérée. Cependant, l'importance de cette induction dépend de la saison de récolte des particules. Ainsi, les PM_{2,5} hivernales induisent une augmentation de 87 %, les PM_{2,5} printanières et estivales, des augmentations de plus de 300 % alors que les PM_{2,5} automnales induisent une augmentation importante de plus de 1000 % par rapport aux

témoins (Figure 22A). Concernant « la suspension de filtre », elle ne semble pas avoir d'effet sur la sécrétion d'IL-1 β dans ces conditions expérimentales (Figure 24A).

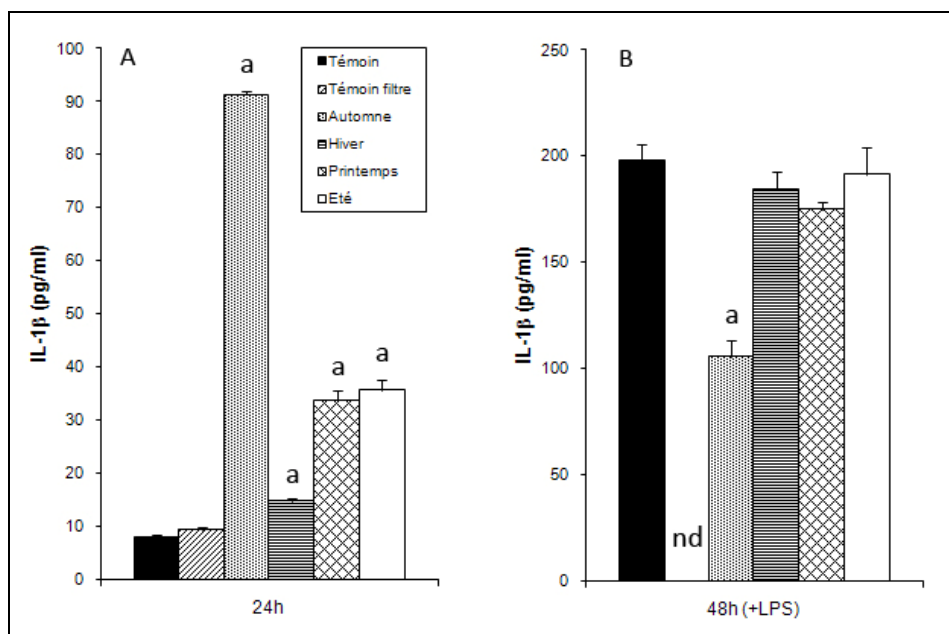


Figure 24 : Effet des PM_{2,5} sur la sécrétion d'IL-1 β par des cellules THP-1 différenciées. Des cellules THP-1 différenciées (PMA à 8.10^{-3} μ M pendant 48 heures) ont été exposées à 50 μ g/mL de PM_{2,5} récoltées en automne 2007, hiver 2008, printemps 2008 et été 2008 pendant 24 heures (A). Le milieu de culture a ensuite été remplacé par du milieu contenant 10 ng/mL de LPS pendant 24 heures d'incubation supplémentaires (B). Les concentrations en IL-1 β ont été déterminées par ELISA sandwich. Valeurs \pm écarts types ($n = 3$). nd : non déterminé. Différence significative (test de Tuckey, $p < 0,05$) a : vs. témoin.

Vingt-quatre heures après la fin de l'exposition aux PM_{2,5} (sans stimulation aux LPS), les concentrations en IL-1 β dans le milieu de culture n'ont pu être mesurées du fait de la limite de détection de 6,570 pg/mL.

Dans toutes les conditions expérimentales, la stimulation aux LPS induit une augmentation de la sécrétion d'IL-1 β . Les cellules témoins exposées aux LPS, sécrètent $197,77 \pm 7,52$ pg/mL d'IL-1 β alors des cellules témoins non stimulées par les LPS sécrètent moins de 7 pg/mL d'IL-1 β (limite de détection) (Figure 24B). Des expositions aux PM_{2,5} dans un premier temps, puis aux LPS dans un second temps n'entraînent pas de modifications des capacités des THP-1 à sécréter l'IL-1 β consécutivement au traitement aux LPS hormis pour les PM_{2,5} automnales. En effet, les PM_{2,5} automnales induisent quand à elle une diminution de 56 % de la sécrétion d'IL-1 β dans le milieu par rapport aux témoins stimulés aux LPS (Figure 24B).

Dans le cas des mesures de la sécrétion de l'IL-1 β , des effets spécifiques de PM_{2,5} automnales ont été constatées. En effet, à 24 heures d'incubation (Figure 24A), ces particules induisent très fortement la sécrétion d'IL-1 β alors qu'après la stimulation aux LPS (Figure 24B), au contraire, elles vont induire une diminution de la sécrétion.

III.2.1.2. Effet des PM_{2,5} prélevées lors des différentes saisons sur la sécrétion d'IL-8

Après une incubation de 24 heures en présence des PM_{2,5} automnales, printanières ou estivales, une augmentation de la concentration en IL-8 a été mesurée dans le milieu de culture des THP-1 différenciées par rapport au milieu des cellules non exposées aux particules. Ces augmentations sont d'environ 50 % pour les PM_{2,5} printanières et estivales et de plus de 650 % pour les PM_{2,5} automnales. Les PM_{2,5} hivernales quant à elles induisent une diminution de 40 % de la concentration d'IL-8. Le témoin filtre induit également une diminution significative de 39 % par rapport aux témoins (Figure 25A).

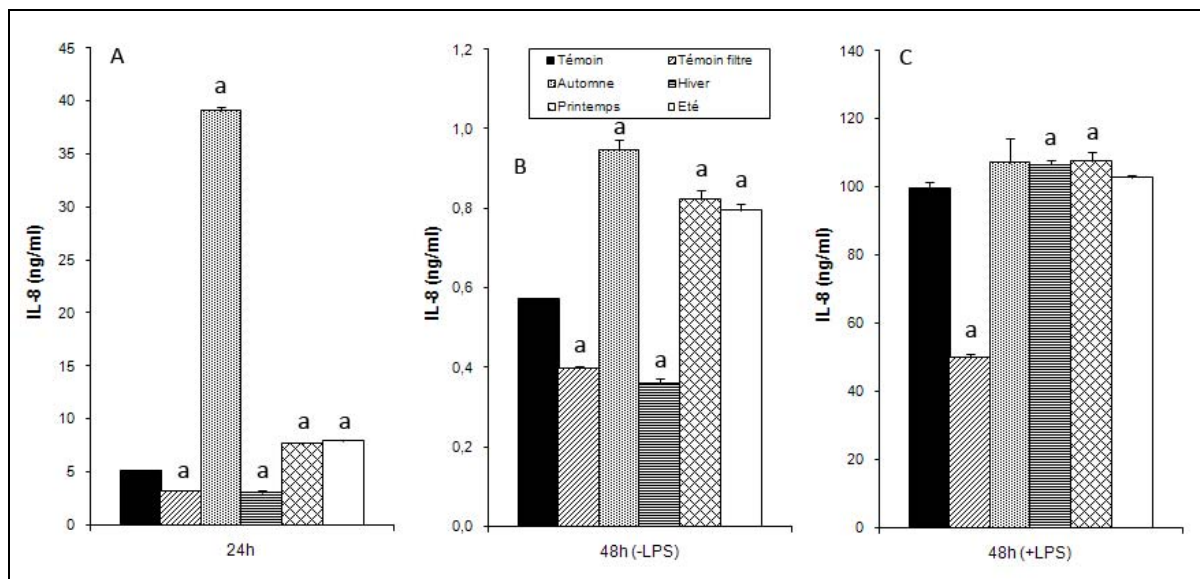


Figure 25 : Effet des PM_{2,5} sur la sécrétion d'IL-8 par des cellules THP-1 différenciées. Des cellules THP-1 différenciées (PMA à $8 \cdot 10^{-3} \mu\text{M}$ pendant 48 heures) ont été exposées à 50 $\mu\text{g/mL}$ de PM_{2,5} récoltées en automne 2007, hiver 2008, printemps 2008 et été 2008 pendant 24 heures (A). Le milieu de culture a ensuite été remplacé par du milieu frais (-LPS) (B) ou par du milieu contenant 10 ng/mL de LPS (+LPS) (C). Les concentrations en IL-8 ont été déterminées par ELISA sandwich. Valeurs \pm écarts types ($n = 3$). Différence significative (test de Tuckey, $p < 0,05$) a : vs. témoin.

Après 24 heures d'incubation supplémentaire dans du milieu sans LPS, les concentrations en IL-8 dans le milieu, quelque soit la condition expérimentale, ont diminué correspondant à des concentrations en générale 5 à 10 fois inférieures par rapport à la

première incubation de 24 heures. Cette diminution est particulièrement élevée pour les PM_{2,5} automnales, en effet la concentration mesurée est 120 fois inférieure (Figures 25A et 25B). Les *primo* expositions aux PM_{2,5} automnales, printanières et estivales entraînent une augmentation de la sécrétion en IL-8 après 24 heures d'exposition sans LPS par rapport aux témoins (respectivement, +67, +44 et +40 %). Au contraire, les PM_{2,5} hivernales, induisent une diminution de 37 % (Figure 25B). Les cellules préalablement exposées aux PM_{2,5} automnales sécrètent autant d'IL-8 que les PM_{2,5} printanières et estivales et non pas près de 10 fois plus comme observé après 24 heures d'expositions aux particules (Figures 25A et 25B). Comme pour les conditions d'expositions de la Figure 25A, le témoin filtre induit une diminution de 30 % de la sécrétion d'IL-8 (Figure 25B).

Quelque soit les conditions expérimentales, la stimulation aux LPS entraînent systématiquement une induction de la sécrétion d'IL-8 (*i.e.*, une augmentation de la concentration de plus de 170 fois a été constatée entre les cellules témoins stimulées aux LPS et celles non stimulées pour une même durée d'incubation, Figures 25B et 25C). La stimulation aux LPS, sur des cellules ayant été exposées préalablement à des PM_{2,5}, entraînent une très légère augmentation de sécrétion en IL-8 de moins de 10 %. Toutefois, si on considère le témoin filtre, cette augmentation est très significative et correspond à environ 115 %, quelque soit la saison (Figure 25C).

III.2.1.3. Effet des PM_{2,5} prélevées lors des différentes saisons sur la sécrétion d'IL-6

La première incubation de 24 heures avec tous les types de PM_{2,5} n'a pas entraîné d'induction de sécrétion mesurable d'IL-6 (seuil de détection de 7,833 pg/mL). Il en est de même 24 heures après la fin de l'exposition aux particules (sans stimulation aux LPS).

Les cellules témoins exposées aux LPS, sécrètent $779,81 \pm 24,30$ pg/mL d'IL-6 alors que des cellules témoins non stimulées par les LPS sécrètent moins de 8 pg/mL d'IL-6 (limite de détection). Pour chaque exposition aux PM_{2,5}, l'incubation avec des LPS qui suit, induit une augmentation de la sécrétion d'IL-6. (Figure 26). Une exposition préalable aux PM_{2,5} hivernales, printanières et estivales affecte la sécrétion d'IL-6 suite à une stimulation des cellules par les LPS. En effet, une augmentation allant de 19 à 28 % de la sécrétion d'IL-6 a été mesurée par rapport aux cellules témoins non exposées à ces PM_{2,5} et stimulées aux LPS.

Concernant les PM_{2,5} automnales, les concentrations en IL-6 sont inférieures de 25 % par rapport aux témoins. Comme pour le dosage de l'IL-1β, le témoin filtre ne semble pas avoir d'effet sur la sécrétion de l'IL-6 (Figure 26).

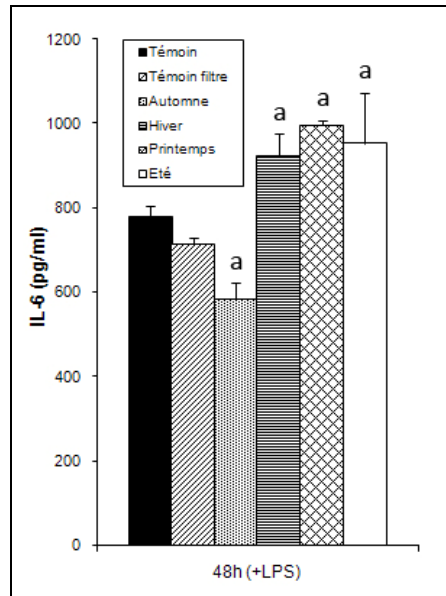


Figure 26 : Effet des PM_{2,5} sur la sécrétion d'IL-6 par des cellules THP-1 différenciées. Des cellules THP-1 différenciées (PMA à 8.10^{-3} μ M pendant 48 heures) ont été exposées à 50 μ g/mL de PM_{2,5} récoltées en automne 2007, hiver 2008, printemps 2008 et été 2008 pendant 24 heures. Le milieu de culture a ensuite été remplacé par du milieu contenant 10 ng/mL de LPS pendant 24 heures d'incubation supplémentaires. Les concentrations en IL-6 ont été déterminées par ELISA sandwich. Valeurs \pm écarts types ($n = 3$). Différence significative (test de Tuckey, $p < 0,05$) a : vs. témoin.

Tout comme avec les mesures de l'IL-1β, les PM_{2,5} automnales se distinguent par un effet inhibiteur sur l'induction de l'IL-6 par rapport aux témoins après la stimulation aux LPS.

III.2.1.4. Effet des PM_{2,5} prélevées lors des différentes saisons sur la sécrétion du TNF- α

Seules les incubations de 24 heures en présence de PM_{2,5} automnales et estivales ont permis de mesurer des concentrations de TNF- α ($58,3 \pm 5,0$ et $18,0 \pm 4,6$ pg/mL respectivement). Pour les autres échantillons, les concentrations étaient inférieures au seuil de détection de 7,833 pg/mL. De même, 24 heures après la fin de l'exposition aux particules (sans stimulation aux LPS), les concentrations en TNF- α dans le milieu de culture n'ont pu être mesurées que pour les expositions de PM_{2,5} automnales et estivales ($9,6 \pm 2,4$ et $10,2 \pm 3,0$ pg/mL respectivement).

Après stimulation de la sécrétion du TNF- α par une incubation en présence de LPS, les cellules préalablement exposées aux PM_{2,5} automnales secrètent moins de TNF- α que les cellules non exposées aux PM_{2,5} (une diminution de 35 % a été mesurée). Au contraire, les pré-expositions aux PM_{2,5} printanières et estivales entraînent une augmentation significative de la sécrétion en TNF- α dans le milieu (respectivement de 38 et 46 %). Enfin, l'exposition préalable aux PM_{2,5} hivernales ne modifie pas les capacités de sécrétions du TNF- α après exposition aux LPS. Comme pour les dosages de l'IL-1 β et de l'IL-6, le témoin filtre ne semble pas avoir d'effet sur la sécrétion de l'IL-6 (Figure 27).

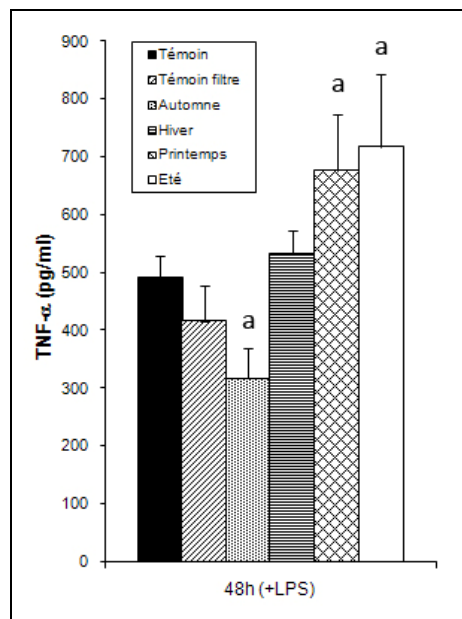


Figure 27 : Effet des PM_{2,5} sur la sécrétion du TNF- α par des cellules THP-1 différenciées. Des cellules THP-1 différenciées (PMA à 8.10^{-3} μ M pendant 48 heures) ont été exposées à 50 μ g/mL de PM_{2,5} récoltées en automne 2007, hiver 2008, printemps 2008 et été 2008 pendant 24 heures. Le milieu de culture a ensuite été remplacé par du milieu contenant 10 ng/mL de LPS pendant 24 heures d'incubation supplémentaires. Les concentrations en TNF- α ont été déterminées par ELISA sandwich. Valeurs \pm écarts types ($n = 3$). Différence significative (test de Tuckey, $p < 0,05$) a : vs. témoin.

Tout comme avec les mesures de l'IL-1 β et l'IL-6 les PM_{2,5} automnale se distinguent car elles induisent une diminution de l'induction du TNF- α par rapport aux témoins après la stimulation aux LPS. De plus, une induction de la sécrétion du TNF- α durant la *primo* exposition de 24 heures a été constatée pour les PM_{2,5} automnales et estivales.

En Résumé :

- Les $PM_{2,5}$ n'altèrent pas ou très faiblement la viabilité des cellules THP-1.
- Les $PM_{2,5}$ induisent la sécrétion d'IL-1 β et IL-8 en 24 heures de manière significative et variable selon la saison.
- Pour l'IL-1 β comme pour l'IL-8 après stimulation par les LPS, la réponse est équivalente aux témoins quelque soit le type de $PM_{2,5}$.
- L'IL-6 et le TNF- α ne sont induit par les $PM_{2,5}$ qu'après une stimulation aux LPS.
- Les $PM_{2,5}$ automnales induisent des modifications très significatives de la sécrétion des cytokines comparés aux autres $PM_{2,5}$.

III.2.2. Effets des métaux adsorbés sur les particules fines et ultrafines de noir de carbone

Les effets des métaux (Fe, Zn, Pb et Cu), des CB, des ufCB dopés ou non en métaux sur la viabilité des cellules THP-1 différenciées ont été déterminés par la méthode MTT après une exposition de 24 heures à ces différents composés et particules. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport aux témoins (Tableau 14).

Tableau 14 : Effets des métaux et des particules (CB et ufCB), seules ou dopées avec des métaux, sur la viabilité des cellules THP-1

	Témoins (sans métaux)	Fe	Zn	Pb	Cu
Solutions de métaux	100 \pm 6	95 \pm 4	97 \pm 7	96 \pm 5	103 \pm 8
CB + métaux	104 \pm 4	98 \pm 4	93 \pm 5	104 \pm 8	100 \pm 8
ufCB + métaux	91 \pm 6	92 \pm 1	91 \pm 5	89 \pm 6	90 \pm 3

Après 24 heures d'exposition dans du milieu de culture contenant les métaux en solution (1 μ g/mL pour le Fe, 0,2 μ g/mL pour le Zn, 20 ng/mL pour le Pb et 10 ng/mL pour le Cu) aucune altération significative de la viabilité des cellules THP-1 n'a été constatée. Suite à des expositions à 50 μ g/mL de particules CB dopées ou non en métaux (20 mg/g de particule pour le Fe, 4 mg/g de particule pour le Zn, 0,4 mg/g de particule pour le Pb et 0,2 mg/g de particule pour le Cu) pendant 24 heures, aucune altération significative de la viabilité des

THP-1 n'a également été constatée bien que les valeurs soient légèrement inférieures concernant les CB dopées au Zn. En revanche, les particules ufCB dopées ou non en métaux induisent toutes une diminution de moins de 10 % de la viabilité des cellules THP-1 par rapport aux cellules témoins.

Les cellules THP-1 différenciées ont été successivement exposées aux métaux seuls (Fe, Zn, Pb ou Cu) ou aux particules (ufCB ou CB) dopées ou non en métaux, puis à des LPS bactérien à 10 ng/mL. Les concentrations en IL-1 β , IL-8, IL-6 et TNF- α ont été mesurées dans le milieu de culture à la fin de la première incubation et à la fin de l'incubation de stimulation par les LPS (10 ng/mL).

III.2.2.1. Effet des métaux, des CB et des ufCB, dopées ou non sur la sécrétion d'IL-1 β

Les expositions des cellules THP-1 aux métaux pendant 24 heures induisent une augmentation significative de la concentration en IL-1 β dans le milieu de culture des cellules exposées au Fe, Zn et Pb. Pour les cellules exposées au Cu, la concentration n'a pu être mesurée du fait de la limite de détection de la technique (3,173 pg/mL) (Figure 28). Ce résultat traduit donc une diminution de la sécrétion d'IL-1 β au moins égale à 50 % par rapport aux témoins (6 pg/mL). Les concentrations en IL-1 β dans le milieu après exposition au Fe, Zn et Pb sont augmentées respectivement de 44 %, 110 % et 27 % par rapport aux témoins. Les cellules THP-1 exposées à des CB pendant 24 heures sécrètent deux fois plus d'IL-1 β que des cellules THP-1 non exposées et il en est de même pour les CB dopées, quelque soit le métal utilisé bien que l'augmentation soit plus importante ou équivalente selon le métal utilisé. Ainsi, avec les CB dopées au Fe et au Zn les augmentations sont respectivement de 202 et 152 % par rapport aux témoins non exposés aux particules. Concernant les ufCB non dopées, ces particules induisent une augmentation significative de la concentration en IL-1 β (+124 %) équivalente à celle constatée pour les CB. De la même façon, les ufCB dopées avec les métaux, induisent des augmentations significatives de 103 à 207 % (valeur maximale observée pour le Zn) après une exposition de 24 heures par rapport à des cellules non exposées à des particules (Figure 28).

Après la première incubation de 24 heures aux particules (CB et ufCB) dopées en métaux, l'induction de la sécrétion semble dépendre du type de métaux adsorbé. Ainsi,

l'augmentation la plus importante a été mesurée après une exposition au Zn et au Fe sur les CB et il n'y a pas d'effet pour le Pb et le Cu.

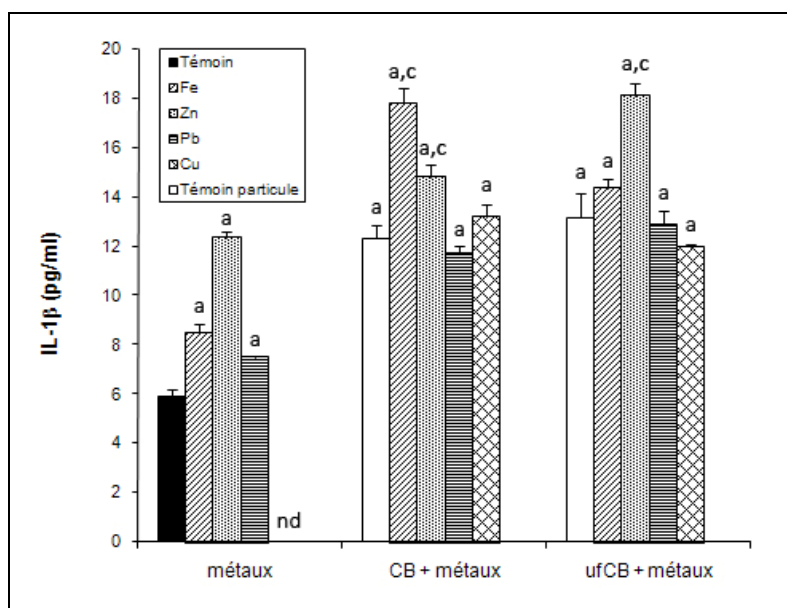


Figure 28 : Effet des métaux, particules (CB et ufCB) et des particules dopées avec des métaux sur la sécrétion d'IL-1β par des cellules THP-1 différenciées. Des cellules THP-1 différenciées (PMA à 8.10^{-3} μ M pendant 48 heures) ont été exposées à 1 μ g/mL de Fe, 0,2 μ g/mL de Zn, 20 ng/mL de Pb, 10 ng/mL de Cu ou 50 μ g/mL de particules (CB ou ufCB) dopées ou non en métaux (20 mg/g de particule pour le Fe, 4 mg/g de particule pour le Zn, 0,4 mg/g de particule pour le Pb et 0,2 mg/g de particule pour le Cu) pendant 24 heures. Les concentrations en IL-1β ont été déterminées par ELISA sandwich. Valeurs \pm écarts types (n = 3). nd : non déterminé. Différence significative (test de Tuckey, p < 0,05) a : vs. témoin, b : vs. CB et c : vs. particules non dopées.

Vingt-quatre heures après la fin de l'exposition aux métaux, particules dopées et non dopées (sans stimulation aux LPS), les concentrations en IL-1β dans le milieu de culture n'ont pu être mesurées du fait de la limite de détection de 3,173 pg/mL.

Dans toutes les conditions expérimentales, la stimulation aux LPS induit une augmentation de la sécrétion d'IL-1β. Les cellules témoins exposées aux LPS, sécrètent plus de 120 pg/mL d'IL-1β alors des cellules témoins non stimulées par les LPS sécrètent moins de 4 pg/mL d'IL-1β (limite de détection) (Figure 29). Des expositions dans un premier temps aux métaux (Fe, Zn et Pb), puis aux LPS dans un second temps, induisent une sécrétion significativement moins importante d'IL-1β (respectivement -32, -24 et -11 %) qu'une exposition aux LPS sans un contact préalable aux métaux. En revanche, pour le Cu, la sécrétion est équivalente (Figure 29). Une exposition préalable aux CB non dopées affecte la sécrétion d'IL-1β après une stimulation des cellules aux LPS ; une diminution de 36 % de la

sécrétion d'IL-1 β a été constatée par rapport aux cellules témoins non exposées aux particules et stimulées aux LPS. Concernant les CB dopées, les concentrations en IL-1 β sont proches de celles qui ont été mesurées avec les CB non dopées. En effet, les diminutions sont comprises entre 22 et 38 % par rapport aux cellules témoins (Figure 29), bien qu'une différence significative ait été montrée entre les cellules exposées aux CB non dopées et les CB dopées au Cu. Concernant les ufCB, les remarques qui peuvent être faites sont similaires à celles faites avec les CB. A savoir que les traitements préalables aux ufCB dopées ou non entraînent après stimulation par les LPS une diminution de la concentration en IL-1 β dans le milieu allant de 31 à 42 % à par rapport aux cellules témoins (Figure 29). De plus, toutes les valeurs de concentrations en IL-1 β sont très similaires quel que soit le type de particules envisagées (CB dopées ou non et ufCB dopées ou non). En effet, toutes les valeurs sont comprises entre 71,22 pg/mL et 96,05 pg/mL (Figure 29) alors que les valeurs des témoins sont de 120 pg/mL environ.

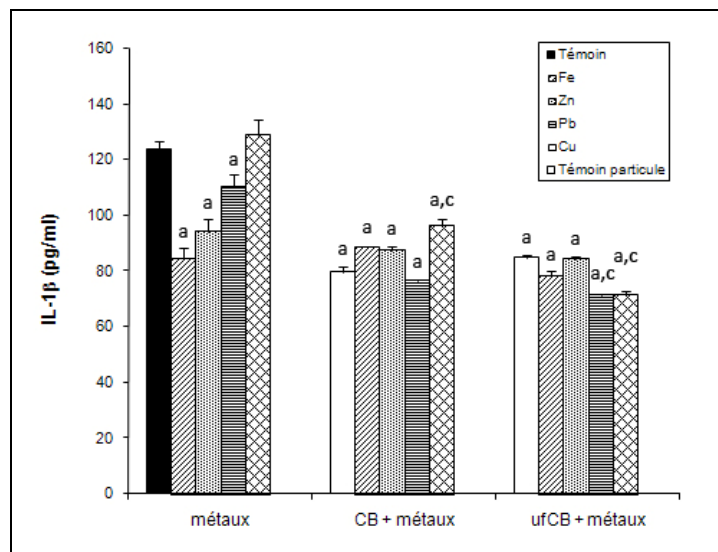


Figure 29 : Effet des métaux, particules (CB et ufCB) et des particules dopées avec des métaux sur la sécrétion d'IL-1 β par des cellules THP-1 différenciées en réponse à une stimulation par des LPS. Des cellules THP-1 différenciées (PMA à 8.10^{-3} μ M pendant 48 heures) ont été exposées à 1 μ g/mL de Fe, 0,2 μ g/mL de Zn, 20 ng/mL de Pb, 10 ng/mL de Cu ou 50 μ g/mL de particules (CB ou ufCB) dopées ou non en métaux (20 mg/g de particule pour le Fe, 4 mg/g de particule pour le Zn, 0,4 mg/g de particule pour le Pb et 0,2 mg/g de particule pour le Cu) pendant 24 heures. Le milieu de culture a ensuite été remplacé par du milieu contenant 10 ng/mL de LPS pendant 24 heures d'incubation supplémentaires. Les concentrations en IL-1 β ont été déterminées par ELISA sandwich. Valeurs \pm écarts types ($n = 3$). Différence significative (test de Tuckey, $p < 0,05$) a : vs. témoin, b : vs. CB et c : vs. particules non dopées.

Après la stimulation aux LPS, les effets ne semblent plus dépendre du type de métal adsorbé. En effet, particules dopées et non dopées induisent une sécrétion similaire en IL-1 β plus faible que les témoins.

D'une manière générale, une induction de l'IL-1 β par un polluant métallique ou particulaire ou les deux conduit à une diminution de la capacité de réponse des cellules à un traitement aux LPS. Ainsi, toute augmentation significative de la sécrétion d'IL-1 β observée après 24 heures d'exposition aux différents polluants c'est traduit par une diminution de la sécrétion de cette même cytokine après le traitement aux LPS en comparaison aux témoins. Ce résultat pourrait suggérer un rétro-contrôle de la sécrétion.

III.2.2.2. Effet des métaux, des CB et des ufCB, dopées ou non sur la sécrétion d'IL-8

Les concentrations de cette cytokine dans le milieu de culture des cellules ont été les plus élevées de toutes les cytokines mesurées (l'unité des figures est en ng/mL contre des pg/mL pour les autres cytokines). Deux des métaux (Zn et Cu) entraînent une légère diminution de la concentration en IL-8 dans le milieu de culture après une incubation de 24 heures par rapport aux témoins (diminution significative de 13 et 23 %) ; les 2 autres métaux (Fe et Pb) présentent des concentrations similaires à celles retrouvées dans les témoins (Figure 30). Les expositions aux particules CB non dopées en métaux, pendant 24 heures induisent une sécrétion importante en IL-8 par rapport aux cellules THP-1 non exposées (augmentation de 84 %). Cette augmentation est encore plus importante lorsque les particules CB sont dopées avec les différents métaux considérés (augmentation de 128 % pour le Fe et d'environ 109 % pour les 3 autres métaux). Dans les milieux de cultures des cellules exposées aux particules ufCB, dopées et non dopées en métaux, la concentration en IL-8 est également significativement plus élevée que les concentrations mesurées dans le milieu des cellules témoins. Ces augmentations sont de 81 % pour les ufCB non dopées et varient de 36 à 93 % pour les ufCB dopées. Dans ce cas, l'augmentation de la concentration en IL-8 semble être dépendante du métal adsorbé sur les particules ufCB (Figure 30). Alors que pour les CB dopées, seuls le Fe adsorbé induit une modification de la réponse de la sécrétion en IL-8.

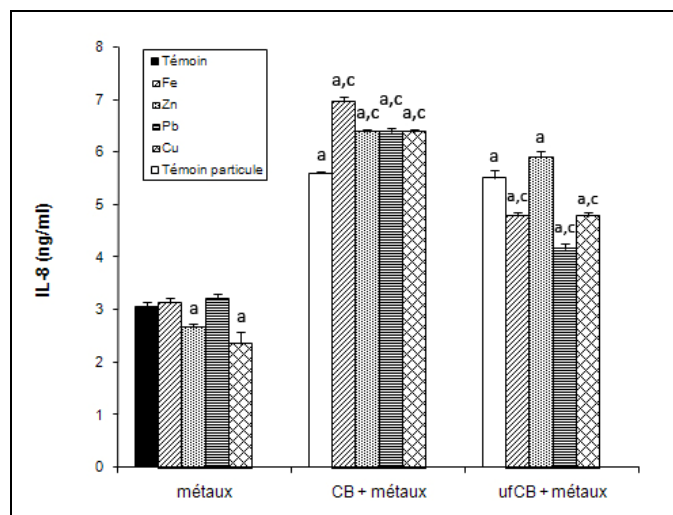


Figure 30 : Effet des métaux, particules (CB et ufCB) et des particules dopées avec des métaux sur la sécrétion d'IL-8 par des cellules THP-1 différenciées. Des cellules THP-1 différenciées (PMA à $8.10^{-3} \mu M$ pendant 48 heures) ont été exposées à $1 \mu g/mL$ de Fe, $0,2 \mu g/mL$ de Zn, $20 ng/mL$ de Pb, $10 ng/mL$ de Cu ou $50 \mu g/mL$ de particules (CB ou ufCB) dopées ou non en métaux ($20 mg/g$ de particule pour le Fe, $4 mg/g$ de particule pour le Zn, $0,4 mg/g$ de particule pour le Pb et $0,2 mg/g$ de particule pour le Cu) pendant 24 heures. Les concentrations en IL-8 ont été déterminées par ELISA sandwich. Valeurs \pm écarts types ($n = 3$). Différence significative (test de Tuckey, $p < 0,05$) a : vs. témoin, b : vs. CB et c : vs. particules non dopées.

Après 24 heures d'incubation supplémentaires dans du milieu sans LPS, les mesures des concentrations en IL-8 dans le milieu, quelques soient les conditions expérimentales, se sont révélées inférieures aux valeurs mesurées après les premières 24 heures post différenciation (Figures 30 et 31A). Concernant les métaux, le Zn, le Pb et le Cu n'induisent pas ou très peu la sécrétion d'IL-8 par rapport aux témoins au contraire du Fe qui lui l'augmente de 73 % (Figure 31A). A propos des CB non dopées, après ces 24 heures d'incubation supplémentaires sans LPS, une augmentation d'environ 59 % a été enregistrée en comparaison à la concentration des cellules témoins non exposées aux CB. Les CB dopées en Pb et Cu induisent une sécrétion d'IL-8 dans le milieu encore plus importante, respectivement de 88 et 79 % ; alors que pour le Fe et le Zn, il y a également induction, mais de moindre importance, à savoir, 26 et 35 % (Figure 31A). L'incubation supplémentaire pour les cellules exposées aux ufCB non dopées induit une sécrétion (+20 %) moins importante que celle induite par les CB. Quant aux ufCB dopées au Fe et au Cu, celles-ci engendrent une diminution de la sécrétion en IL-8 dans le milieu par rapport aux témoins, les ufCB dopées au Pb n'a aucun effet significatif et les ufCB dopées au Zn, elles induisent une légère augmentation de 24 % (Figure 31A).

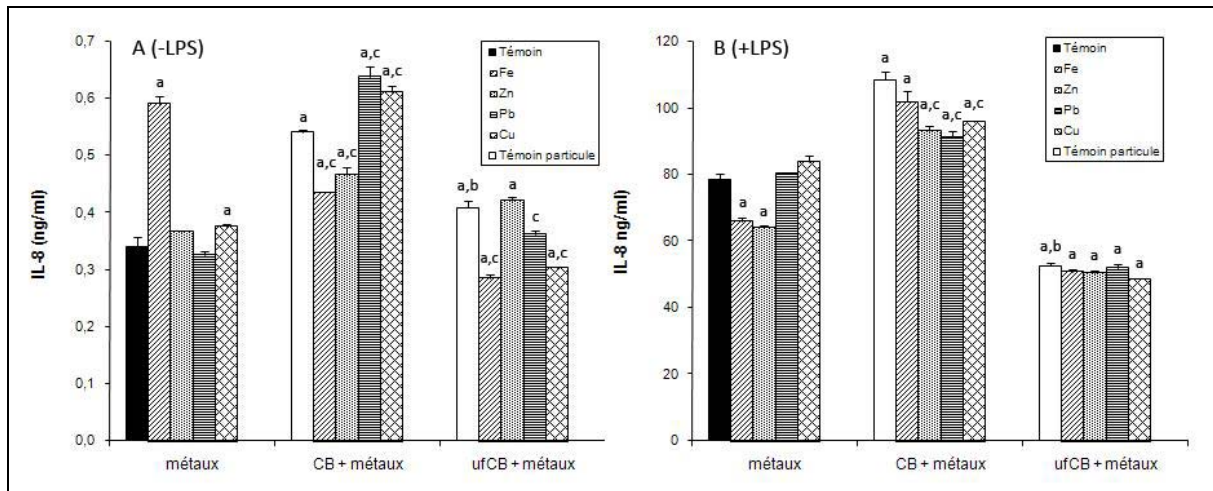


Figure 31 : Effet des métaux, particules (CB et ufCB) et des particules dopées avec des métaux sur la sécrétion d'IL-8 par des cellules THP-1 différenciées en réponse à une stimulation par des LPS. Des cellules THP-1 différenciées (PMA à 8.10^{-3} μ M pendant 48 heures) ont été exposées à 1 μ g/mL de Fe, 0,2 μ g/mL de Zn, 20 ng/mL de Pb, 10 ng/mL de Cu ou 50 μ g/mL de particules (CB ou ufCB) dopées ou non en métaux (20 mg/g de particule pour le Fe, 4 mg/g de particule pour le Zn, 0,4 mg/g de particule pour le Pb et 0,2 mg/g de particule pour le Cu) pendant 24 heures. Le milieu de culture a ensuite été remplacé par du milieu complet (-LPS) (A) ou par du milieu complet contenant 10 ng/mL de LPS (+LPS) (B) pendant 24 heures d'incubation supplémentaires. Les concentrations en IL-8 ont été déterminées par ELISA sandwich. Valeurs \pm écarts types ($n = 3$). Différence significative (test de Tuckey, $p < 0,05$) a : vs. témoin, b : vs. CB et c : vs. particules non dopées.

Quelque soit l'exposition préalable aux métaux ou aux différentes particules, l'addition de LPS pendant 24 heures entraîne systématiquement une induction importante de la sécrétion d'IL-8 comparée aux cellules non traitées aux LPS (*i.e.*, une augmentation de la concentration de 230 fois a été constatée entre les cellules témoins stimulées aux LPS et celles non stimulées pour une même durée d'incubation, Figures 31A et 31B). Selon le type de métaux testé, aucun effet significatif n'est observé pour le Pb et le Cu sur la sécrétion d'IL-8 par rapport aux témoins ; pour le Fe et le Zn, on constate au contraire une légère diminution mais significative des concentrations en IL-8 (respectivement de 16 et 19 %) (Figure 31B). Les sécrétions en IL-8, dues à la stimulation par les LPS des cellules préalablement exposées à des CB dopées et non dopées, sont toutes supérieures à la concentration mesurée dans les cellules témoins non exposées aux particules ; à savoir +38 % pour les CB non dopées et de +26 à +29 % pour les CB dopées selon le type du métal adsorbé (Figure 31B). Alors que lors de la première incubation de 24 heures (Figure 30), les ufCB dopées et non dopées induisaient une sécrétion accrue d'IL-8 dans le milieu par rapport au témoin, après l'incubation supplémentaire de 24 heures en présence de LPS, c'est une diminution des sécrétions par rapport aux témoins qui est constatée. Ainsi, les diminutions de sécrétion d'IL-8 dans le

milieu des cellules ayant été exposées à des ufCB dopées ou non dopées, puis stimulées aux LPS, sont de 33 à 38 % (Figures 31A et 31B).

III.2.2.3. Effet des métaux, des CB et des ufCB, dopées ou non sur la sécrétion d'IL-6

La première incubation de 24 heures avec les métaux, les CB et ufCB dopées et non dopées n'a pas engendrée d'induction de sécrétion mesurable d'IL-6 par la méthode ELISA utilisée (seuil de détection de 3,807 pg/mL). Vingt-quatre heures après la fin de l'exposition aux métaux, particules dopées et non dopées (sans stimulation par les LPS), les concentrations en IL-6 dans le milieu de culture n'ont également pas pu être mesurées du fait de la limite de détection.

Dans toutes les conditions expérimentales, la stimulation aux LPS induit une augmentation de la sécrétion d'IL-6 permettant sa quantification. Les cellules témoins exposées aux LPS, sécrètent plus de 900 pg/mL d'IL-6 alors que ces cellules témoins non stimulées par les LPS sécrètent moins de 4 pg/mL d'IL-6 (limite de détection) (Figure 32). Des expositions au Fe et au Zn dans un premier temps, puis aux LPS dans un second temps, induisent une sécrétion significativement moins importante d'IL-6 (respectivement -29 et -20 %) qu'une exposition aux LPS sans un contact préalable aux métaux. Pour le Pb et le Cu, la sécrétion est équivalente aux témoins (Figure 32). Une exposition préalable aux CB non dopées induit une sécrétion d'IL-6 plus importante après une stimulation des cellules aux LPS. En effet, une augmentation de 51 % de la sécrétion d'IL-6 a été mesurée par rapport aux cellules témoins non exposées aux particules et stimulées aux LPS. Concernant les CB dopées, les concentrations en IL-6 sont inférieures à celles qui ont été mesurées avec les CB non dopées. Cependant, elles restent toujours supérieures à la concentration du témoin, sauf dans le cas du Fe qui n'induit pas d'augmentation de sécrétion par rapport aux témoins (Figure 32). Concernant les ufCB non dopées, les mesures réalisées dans les mêmes conditions expérimentales révèlent également une augmentation de l'induction de la sécrétion d'IL-6 de 36 %. Contrairement aux CB dopées qui induisent dans une moindre mesure la sécrétion d'IL-6 par rapport aux CB non dopées, les ufCB dopées induisent plus fortement (Zn et Pb), ou de la même manière (Fe et Cu), la sécrétion d'IL-6 que les ufCB non dopées (Figure 32).

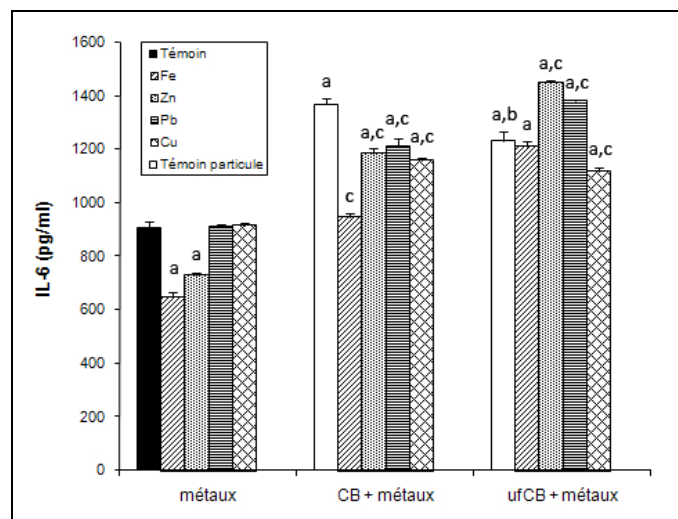


Figure 32 : Effet des métaux, particules (CB et ufCB) et des particules dopées avec des métaux sur la sécrétion d'IL-6 par des cellules THP-1 différenciées en réponse à une stimulation par des LPS. Des cellules THP-1 différenciées (PMA à 8.10^{-3} μ M pendant 48 heures) ont été exposées à 1 μ g/mL de Fe, 0,2 μ g/mL de Zn, 20 ng/mL de Pb, 10 ng/mL de Cu ou 50 μ g/mL de particules (CB ou ufCB) dopées ou non en métaux (20 mg/g de particule pour le Fe, 4 mg/g de particule pour le Zn, 0,4 mg/g de particule pour le Pb et 0,2 mg/g de particule pour le Cu) pendant 24 heures. Le milieu de culture a ensuite été remplacé par du milieu contenant 10 ng/mL de LPS pendant 24 heures d'incubation supplémentaires. Les concentrations en IL-6 ont été déterminées par ELISA sandwich. Valeurs \pm écarts types ($n = 3$). Différence significative (test de Tuckey, $p < 0,05$) a : vs. témoin, b : vs. CB et c : vs. particules non dopées.

Contrairement à ce qui a été observé pour l'IL-1 β , après stimulation aux LPS, les particules (dopées ou non) induisent systématiquement une sécrétion accrue de cytokine IL-6 par rapport aux témoins.

D'une manière générale, l'induction de la sécrétion d'IL-6 est très importante après une exposition aux LPS. Cette induction semble potentialisée par l'exposition préalable à des particules alors que les métaux en solution soit diminuent la réponse aux LPS (Fe et Zn), soit ne l'affectent pas (Pb et Cu).

III.2.2.4. Effet des métaux, des CB et des ufCB, dopées ou non sur la sécrétion du TNF- α

La première incubation de 24 heures avec les métaux, les CB et ufCB dopées et non dopées n'a pas engendrée d'induction de sécrétion du TNF- α mesurable par la méthode ELISA employée (seuil de détection de 3,807 pg/mL). De même, 24 heures après la fin de l'exposition aux métaux, particules dopées et non dopées (sans stimulation aux LPS), les concentrations en TNF- α dans les milieux de cultures n'ont pas pu être déterminées.

Dans toutes les conditions expérimentales, la stimulation aux LPS induit une augmentation de la sécrétion de TNF- α . Les cellules témoins exposées aux LPS, sécrètent plus de 500 pg/mL de TNF- α (Figure 33). Des expositions au Fe et au Zn dans un premier temps, puis aux LPS dans un second temps induisent une sécrétion significativement moins importante de TNF- α (respectivement -22 et -19 %) qu'une exposition aux LPS sans un contact préalable aux métaux; pour le Pb et le Cu, la sécrétion est équivalente aux témoins (Figure 33). Une exposition préalable aux CB non dopées modifie la sécrétion du TNF- α après une stimulation des cellules aux LPS. En effet, une augmentation de 36 % de la sécrétion du TNF- α a été mesurée par rapport aux cellules témoins non exposées aux particules et stimulées par les LPS. L'effet des CB dopées semble dépendre du métal adsorbé aux particules. Par contre, elles induisent systématiquement une sécrétion moins importante de TNF- α par rapport aux CB non dopées. De plus, seule l'exposition avec le Cu entraîne une différence significative de la concentration en TNF- α par rapport aux témoins non exposés préalablement à des particules (Figure 33). Concernant les ufCB non dopées, les mesures montrent également une induction accrue de la sécrétion du TNF- α de 25 % par rapport aux témoins. Les ufCB dopées au Zn et au Pb induisent de façon plus importante la sécrétion en TNF- α que les ufCB non dopées, ou de façon identique pour le Fe et le Cu ; mais dans tous les cas, la concentration est significativement augmentée par rapport aux témoins non exposés à des particules (Figure 33).

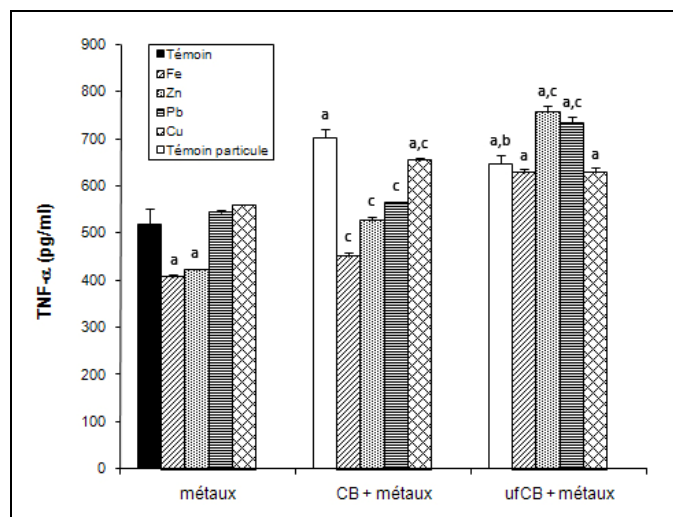


Figure 33 : Effet des métaux, particules (CB et ufCB) et des particules dopées avec des métaux sur la sécrétion du TNF- α par des cellules THP-1 différenciées en réponse à une stimulation par des LPS. Des cellules THP-1 différenciées (PMA à 8.10^{-3} μ M pendant 48 heures) ont été exposées à 1 μ g/mL de Fe, 0,2 μ g/mL de Zn, 20 ng/mL de Pb, 10 ng/mL de Cu ou 50 μ g/mL de particules (CB ou ufCB) dopées ou non en métaux (20 mg/g de particule pour le Fe, 4 mg/g de particule pour le Zn, 0,4 mg/g de particule pour le Pb et 0,2 mg/g de particule pour le Cu) pendant 24 heures. Le milieu de culture a ensuite été remplacé par du milieu contenant 10 ng/mL de LPS pendant 24 heures d'incubation supplémentaires. Les concentrations en TNF- α ont été déterminées par ELISA sandwich. Valeurs \pm écarts types (n = 3). Différence significative (test de Tuckey, $p < 0,05$) a : vs. témoin, b : vs. CB et c : vs. particules non dopées.

En résumé :

- Les ufCB induisent une diminution de la viabilité des cellules THP-1 de 10%.
- La sécrétion de l'IL-1 β est induite par les particules fines et ultrafines après 24 heures d'exposition mais les capacités des cellules à répondre à une stimulation aux LPS en sont diminuées.
- De la même façon, les particules fines et ultrafines sont des inducteurs de la sécrétion d'IL-8 après un jour d'exposition. En revanche la réponse aux LPS est fonction de la taille : les pré-expositions aux particules fines potentialisent cette réponse alors que les pré-expositions aux particules ultrafines la diminuent.
- Les particules fines et ultrafines potentialisent les sécrétions de l'IL-6 et du TNF- α en réponse à une exposition aux LPS. Mais la présence de métaux sur les particules fines abolie cet effet.

III.2.3. Effets des HAP adsorbés sur les particules fines et ultrafines de noir de carbone

Les effets des HAP (B[a]p, B[b]f et Pyr), des CB, des ufCB dopés ou non en HAP sur la viabilité des cellules THP-1 différenciées ont été déterminés par la méthode MTT après une exposition de 24 heures à ces différents composés et particules. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport aux témoins (Tableau 15).

Tableau 15 : Effets des HAP et des particules (CB et ufCB), seules ou dopées avec des HAP, sur la viabilité des cellules THP-1

	Témoins (sans HAP)	B[a]p	B[b]f	Pyr
Solutions d'HAP	100 ± 5	99 ± 3	108 ± 1	104 ± 4
CB + HAP	100 ± 3	100 ± 2	102 ± 5	102 ± 3
ufCB + HAP	89 ± 4	89 ± 4	90 ± 5	88 ± 5

Après 24 heures d'exposition à 0,5 ng/mL de chacun des 3 HAP seul, aucune altération significative de la viabilité des cellules THP-1 n'a été constatée. De même, suite aux expositions à 50 µg/mL de particules CB dopées ou non en HAP (10 µg/g de particule) pendant 24 heures, aucune altération significative de la viabilité des THP-1 n'a également été constaté. Par contre, les particules ufCB dopées ou non en HAP induisent une légère diminution de la viabilité des cellules THP-1 d'environ 10 % par rapport aux cellules témoins. Toutefois, cette diminution n'est pas significative. Cet effet semble être dû à la taille des particules car ce résultat a été également constaté avec les ufCB dopés aux métaux

De plus des cellules THP-1 ont été exposées pendant 24 heures supplémentaires à une concentration en LPS de 10 ou 100 ng/mL. Quelque soient le type de particules auxquelles ont été préalablement exposées les cellules, la viabilité est diminuée respectivement de 10 ou 20 % suite à l'exposition aux LPS à 10 ou 100 ng/mL.

Les cellules THP-1 différenciées ont été successivement exposées aux HAP seul ou aux particules (ufCB ou CB) dopées ou non avec les mêmes HAP (B[a]p, B[b]f et Pyr) puis à des LPS bactériens à 10 ng/mL pour la mesure de l'IL-1β et de l'IL-8 et à 100 ng/mL pour l'IL-12 et l'IL-10. Dans le cas du dosage de l'IL-12 et l'IL-10, l'utilisation d'une concentration de 10 ng/mL ne permettait pas d'induire une sécrétion détectable par la méthode de mesure employée.

III.2.3.1. Effet des HAP, des CB et des ufCB, dopées ou non sur la sécrétion d'IL-1 β

Les expositions des cellules THP-1 aux HAP pendant 24 heures induisent une augmentation significative de la concentration en IL-1 β dans le milieu de culture quelque soit le HAP utilisé (Figure 34). En effet, les concentrations en IL-1 β dans le milieu après exposition au B[a]p, B[b]f et Pyr sont augmentées respectivement de 81 %, 32 % et 48 % par rapport aux témoins. Les cellules THP-1 exposées à des CB pendant 24 heures sécrètent 30 % d'IL-1 β en plus que des cellules THP-1 non exposées. Le dopage des particules CB avec les différents HAP induit une augmentation de la sécrétion d'IL-1 β inférieure à 5 % par rapport aux CB non dopées. Concernant les ufCB non dopées, ces particules induisent une augmentation significative de la concentration en IL-1 β (+56 %). Inversement, les ufCB dopées avec les HAP induisent des diminutions significatives de 57 à 58 % après une exposition de 24 heures.

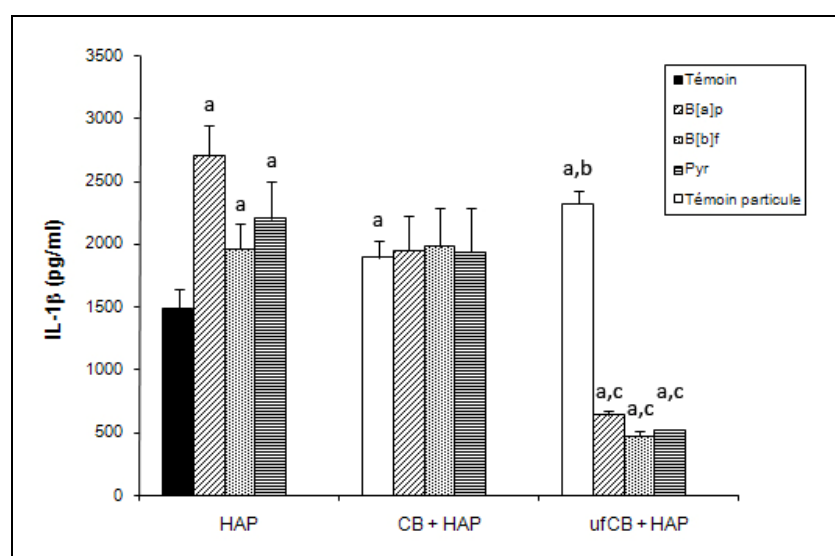


Figure 34 : Effet des HAP, particules (CB et ufCB) et des particules dopées avec des HAP sur la sécrétion d'IL-1 β par des cellules THP-1 différenciées. Des cellules THP-1 différenciées (PMA à 2.10^{-1} μ M pendant 24 heures) ont été exposées à 0,5 ng/mL d'HAP ou 50 μ g/mL de particules (CB ou ufCB) dopées ou non en HAP (10 μ g/g de particule) pendant 24 heures. Les concentrations en IL-1 β ont été déterminées par ELISA sandwich. Valeurs \pm écarts types ($n = 3$). Différence significative (test de Tuckey, $p < 0,05$) a : vs. témoin, b : vs. CB et c : vs. particules non dopées.

Vingt-quatre heures après la fin de l'exposition au B[a]p (sans stimulation aux LPS), la concentration en IL-1 β des cellules exposées est augmentée de façon encore plus accentuée, puisqu'elle atteint 440 % du témoin (Figure 35A). Au contraire, pour le Pyr et le B[b]f, cette augmentation par rapport aux témoins n'est que de 89 et 124 % respectivement (Figure 35A). Vingt-quatre heures après la fin de l'exposition aux particules CB (sans

stimulation aux LPS), qu'elles soient dopées ou non, les concentrations en IL-1 β dans le milieu de culture sont équivalentes entre elles et aux témoins. Au contraire, pour les particules ufCB, dopées ou non, c'est une diminution significative et importante qui est constatée (Figure 35A). Alors que les ufCB non dopées, entraînent une diminution significative de 78 % de la concentration en IL-1 β , les ufCB dopées entraînent des diminutions des concentrations en IL-1 β de plus de 90 %. Comparativement aux ufCB non dopées (sans stimulation par les LPS), la présence du B[a]p, du B[b]f et Pyr induisent respectivement une diminution de 68, 75 et 66 % de la concentration en IL-1 β (Figure 35A).

Dans toutes les conditions expérimentales, la stimulation par les LPS induit une augmentation significative de la sécrétion d'IL-1 β (Figure 35B). Les cellules témoins exposées aux LPS, sécrètent 513 % plus d'IL-1 β que des cellules Témoins non stimulées par les LPS (Figure 35A et Figure 35B). Des expositions aux HAP, puis aux LPS induisent une sécrétion plus importante d'IL-1 β qu'une exposition aux LPS sans contact préalable aux HAP (Figure 35B). Cet effet est significatif quelque soit l'HAP envisagé. Cependant, concernant la concentration finale en IL-1 β dans le milieu après une stimulation aux LPS des cellules THP-1, il n'existe aucune différence significative entre les 3 HAP testés. Une exposition aux CB non dopées ne semble pas affecter la sécrétion d'IL-1 β après une stimulation des cellules aux LPS. En effet, des cellules traitées avec des CB non dopées ainsi que les cellules non traitées aux particules (Témoin) induisent une sécrétion (après stimulation aux LPS) d'IL-1 β supérieure à 6000 pg/mL. Au contraire, les CB dopées en HAP entraînent une diminution significative de la concentration en IL-1 β après la stimulation des cellules THP-1 aux LPS. Ces résultats sont statistiquement significatifs pour les 3 HAP adsorbés aux particules CB (en comparaison aux cellules témoins). Cette diminution est également significative par rapport aux cellules exposées aux CB non dopées pour le B[a]p (36 %) et le B[b]f (35 %) ; pour le Pyr (16 %), cette diminution n'est pas significative (Figure 35B).

Concernant les ufCB, une exposition préalable à ce type de particules, dopées ou non dopées entraîne, après la stimulation aux LPS, une diminution de la sécrétion d'IL-1 β par rapport à des cellules non exposées à des ufCB. Ce qui est à souligner, c'est que la présence des HAP sur les ufCB semble limiter l'effet des ufCB elles-mêmes. En effet, les concentrations en IL-1 β sont plus importantes après une exposition à des ufCB dopées (quelque soit l'HAP) qu'avec des ufCB non dopées (Figure 35B).

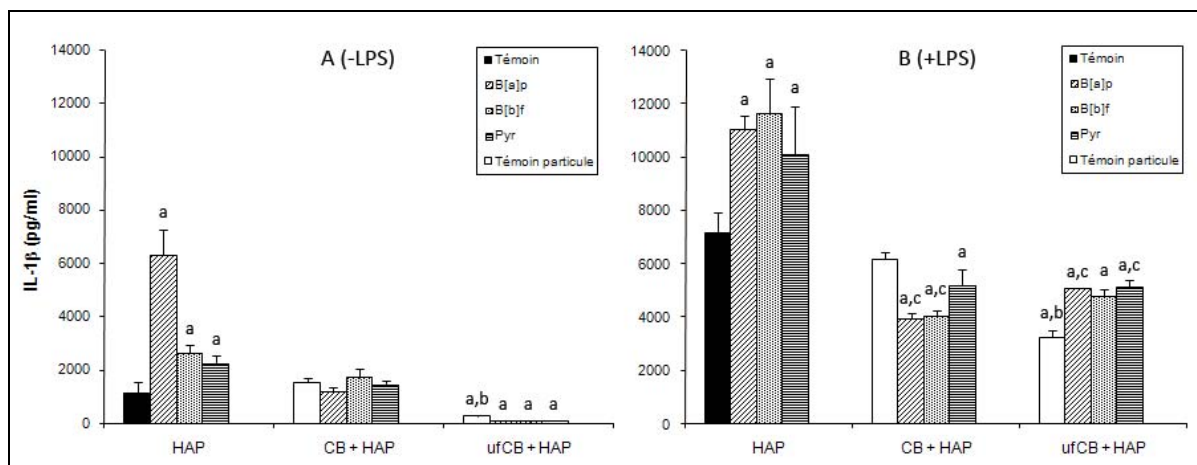


Figure 35 : Effet des HAP, particules (CB et ufCB) et des particules dopées avec des HAP sur la sécrétion d'IL-1 β par des cellules THP-1 différenciées en réponse à une stimulation par des LPS. Des cellules THP-1 différenciées (PMA à $2.10^{-1} \mu\text{M}$ pendant 24 heures) ont été exposées à 0,5 ng/mL d'HAP ou 50 $\mu\text{g/mL}$ de particules (CB ou ufCB) dopées ou non en HAP (10 $\mu\text{g/g}$ de particule) pendant 24 heures. Le milieu de culture a ensuite été remplacé par du milieu frais (-LPS) (A) ou par du milieu contenant 10 ng/mL de LPS (+LPS) (B) pendant 24 heures d'incubation supplémentaires. Les concentrations en IL-1 β ont été déterminées par ELISA sandwich. Valeurs \pm écarts types ($n = 3$). Différence significative (test de Tuckey, $p < 0,05$) a : vs. témoin, b : vs. CB et c : vs. particules non dopées.

Ces observations suggèrent qu'en l'absence de LPS, l'effet des particules dopées avec des HAP sur la sécrétion en IL-1 β dépend principalement de la taille des particules. Les différences observées entre les effets des HAP lorsqu'ils sont soit adsorbés sur les CB ou les ufCB indiquent que la taille des particules influence le potentiel toxique des HAP.

III.2.3.2. Effet des HAP, des CB et des ufCB, dopées ou non sur la sécrétion d'IL-8

Chacun des 3 HAP entraînent une augmentation de la concentration en IL-8 dans le milieu après une incubation de 24 heures par rapport aux témoins sans HAP (augmentations significatives allant de 28 à 45 %). Les expositions aux particules CB, dopées et non dopées en HAP, pendant 24 heures induisent une sécrétion en IL-8 par rapport aux cellules THP-1 non exposées (augmentations de 21 à 39 %). Au contraire, dans les milieux de cultures des cellules exposées aux particules ufCB, dopées et non dopées en HAP, la concentration en IL-8 a été diminuée significativement par rapport aux témoins sans particules, ces diminutions vont de 73 à 80 % (Figure 36).

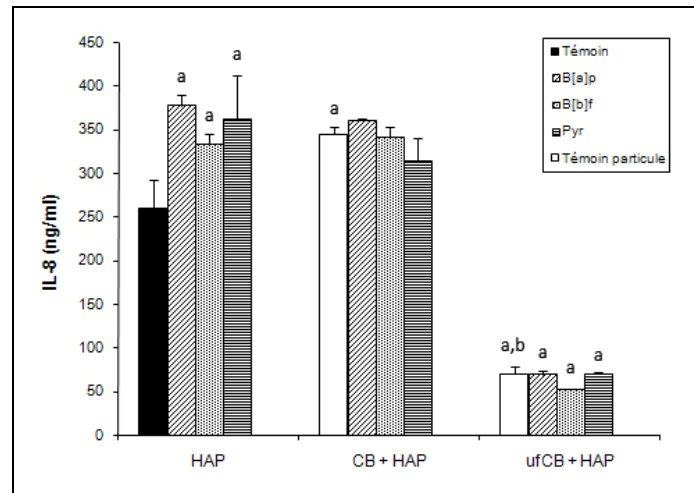


Figure 36 : Effet des HAP, particules (CB et ufCB) et des particules dopées avec des HAP sur la sécrétion d'IL-8 par des cellules THP-1 différenciées. Des cellules THP-1 différenciées (PMA à 2.10^{-1} μ M pendant 24 heures) ont été exposées à 0,5 ng/mL d'HAP ou 50 μ g/mL de particules (CB ou ufCB) dopées ou non en HAP (10 μ g/g de particule) pendant 24 heures. Les concentrations en IL-8 ont été déterminées par ELISA sandwich. Valeurs \pm écarts types ($n = 3$). Différence significative (test de Tuckey, $p < 0,05$) a : vs. témoin et b : vs. CB.

Après 24 heures d'incubation supplémentaire dans du milieu frais sans LPS, les concentrations en IL-8 dans le milieu des cellules exposées aux HAP ont continué à augmenter. Cette augmentation est particulièrement élevée pour le B[a]p (+275 %) et significativement différente des augmentations engendrées par le B[b]f et le Pyr (respectivement +193 % et +159 %) (Figure 37A). Concernant les CB, après ces 24 heures d'incubation supplémentaire sans LPS, une augmentation de la concentration en IL-8 dans le milieu d'environ 87 % a été constatée par rapport à la concentration des cellules témoins non exposées aux CB. Bien que les CB dopées en B[b]f et en Pyr induisent également une sécrétion d'IL-8 dans le milieu de plus de 72 %, les CB dopées au B[a]p, elles, n'induisent pas de sécrétion d'IL-8 par rapport aux cellules non exposées à des particules. En effet, les effets des CB elles-mêmes semblent être très atténués du fait de la présence du B[a]p. Au contraire, l'incubation supplémentaire pour les cellules exposées aux ufCB renforce l'inhibition de la sécrétion en IL-8 observée lors des 24 premières heures d'incubation. La diminution par rapport aux témoins est de plus de 96 % que se soit pour les ufCB dopées ou non (Figure 37A).

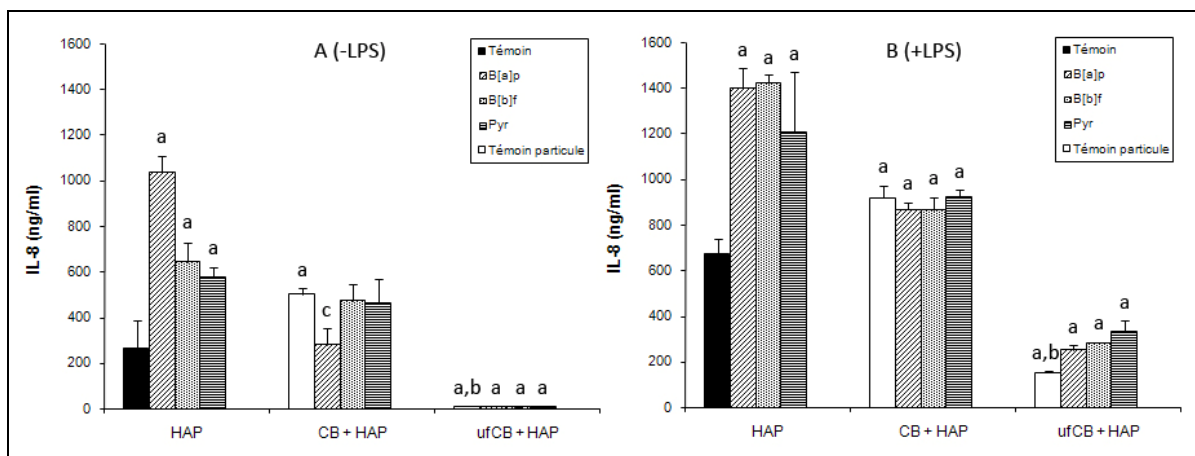


Figure 37 : Effet des HAP, particules (CB et ufCB) et des particules dopées avec des HAP sur la sécrétion d'IL-8 par des cellules THP-1 différenciées en réponse à une stimulation par des LPS. Des cellules THP-1 différenciées (PMA à $2.10^{-1} \mu\text{M}$ pendant 24 heures) ont été exposées à 0,5 ng/mL d'HAP ou 50 $\mu\text{g/mL}$ de particules (CB ou ufCB) dopées ou non en HAP (10 $\mu\text{g/g}$ de particule) pendant 24 heures. Le milieu de culture a ensuite été remplacé par du milieu frais (-LPS) (A) ou par du milieu contenant 10 ng/mL de LPS (+LPS) (B) pendant 24 heures d'incubation supplémentaires. Les concentrations en IL-8 ont été déterminées par ELISA sandwich. Valeurs \pm écarts types ($n = 3$). Différence significative (test de Tuckey, $p < 0,05$) a : vs. témoin, b : vs. CB et c : vs. particules non dopées.

Quelque soit le type d'HAP ou de particules, la stimulation aux LPS entraîne systématiquement une induction plus importante de la sécrétion d'IL-8 que des cellules non stimulées aux LPS (*i.e.*, une augmentation de 154 % a été constatée entre les cellules témoins stimulées aux LPS et celles non stimulées pour une même durée d'incubation, Figures 37A et 35B). La stimulation aux LPS, sur des cellules ayant été exposées préalablement à des HAP seuls, potentialise l'effet initial d'augmentation de sécrétion en IL-8. Ainsi, le B[a]p et le B[b]f induisent une augmentation de plus de 100 % par rapport aux cellules témoins stimulées aux LPS ; le traitement au Pyr, une augmentation d'environ 78 % (Figure 37B). Les sécrétions en IL-8 dues à la stimulation aux LPS ont également été potentialisées par les incubations précédentes avec les CB dopées ou non dopées et sont toutes supérieures à la concentration mesurée dans les cellules témoins non exposées aux particules (Figure 37B). Concernant les cellules exposées préalablement aux ufCB dopées ou non en HAP, toutes les concentrations mesurées sont inférieures aux témoins non exposés aux particules, ce qui conduit à une valeur proche de celle observée lors de l'incubation supplémentaire de 24 heures dans du milieu sans LPS (Figures 37A et 37B).

III.2.3.3. Effet des HAP, des CB et des ufCB, dopées ou non sur les sécrétions d'IL-12 et d'IL-10

Les sécrétions basales en IL-12 et IL-10, par les cellules THP-1 différenciées sans stimulation préalable aux LPS, étaient en dessous de la limite de détection de la technique employée. C'est pourquoi, ces deux cytokines ont été uniquement mesurées après les deux incubations successives de 24 heures en présence ou en absence de LPS pour la seconde phase de l'incubation. De plus, la concentration en LPS dans le milieu a dû être portée à 100 ng/mL afin de pouvoir mesurer la sécrétion d'IL-12 et d'IL-10.

Un traitement avec le B[a]p mais sans stimulation par les LPS induit une sécrétion d'IL-12 qui représente 150 % la concentration du témoin ($50,4 \pm 5,7$ pg/mL contre $20,1 \pm 1,3$ pg/mL). Par contre aucune différence n'a été constatée pour les deux autres HAP. La stimulation de cellules témoins entraîne une augmentation de la sécrétion d'IL-12 de plus de 436 % par rapport à des cellules témoins non stimulées aux LPS (données non montrées). Les expositions aux B[a]p et au B[b]f suivi d'une stimulation aux LPS provoquent une augmentation significative de la sécrétion en IL-12, par rapport aux cellules témoins, respectivement de 85 et 48 % environ. Après une exposition au Pyr, cette augmentation est de 28 % seulement et n'est pas statistiquement significative (Figure 38). Les expositions aux CB dopées ou non dopées précèdent les stimulations aux LPS induisent une légère augmentation non significative de la concentration en IL-12 dans le milieu par rapport aux témoins (Figure 38). L'exposition aux particules ufCB non dopées préalablement à la stimulation aux LPS entraîne une diminution significative de la sécrétion en IL-12 de 55 % par rapport aux témoins sans exposition préalable à des particules ; cette diminution est ramenée à 32 % lorsque les ufCB sont dopées avec le B[a]p et elle devient nulle avec le B[b]f et le Pyr. Autrement dit, aucune différence de concentrations en IL-12 n'a été observée entre les cellules non exposées à des particules avant la stimulation aux LPS et des cellules exposées à des ufCB dopées (avec le B[b]f et le Pyr) (Figure 38).

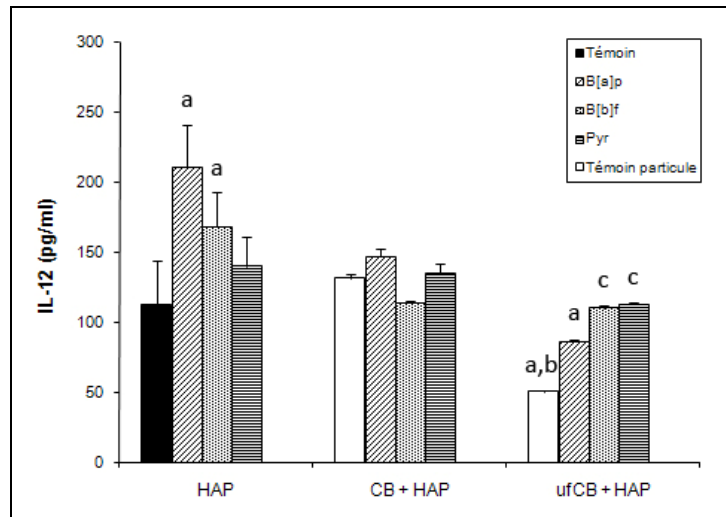


Figure 38 : Effet des HAP, particules (CB et ufCB) et des particules dopées avec des HAP sur la sécrétion d'IL-12 par des cellules THP-1 différenciées en réponse à une stimulation par des LPS. Des cellules THP-1 différenciées (PMA à $2.10^{-1} \mu\text{M}$ pendant 24 heures) ont été exposées à 0,5 ng/mL d'HAP ou 50 $\mu\text{g/mL}$ de particules (CB ou ufCB) dopées ou non en HAP (10 $\mu\text{g/g}$ de particule) pendant 24 heures. Le milieu de culture a ensuite été remplacé par du milieu contenant 100 ng/mL de LPS pendant 24 heures d'incubation supplémentaires. Les concentrations en IL-12 ont été déterminées par ELISA sandwich. Valeurs \pm écarts types ($n = 3$). Différence significative (test de Tuckey, $p < 0,05$) a : vs. témoin, b : vs. CB et c : vs. particules non dopées.

Les concentrations en IL-10 dans le milieu de culture après une exposition préalable aux différents HAP seul, puis aux LPS, n'ont révélé aucunes différences des concentrations par rapport aux témoins (Figure 39). Les expositions aux CB dopées ou non dopées précédant les stimulations aux LPS induisent une augmentation significative des concentrations d'IL-10 dans le milieu ; cependant, celle-ci semble dépendre du type d'HAP adsorbé. En effet, la différence la plus importante concerne les CB dopées avec le B[a]p (*i.e.*, une augmentation de 120 % par rapport aux témoins) alors que les CB non dopées et les CB dopées au B[b]f représentent seulement une augmentation d'environ 58 % (Figure 39). Les ufCB non dopées ont un effet moins important sur la sécrétion d'IL-10 que sur la sécrétion d'IL-12. En effet, le traitement aux ufCB non dopées n'a aucun effet sur la sécrétion en IL-10 dans le milieu par rapport au traitement témoin. La présence des HAP sur les ufCB entraînent une induction plus importante de la sécrétion d'IL-10 par rapport à une exposition à des ufCB non dopées en HAP.

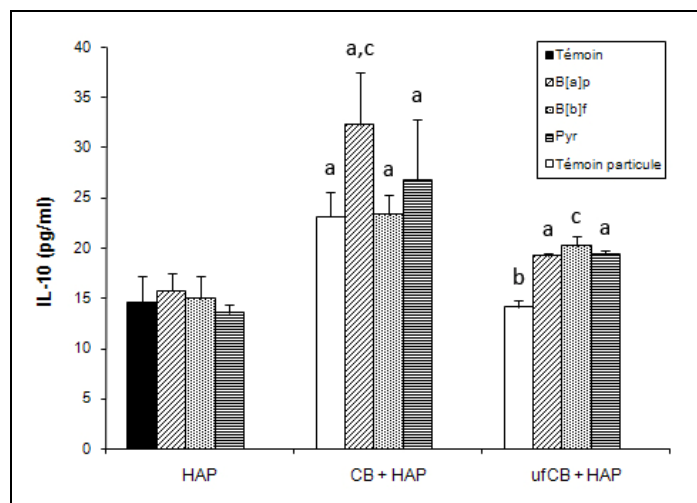


Figure 39 : Effet des HAP, particules (CB et ufCB) et des particules dopées avec des HAP sur la sécrétion d'IL-10 par des cellules THP-1 différenciées en réponse à une stimulation par des LPS. Des cellules THP-1 différenciées (PMA à $2.10^{-1} \mu\text{M}$ pendant 24 heures) ont été exposées à 0,5 ng/mL d'HAP ou 50 $\mu\text{g/mL}$ de particules (CB ou ufCB) dopées ou non en HAP (10 $\mu\text{g/g}$ de particule) pendant 24 heures. Le milieu de culture a ensuite été remplacé par du milieu contenant 100 ng/mL de LPS pendant 24 heures d'incubation supplémentaires. Les concentrations en IL-10 ont été déterminées par ELISA sandwich. Valeurs \pm écarts types ($n = 3$). Différence significative (test de Tuckey, $p < 0,05$) a : vs. témoin, b : vs. CB et c : vs. particules non dopées.

En résumé :

- Les HAP en solution n'altèrent pas la viabilité des THP-1.
- Parmi les HAP, seul le B[a]p a un effet pro-inflammatoire sur les cellules THP-1.
- L'adsorption des HAP sur les CB semble diminuer leur biodisponibilité et ainsi diminuer leur effet pro-inflammatoire.
- Les ufCB dopées en HAP induisent une diminution de la sécrétion en cytokine due aux particules elles-mêmes, laissant suggérer un important effet immuno-toxique. Cependant, après une stimulation aux LPS, les HAP adsorbés atténuent cet effet immuno-toxique.
- Les effets des HAP adsorbés sur la sécrétion des cytokines semblent dépendre de la taille des particules.

III.3. Mesures de marqueurs du stress oxydant induit par les particules et le HNE

III.3.1. Potentiel oxydant des particules

L'évaluation du potentiel oxydant en système acellulaire permet d'évaluer la capacité de diverses substances à générer des molécules réactives oxydantes. Elle est déterminée par l'oxydation du DCFH en présence de peroxydase dans le milieu réactionnel. Cette oxydation en condition acellulaire a été déterminée après addition d'une solution d' H_2O_2 à $300 \mu M$ et des suspensions de CB ou d'ufCB à $30 \mu g/mL$. La vitesse d'oxydation du DCFH calculée par la mesure de fluorescence du DCF^+ produit au cours de la réaction, permet de quantifier le potentiel oxydant de la substance testée, elle est exprimée en UA/s. Concernant les concentrations en particules, l'utilisation de concentrations plus élevées ($50 \mu g/mL$) ne permet pas le suivi de la réaction du fait de l'opacité générée dans le milieu réactionnel.

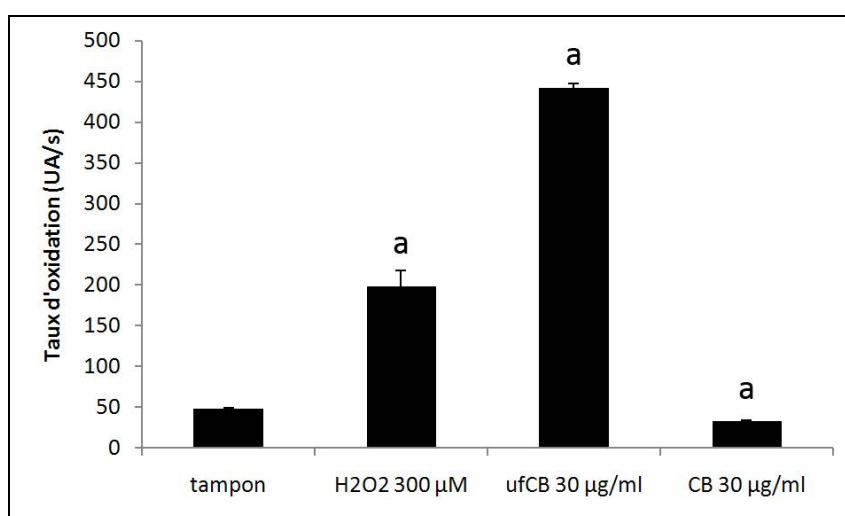


Figure 40 : Oxydation du DCFH par des particules CB et ufCB en milieu acellulaire. Le DCFH a été incubé en présence de HRP (peroxydase du Raifort) avec $30 \mu g/mL$ de CB ou ufCB ou $300 \mu M$ d' H_2O_2 . Valeurs \pm écarts types ($n = 3$). Différence significative (test de Tuckey, $p < 0,05$) a : vs. tampon.

La solution d' H_2O_2 et la suspension d'ufCB présentent un potentiel oxydant significativement plus élevé que les témoins (figure 40). En effet, le potentiel oxydant de l' H_2O_2 à $300 \mu M$ est 4 fois plus élevé que celui des témoins et la suspension d'ufCB présente un potentiel oxydant de plus de 9 fois celui du témoin. Le potentiel oxydant de la suspension

de CB est au contraire inférieur à celui des témoins. Les CB en suspension ne semblent donc pas avoir un caractère oxydant dans nos conditions expérimentales, les valeurs inférieures aux témoins peuvent être la conséquence de l'opacité générée par les particules elles mêmes. Au contraire les ufCB ont un très fort potentiel oxydant bien que les suspensions soient plus opaques. Pour cette raison, seul ce dernier type de particules a été utilisé pour les expérimentations suivantes concernant l'évaluation du stress oxydant après exposition à des particules.

III.3.2. Induction du stress oxydant par les particules sur les cellules THP-1

III.3.2.1. Test de cytotoxicité par mesure de l'altération membranaire

L'altération de la perméabilité membranaire des cellules THP-1 après exposition aux particules ultrafines est évaluée par la mesure de l'activité de la LDH libérée dans le milieu de culture par les cellules. En effet, la LDH est une enzyme cytoplasmique normalement absente du milieu extra-cellulaire qui est relarguée par les cellules lorsqu'elles subissent des dommages membranaires. Ce résultat est comparé à l'activité de la LDH de cellules THP-1 non exposées. Les cellules ont ainsi été exposées à des concentrations s'échelonnant de 50 à 500 µg/mL pendant différents temps d'incubation (1, 4 et 24 heures), Tableau 16.

Tableau 16 : Evaluation de la cytotoxicité par la mesure de l'activité LDH après traitement aux ufCB. L'activité de la LDH est mesurée dans les surnageants de culture. Les cellules THP-1 non différenciées (5.10^5 cellules/mL) ont été exposées aux concentrations d'ufCB indiquées pendant 1, 4 ou 24 heures. Les cellules témoins ont été traitées dans les mêmes conditions en ajoutant le milieu de suspension des particules seules. La libération maximale de LDH dans le milieu de culture a été obtenue par le traitement au Triton X-100 (1 %) dans les mêmes conditions. Valeurs \pm écarts types ($n = 3$). Différence significative (test de Tuckey, $p < 0,05$) a : vs. témoin.

		Traitements					
		Témoin	ufCB (µg/mL)				Triton
		0	50	100	250	500	1 %
Cytotoxicité (%)	1 heure	0,00 \pm 0,42	2,25 \pm 0,90	1,80 \pm 0,35 ^a	2,93 \pm 0,57 ^a	0,00 \pm 0,61	100 \pm 6,52 ^a
	4 heures	0,00 \pm 0,58	0,51 \pm 0,78	0,00 \pm 0,88	1,47 \pm 0,60	3,37 \pm 0,70 ^a	100 \pm 5,68 ^a
	24 heures	0,00 \pm 0,62	9,18 \pm 1,08 ^a	9,77 \pm 0,60 ^a	12,54 \pm 0,38 ^a	14,83 \pm 1,19 ^a	100 \pm 3,21 ^a

Seules les expositions de 24 heures induisent une altération membranaire significative, sauf pour les concentrations de 100 et 250 $\mu\text{g/mL}$ au temps d'incubation de 1 heure. L'altération membranaire induite par les ufCB après 24 heures d'exposition augmente suivant une relation dose-dépendante de 9 à 15 % (Tableau 16). Par ailleurs, la détermination de la mortalité cellulaire par un test d'exclusion au bleu trypan, après exposition aux particules conforte en partie les résultats obtenus. En effet, après une exposition aux particules de 24 heures à des concentrations de 100, 250 et 500 $\mu\text{g/mL}$, la viabilité est significativement diminuée (Tableau 17).

Tableau 17 : Evaluation de la mortalité par un test d'exclusion au bleu Trypan après traitement aux ufCB. Les cellules THP-1 non différenciées (5.10^5 cellules/mL) ont été exposées aux concentrations d'ufCB indiquées pendant 1, 4 ou 24 heures. Les cellules témoins ont été traitées dans les mêmes conditions en ajoutant la solution de suspension des particules. le comptage a été réalisé par la méthode d'exclusion au bleu Trypan en cellule de Malassez. Valeurs \pm écarts types ($n = 3$). Différence significative (test de Tuckey, $p < 0,05$) a : vs. témoin.

		Traitements				
		Témoin	ufCB ($\mu\text{g/mL}$)			
		0	50	100	250	500
Viabilité (%)	1 heure	1,50 \pm 0,54	1,42 \pm 1,13	2,54 \pm 0,65	1,46 \pm 0,50	0,96 \pm 0,83
	4 heures	1,48 \pm 1,43	1,54 \pm 0,98	2,40 \pm 0,81	4,27 \pm 2,08	4,00 \pm 0,97
	24 heures	1,78 \pm 0,77	2,14 \pm 0,71	8,23 \pm 1,26 ^a	7,66 \pm 1,46 ^a	9,73 \pm 1,70 ^a

III.3.2.2. Mise en évidence de la formation de HNE

Compte tenu du potentiel oxydant élevé des ufCB et de l'altération membranaire mise en évidence par la mesure de la libération de LDH, l'hypothèse d'une peroxydation lipidique consécutive à l'exposition aux particules ufCB a été avancée. Pour évaluer cette peroxydation lipidique, la mise en évidence du HNE, un des métabolites terminaux, a été réalisée. De plus, le HNE est suspecté d'être un marqueur du stress oxydant. Ce composé étant instable, ce sont les adduits que forme celui-ci avec les composés possédant des fonctions thiols (cystéine notamment), des fonctions amines nucléophiles (lysine et histidine notamment) qui vont être mis en évidence. Les cellules THP-1 ont donc été exposées à 50 $\mu\text{g/mL}$ d'ufCB pendant différents temps d'incubations (2, 4, 12 ou 24 heures). Parallèlement des cellules ont également été traitées pendant les mêmes temps d'incubation à une concentration de 10 μM d'HNE (contrôles positifs) (Figure 41).

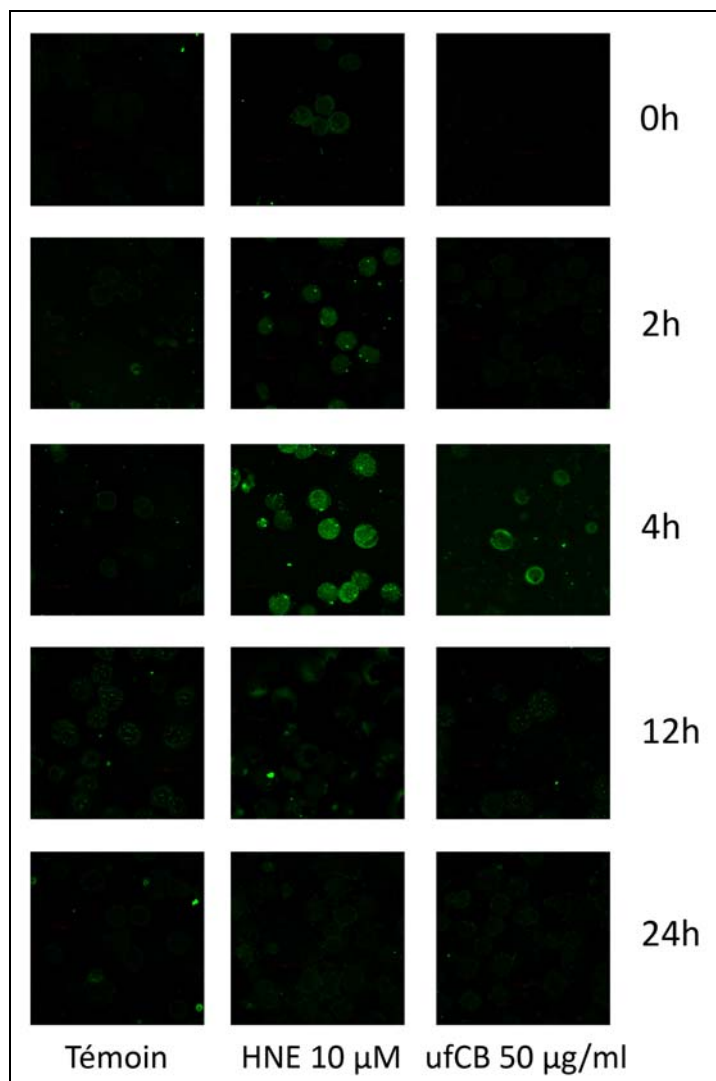


Figure 41 : Mise en évidence de la formation d'adduits au HNE par Immunohistochimie, après exposition de cellules THP-1 au HNE ou aux ufCB. Les cellules THP-1 non différenciées sont exposées pendant différents temps à du HNE à 10 μM ou à des ufCB à 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Les cellules sont ensuite marquées par un anticorps primaire anti adduit au HNE. La fluorescence spécifique des adduits HNE est obtenue par l'utilisation d'un IgG anti adduit HNE I^{aire} et d'un anticorps II^{aire} anti-mouse IgG marqué au FITC. La fluorescence est observée par microscopie confocale. Les cellules témoins sont traitées dans les mêmes conditions.

L'observation des cellules non-exposées ne révèle aucun adduit. Au contraire, le traitement au HNE de 10 μM entraîne très rapidement la formation d'adduits puisqu'une faible fluorescence est observée dès l'addition du produit dans le milieu de culture sur quelques cellules. Après 2 heures d'incubation, la fluorescence correspondant aux adduits est observable dans de nombreuses cellules mais elle reste faible. Après 4 heures d'incubation, la fluorescence observée atteint un maximum et concerne la majorité des cellules. Au contraire, après 12 heures et 24 heures d'incubation, aucune fluorescence spécifique des adduits au HNE n'est observée. Cette cinétique de formation des adduits traduit la pénétration rapide du HNE dans la cellule et sa grande réactivité avec les fonctions thiols intracellulaires conduisant

probablement à sa neutralisation et à son élimination de la cellule après 12 heures d'incubation.

La cinétique réalisée avec les ufCB présente un profil différent. Mais dans ce cas, l'apparition des adduits au HNE n'est observable qu'après et seulement 4 heures d'incubation. La plus faible fluorescence mesurée (pour un même gain d'amplification) comparée aux témoins positifs (HNE à 10 μ M), suggère que la production d'HNE après exposition aux ufCB reste faible.

Cette expérience est à notre connaissance la première mise en évidence de la formation du HNE après exposition de cellules en culture à des particules ultrafines de carbone.

III.3.2.3. Mise en évidence de l'expression de la HO-1

L'expression de la HO-1 a été mesurée afin d'évaluer l'induction d'un stress oxydant par les ufCB dans les cellules THP-1. Cette protéine, est connue comme une protéine inductible par différents facteurs de stress du fait de ces propriétés antioxydantes. Pour cela, des cellules THP-1 ont été incubées pendant 4 heures en présence de différentes concentrations de particules ufCB (50, 100, 250 et 500 μ g/mL). L'expression de la HO-1 a été évaluée par Western Blotting. Le niveau basal d'expression de la HO-1 dans les cellules THP-1 n'est pas détectable ou très faiblement dans nos conditions expérimentales. L'induction de l'expression de la HO-1 n'a pas pu être mise en évidence quelque soit les concentrations d'ufCB utilisées (résultats non présentés).

III.3.2.4. Effet des particules sur les concentrations intracellulaires en GSX et GSSG

Au cours d'un stress oxydant, le taux de glutathion cellulaire est rapidement modifié. De plus, cette molécule est la principale à être impliquée dans les phénomènes de conjugaison qui mènent à la détoxification d'un composé. La mesure du taux de glutathion après un traitement aux particules ufCB peut donc traduire le stress oxydant provoqué par ce traitement mais aussi le phénomène de détoxification. Des cellules THP-1 ont donc été exposées aux mêmes concentrations en ufCB que précédemment pendant 4 heures et le taux de glutathion a été mesuré (Tableau 18).

Tableau 18 : Effet des particules ufCB sur le glutathion intracellulaire par la mesure du glutathion total (GSX) et du glutathion disulfide (GSSG). Les cellules THP-1 non différenciées ont été exposées aux concentrations d'ufCB indiquées pendant 4 heures. Les cellules témoins ont été traitées dans les mêmes conditions en ajoutant le milieu de suspension des particules. Valeurs \pm écarts types ($n = 3$). Différence significative (test de Tuckey, $p < 0,05$) a : vs. témoin.

ufCB	GSX	GSSG	rapport
$\mu\text{g/mL}$	nmol/mg de protéine	nmol/mg de protéine	GSX/GSSG
Témoin	$17,99 \pm 2,31$	$0,19 \pm 0,01$	92,5
50	$8,41 \pm 1,64^a$	$0,28 \pm 0,02^a$	30,4
100	$9,40 \pm 2,16^a$	$0,34 \pm 0,04^a$	27,6
250	$9,54 \pm 1,26^a$	$0,32 \pm 0,03^a$	29,5
500	$12,81 \pm 3,15$	$0,24 \pm 0,04$	53,5

Les résultats montrent une concentration en glutathion total (GSX) inférieure aux cellules témoins quelque soit la concentration d'ufCB employée. Cependant, cette diminution n'est significative que pour les concentrations de 50, 100 et 250 $\mu\text{g/mL}$ et non pas pour celle de 500 $\mu\text{g/mL}$. Concernant, le glutathion oxydé, au contraire, une augmentation des concentrations pour les 4 concentrations d'ufCB employées est constatée. Ces augmentations ne sont significatives que pour les concentrations de 50, 100 et 250 $\mu\text{g/mL}$. Les rapports GSX/GSSG, déterminés pour apprécier le statut d'oxydation des cellules, ont tous tendance à diminuer par rapport aux témoins, ce qui traduit un déséquilibre dans le potentiel redox de la cellule donc l'induction d'un stress oxydant. Les rapports sont relativement identiques pour les concentrations de 50, 100 et 250 $\mu\text{g/mL}$ (diminués de 3 fois par rapport au témoin) alors que le rapport GSX/GSSG pour la concentration de 500 $\mu\text{g/mL}$ n'est réduit que de 47 % (Tableau 18).

III.3.3. Le HNE : inducteur du stress oxydant

L'exposition aux ufCB engendre la formation de HNE. Au-delà du fait qu'il s'agisse d'un marqueur de peroxydation lipidique, le HNE est connu pour pouvoir induire lui-même un stress oxydant. Nous avons alors sur notre modèle cellulaire, étudié l'effet du HNE sur les paramètres du stress oxydant que nous avons mesuré préalablement après exposition aux particules ufCB.

III.3.2.1. Test de cytotoxicité par mesure de l'altération membranaire

Du fait de la réactivité importante du HNE vis-à-vis des molécules biologiques, l'intégrité membranaire a été évaluée après une exposition à court terme du HNE à différentes concentrations (30 min) sur les cellules THP-1 non différenciées (Tableau 19).

Tableau 19 : Evaluation de la cytotoxicité par la mesure de l'activité LDH après traitement au HNE. L'activité de la LDH est mesurée dans les surnageants de culture. Les cellules THP-1 non différenciées (5.10^5 cellules/mL) ont été exposées aux concentrations de HNE indiquées pendant 30 min dans un milieu sans SVF. Les cellules témoins ont été traitées dans les mêmes conditions en ajoutant le solvant du HNE (0,1 % d'éthanol). La libération maximale de LDH dans le milieu a été obtenue par le traitement au Triton X-100 (1 %) dans les mêmes conditions.. Valeurs \pm écarts types ($n = 3$). Différence significative (test de Tuckey, $p < 0,05$) a : vs. témoin, 7,5 μ M, 10 μ M et 12,5 μ M.

	Traitements							
	Témoin		HNE (μ M)					Triton X-100
	0	7,5	10	12,5	15	25	50	1 %
Cytotoxicité (%)	$0,0 \pm 1,0$	$0,0 \pm 1,0$	$0,0 \pm 0,5$	$0,0 \pm 1,0$	$5,9 \pm 1,2^a$	$46,9 \pm 4,5^a$	$78,1 \pm 2,6^a$	100 ± 3^a

Aucune cytotoxicité n'a été mesurée en dessous de la concentration de 15 μ M de HNE. Une concentration de 15 μ M de HNE induit une faible cytotoxicité significative de 5,9 % consécutive à la libération de LDH correspondant à une altération membranaire. Les concentrations de 25 et 50 μ M de HNE induisent des cytotoxicités respectivement de 47 et 78 %. Par ailleurs, des tests ont également été réalisés dans du milieu complet, c'est-à-dire contenant du SVF. Les résultats montrent une diminution importante de la cytotoxicité du HNE, par exemple, à la concentration de 25 μ M la cytotoxicité en présence de SVF n'est plus que de 2,2 %. Cette observation est probablement le résultat de la réaction préalable du HNE libre dans le milieu avec les protéines du sérum avant toute réaction avec les structures cellulaires.

III.3.2.2. Mise en évidence de l'expression de la HO-1

Afin d'évaluer l'effet intracellulaire du HNE sur les THP-1 non différenciées par l'induction d'un stress oxydant, l'expression de la HO-1 a été évaluée. Des cellules THP-1 non différenciées (1.10^6 cellules/mL) ont été incubées 30 min dans du milieu sans SVF à des concentrations de HNE allant de 1 à 25 μ M. une incubation supplémentaire de 4 heures en

présence de SVF a été réalisée afin de permettre la synthèse de protéine à un taux détectable par la technique de Western Blotting (Figure 42).

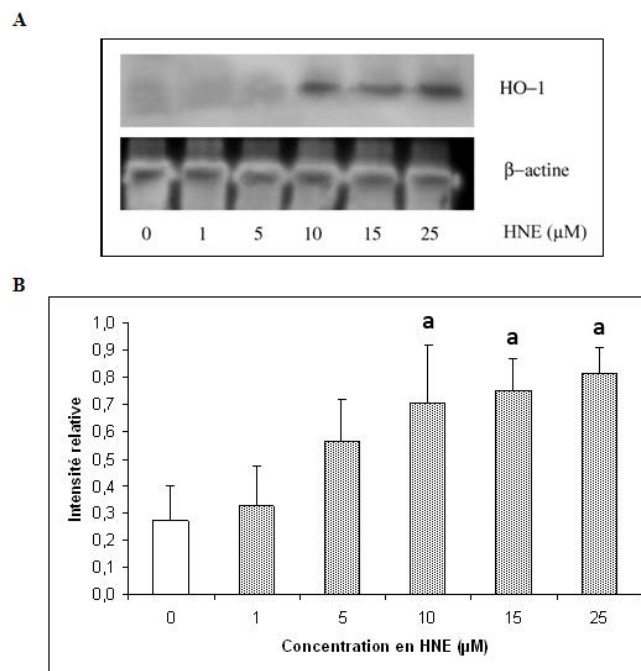


Figure 42 : Effect du HNE sur l'expression intracellulaire de la HO-1 dans des cellules THP-1 non différenciées. A : autoradiogramme d'un Western Blotting réalisé avec des anticorps anti-HO-1 et anti-β-actine à partir de respectivement 90 et 20 µg de protéines. B : analyse de densitométrie réalisée à partir de 3 échantillons indépendants. Les résultats sont exprimés par le rapport HO-1/β-actine. Les cellules THP-1 non différenciées (1.10^6 cellules/mL) ont été exposées aux concentrations de HNE indiquées pendant 30 min dans un milieu sans SVF. Les cellules ont été incubées 4 heures supplémentaires pour permettre l'induction de la synthèse protéique. Les cellules témoins ont été traitées dans les mêmes conditions en ajoutant le solvant du HNE (0,1 % d'éthanol). Valeurs ± écarts types ($n = 3$). Différence significative (test de Tuckey, $p < 0,05$) a : vs. témoin.

Le HNE induit une expression de la HO-1 d'autant plus importante que la concentration testée est élevée. Un niveau d'expression basale, bien que très faible peut être observé pour les cellules témoins. Une augmentation significative de cette expression est mesurée à la concentration de 5 µM. Bien que non significativement différente d'une concentration à l'autre, l'expression de la HO-1 augmente progressivement jusqu'à 25 µM. Ce résultat montre qu'à faible concentration (5 µM), le HNE induit un stress oxydant facilement mesurable, ce qui suggère d'importantes modifications intracellulaires. Cette induction doit intervenir durant la période d'incubation de 30 min sans sérum. En effet, il a été montré que le HNE en solution réagit en totalité après 45 min du fait de sa grande réactivité (Esterbauer *et al.*, 1991). De plus, le HNE forme rapidement des adduits avec des protéines, l'addition de sérum a donc pour effet de neutraliser le HNE en solution qui serait encore présent dans le milieu.

III.4.3.3. Effet du HNE sur les concentrations intracellulaires en GSX et GSSG

Les taux en GSX et GSSG ont été mesurés après exposition des cellules THP-1 selon le même protocole que celui décrit précédemment pour la mesure de l'expression de la HO-1. De 1 μM à 25 μM la quantité de glutathion diminue, mais cette diminution n'est significative qu'à partir de la concentration de 5 μM . La concentration en glutathion oxydé diminue également de façon dose dépendante (Tableau 20). Ces résultats pourraient traduire une conjugaison entre le HNE et le glutathion suivie de son exportation hors de la cellule ; exportation d'autant plus importante que la concentration en HNE est élevée. De plus, la diminution du glutathion peut aussi s'expliquer par une fuite non spécifique des molécules de bas poids moléculaire du fait de l'altération membranaire importante traduite par la mesure de cytotoxicité (47 % à 25 μM de HNE). Les rapports GSX/GSSG, sont relativement stables jusqu'à 15 μM de HNE, par contre à la concentration de 25 μM , ce rapport diminue très significativement (d'environ 45 %) ce qui peut traduire un déséquilibre du potentiel redox dans la cellule, donc l'induction d'un stress oxydant (Tableau 20).

Tableau 20 : Effet du HNE sur le glutathion intracellulaire par la mesure du glutathion total (GSX) et du glutathion disulfide (GSSG). Les cellules THP-1 non différenciées ont été exposées aux concentrations de HNE indiquées pendant 30 min dans un milieu sans SVF, suivit d'une période d'incubation de 4 heures après ajout de 10 % de SVF. Les cellules témoins ont été traitées dans les mêmes conditions en ajoutant le solvant du HNE (0,1 % d'éthanol). Valeurs \pm écarts types ($n = 3$). Différence significative (test de Tuckey, $p < 0,05$) a : vs. témoin.

HNE	GSX	GSSG	rapport
μM	nmol/mg de protéine	nmol/mg de protéine	GSX/GSSG
0	13,70 \pm 0,94	0,72 \pm 0,05	19,0
1	13,36 \pm 1,07	0,72 \pm 0,07	18,5
5	10,02 \pm 0,48 ^a	0,52 \pm 0,03 ^a	19,2
10	7,18 \pm 0,38 ^a	0,43 \pm 0,06 ^a	16,5
15	4,00 \pm 0,36 ^a	0,22 \pm 0,03 ^a	17,8
25	1,94 \pm 0,24 ^a	0,19 \pm 0,02 ^a	10,2

En résumé :

- **Les particules ufCB ont un potentiel oxydant élevé en conditions acellulaires.**
- **Une exposition de 24 heures aux particules ufCB induit une altération membranaire à partir de 50 µg/mL.**
- **La formation d'HNE est induite par les particules ufCB.**
- **Les particules ufCB induisent un stress oxydant mis en évidence par une diminution du rapport GSH/GSSG.**
- **Le HNE additionné aux cellules en culture génère un stress oxydant, mais il ne mime pas l'induction du stress oxydant induit par les particules ufCB.**

IV. ANALYSE ET DISCUSSION

Les études épidémiologiques ont permis d'établir une corrélation entre les PM_{2,5} et l'augmentation des pathologies pulmonaires et cardiaques liées au déclenchement d'une réponse inflammatoire systémique et pulmonaire. Les mécanismes biologiques à l'origine de ces effets sont encore mal élucidés. Pour pouvoir apporter des éléments de réponse, nous avons choisi d'étudier l'effet des PM_{2,5} sur un modèle de cellule immunitaire de type monocyte/macrophage. Ce modèle a permis d'aborder la réponse inflammatoire par la mesure de la sécrétion de différentes cytokines, après exposition à des polluants particuliers. Au-delà d'un effet pro-inflammatoire, les particules atmosphériques peuvent également moduler la réponse des cellules immunitaires à un pathogène. Ce dernier cas de figure a été expérimenté par une post-exposition aux LPS consécutive à l'exposition aux particules. Après l'examen des composés adsorbés sur les PM_{2,5} et des caractéristiques responsables des effets toxiques potentiels, il est apparu intéressant d'évaluer l'effet de différents métaux et HAP adsorbés sur des particules carbonées modèles de tailles micro- et nanométrique.

Le paramètre « taille des particules » est apparu comme déterminant dans la médiation de la réponse toxique. Ainsi, les expositions aux particules de tailles nanométriques se sont révélées particulièrement dommageables pour la réponse cellulaire. La caractérisation du potentiel oxydant de ces mêmes particules a suggéré que leurs effets biologiques pourraient être le résultat de l'induction d'un stress oxydant qui a été déterminé par la mesure de plusieurs facteurs associés à ce mécanisme. La production d'un produit de peroxydation lipidique particulièrement réactif, le HNE, nous a enfin conduit à émettre l'hypothèse d'un rôle possible de cette molécule dans la médiation de la réponse oxydative des particules.

Préparation des suspensions de particules en vue des tests biologiques

L'utilisation des PM_{2,5} pour des tests biologiques sur des cellules en culture est conditionnée par la remise en suspension des particules issues de l'impaction sur les filtres utilisés par les réseaux de mesure de la qualité de l'air. Pour ce travail, les PM_{2,5} ont été récupérées par ultrasons en mettant le filtre dans de l'eau ultra pure. Cette méthode pose le problème de la représentativité car une partie des PM_{2,5} reste sur le filtre. Or, les particules remises en suspension ne représentent qu'une fraction des PM_{2,5} collectées sur le filtre : les PM_{2,5} collectées en derniers puisque les plus en surface ou les particules les plus grosses de l'échantillon dont la taille ne permet pas de s'impacter profondément dans le filtre sont plus largement représentées dans l'échantillon. Toutefois, cette méthode reste la plus utilisée, de

nombreux auteurs utilisant une collecte sur filtre (quartz, téflon ou nitrocellulose) associée à une remise en suspension par ultrason sans pour autant évoquer les limites de cette méthode mentionnées précédemment (Soukup & Becker, 2001; Baulig *et al.*, 2004; Geng *et al.*, 2005). La nature du filtre est aussi apparue déterminante pour la qualité de la suspension obtenue car le relargage des composants du filtre est très variable selon sa composition. Cet aspect n'est cependant pas évoqué dans la littérature. Pour s'abstraire du support « filtre », l'alternative est l'utilisation un impacteur en cascade qui permet de collecter des particules sur une surface plane (métallique le plus souvent) dans laquelle les PM_{2,5} ne s'incrusteront pas. Cependant, cette surface doit être recouverte d'une graisse qui empêche les particules de se remettre en suspension. La graisse doit ensuite être dissoute à l'aide de solvants organiques qui pourraient entraîner la dissolution des composés organiques présents à la surface des particules, la suspension de particules dans le solvant doit ensuite être filtrée avec le risque de perdre les particules les plus fines. La collecte par impaction a été utilisée dans plusieurs études (Pozzi *et al.*, 2003; Becker *et al.*, 2005b; Pozzi *et al.*, 2005; Jalava *et al.*, 2006) et une seule équipe (Pozzi *et al.*, 2005) précise que pour la collecte, les surfaces de récupération ne sont pas recouvertes de graisse pour des raisons d'incompatibilité avec les tests biologiques envisagés. Cependant, on peut se demander si le fait de ne pas suivre les recommandations d'utilisation de l'appareil, n'entraîne pas un biais dans la taille des particules récupérer. Aussi, la méthode sur filtre a été retenue.

L'intérêt de notre travail, a été d'évaluer l'effet de composés sélectionnés adsorbés à la surface des particules sur la sécrétion de cytokines. En effet, les travaux évaluant l'effet des composés adsorbés sur les particules, procèdent à l'extraction des composés organiques à l'aide de solvants afin de mettre en solution les composés adsorbés aux particules (HAP par exemple) avant de tester leurs effets sur la sécrétion de cytokines (Bonvallot *et al.*, 2001; Devouassoux *et al.*, 2002; Siegel *et al.*, 2004; Vogel *et al.*, 2005; Baulig *et al.*, 2007). Des études similaires sont réalisées avec un solvant aqueux qui permet, en plus, de mettre en solution les métaux (Frampton *et al.*, 1999; Ghio, 2004; Baulig *et al.*, 2007). Toutefois, la composition et la concentration de ces extraits restent très peu connues. De plus, le comportement de ces composés peut être différent une fois en solution par rapport à leurs effets constatés lorsqu'ils sont adsorbés à la particule. C'est pourquoi, dans le cadre de notre étude, des particules de noir de carbone ont été dopées spécifiquement, à des concentrations connues en HAP et en métaux. Ceci permet d'avoir une approche complémentaire par rapport

aux études existantes. Parallèlement, l'influence de la taille des particules a été évaluée (CB et ufCB).

Les particules, étant de nature plutôt hydrophobes, leur mise en suspension nécessite l'utilisation de molécules permettant leur dispersion dans le solvant. Baulig et collaborateurs utilisent un phospholipide présent dans le surfactant des poumons, le Dipalmitoyl-sn-glycero-1-phosphocholine ou DPL (à 0,04 %). Cette molécule biocompatible permet une dispersion des particules et évite qu'elles ne s'agglomèrent entre elles (Baulig *et al.*, 2004). L'ajout de 1 % de SAB (à 0,02 % de DPL), améliore la durée de la dispersion des particules dans le milieu (Foucaud *et al.*, 2007). La composition de notre solution pour la mise en suspension a donc été de l'eau ultra pure avec 0,02 % de DPL, 1 % de SAB et 0,9 % de NaCl pour respecter l'osmolarité du milieu de culture. De plus, les suspensions de particules, avant d'être utilisées, sont placées dans un bain à ultrasons pendant 20 min afin d'avoir une dispersion optimale pour les tests biologiques. Dans ces conditions, aucun dépôt visible des particules ne peut être observé après 90 min dans la suspension (Foucaud *et al.*, 2007). Toutefois, un dépôt est observé au bout des 24 heures d'incubation dans le milieu de culture.

Au-delà de la dispersion des particules, celles-ci peuvent également interagir avec les composés du milieu. Ainsi une étude récente a montré que, dans certaines conditions, la quantité de cytokine mesurée après une exposition à des particules pouvait être sous estimée du fait qu'une part des cytokines s'adsorbe sur les particules. Une manière de limiter ce phénomène est d'utiliser une suspension de particules préparée dans une solution de SAB. Le SVF présent dans le milieu de culture permet également une atténuation de l'effet. Toutefois, l'adsorption dépend du type de particules, de la concentration en particule, de la concentration en SVF et de la cytokine considérée. Nos conditions expérimentales (suspension dans un tampon salin DPL/SAB et culture en présence de 10 % de SVF) semblent donc être optimales pour limiter ce phénomène (Kocbach *et al.*, 2008).

Sécrétion des cytokines après exposition aux particules

Après une exposition aux particules ou aux polluants, les seules cytokines détectées parmi celles mesurées (IL-1 β , IL-8, TNF- α , IL-6, IL-12 et IL-10), dans le milieu de culture sont l'IL-1 β et l'IL-8. Ces cytokines sont impliquées dans le processus pro-inflammatoire

précoce vis-à-vis d'un agent extérieur notamment de part leur capacité à mobiliser les neutrophiles (Kunkel *et al.*, 1991; Dinarello, 2002).

L'exposition aux particules ou aux polluants pendant 24 heures des cellules THP-1 induit systématiquement une augmentation de la sécrétion de l'IL-1 β par rapport aux témoins, sauf pour les particules dopées en HAP. En effet, les CB-HAP ne modifient pas la sécrétion d'IL-1 β et les ufCB-HAP la diminuent. Concernant l'IL-8 les PM_{2,5}, les CB, les HAP et les particules dopées en métaux induisent à augmentation de la sécrétion de cette cytokine. Par contre, les ufCB-HAP et certains métaux provoquent une diminution (Tableau 21). Ces inductions de sécrétion d'IL-1 β et d'IL-8 traduisent un effet pro-inflammatoire des particules et/ou polluants.

Tableau 21 : Effets des particules, des métaux et des HAP sur la sécrétion des cytokines IL-1 β et IL-8. Les cellules THP-1 différenciées ont été exposées pendant 24 heures aux différents polluants, les concentrations en cytokines mesurées dans les surnageants de cultures sont comparées aux témoins non exposés respectifs.

Polluants	IL-1 β	IL-8
PM _{2,5}	↗	↗
CB	↗	↗
ufCB	↗	↗ ou ↘*
Métaux	↗	→ ou ↘
HAP	↗	↗
Particules + métaux	↗	↗
Particules + HAP	→(CB) ou ↘(ufCB)	↗(CB) ou ↘(ufCB)

* ces résultats diffèrent selon le protocole de différenciation utilisé

Cet effet pro-inflammatoire de PM_{2,5} (collectées à Dunkerque, exposition pendant 24 heures à 75,36 $\mu\text{g}/\text{mL}$), a également été observé par une augmentation de la sécrétion de l'IL-1 β , l'IL-8 et du TNF- α par des cellules épithéliales pulmonaires humaines L132 (Dagher *et al.*, 2005; Garcon *et al.*, 2006). De même, des PM_{2,5} (collectées à New York, exposition pendant 24 heures à des concentrations de 5 et 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), induisent chez une culture primaire de macrophages alvéolaires humains la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (IL-8, IL-6 et TNF- α) (Payne *et al.*, 2004). D'autres observations, utilisant des cultures primaires de cellules épithéliales bronchiques humaines, ont montré une augmentation de la sécrétion d'IL-1 β , d'IL-8 et de GM-CSF suite à une exposition à des particules standards atmosphériques

d'un diamètre moyen de 0,5 μM (EHC-93) (Vincent *et al.*, 1997). Ces mêmes particules induisent la sécrétion d'IL-1 β , de TNF- α , d'IL-6 et de GM-CSF par des monocytes humains provenant de lavages broncho-alvéolaires (van Eeden *et al.*, 2001). Globalement, les études *in vitro* réalisées avec des PM_{2,5} montrent donc un effet pro-inflammatoire marqué de ces particules quelque soit le modèle cellulaire. De nombreuses études *in vivo* confirment l'action pro-inflammatoire des particules et ont montré, suite à des inhalations ou des instillations de particules, une inflammation pulmonaire caractérisée par une concentration importante de polynucléaires neutrophiles dans le liquide des lavages broncho-alvéolaires et une augmentation de l'expression de cytokines pro-inflammatoires. A titre d'exemple, dans les lavages broncho-alvéolaires de rats adultes Sprague-Dawley exposés par inhalation pendant 3 jours (5 heures/jour) à des PM_{2,5} (126 à 481 $\mu\text{g}/\text{m}^3$), une augmentation du nombre de neutrophiles est observée (Saldiva *et al.*, 2002). De même, des souris exposées par instillation à des particules de tailles inférieures à 1,7 μM (collectées en Caroline du Nord, exposition pendant 18 heures à une concentration de 100 $\mu\text{g}/\text{souris}$) présentent une augmentation de l'IL-6, du TNF- α et du nombre de neutrophiles dans les lavages broncho-alvéolaires (Dick *et al.*, 2003). Chez l'homme, ces mêmes observations ont été faites. En effet, des volontaires sains exposés par inhalation pendant 2 heures à un air ambiant contenant de 6 à 10 fois plus de particules (PM_{0,1-2,5}) que la normale, montrent une légère augmentation du nombre de neutrophiles dans les lavages broncho-alvéolaires (Ghio *et al.*, 2000).

Quelques soit le type de particules atmosphériques utilisées, un effet pro-inflammatoire est observé aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* (sécrétion de cytokines pro-inflammatoire et/ou présence de neutrophiles). Pour autant, de nombreuses études s'intéressent aux paramètres physico-chimiques des particules, en vue d'établir une corrélation entre composition chimique et/ou propriété physique des particules et leur capacité à induire un effet pro-inflammatoire.

Pour étudier plus particulièrement l'effet des HAP adsorbés à la surface des particules, les auteurs ont eu souvent recours à l'utilisation des DEP dont la teneur en HAP est élevée. Des cellules épithéliales humaines A549 exposées à des DEP à une concentration de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sécrètent des quantités d'IL-8 et d'IL-6 plus importantes que dans les témoins (Mazzarella *et al.*, 2007). Les travaux de Bolland et collaborateurs démontrent également l'implication des HAP adsorbés aux DEP dans l'induction d'une réponse inflammatoire. Ainsi des cellules épithéliales humaines de type 16HBE14o- exposées à des DEP pendant 24 heures

sécrètent de l'IL-1 β , de l'IL-8 et du GM-CSF. Cette induction de la sécrétion semble liée à la présence des composés organiques adsorbés (HAP principalement) dans la mesure où des particules de carbones induisent une réponse plus faible. De plus, cette induction ne dépend pas des métaux éventuellement présents, puisque l'ajout d'un chélateur de métaux (déferroxamine) n'inhibe pas cette réponse (Boland *et al.*, 1999; Boland *et al.*, 2000). Toutefois, les métaux associés aux particules peuvent également être responsables d'un phénomène inflammatoire. Des extraits aqueux de particules collectées pendant le fonctionnement d'une aciérie (particules fortement chargées en métaux dont Fe, Cu, Ni, Pb et Zn) dans la vallée de l'Utah induisent une sécrétion d'IL-8 et d'IL-6 chez des cellules épithéliales humaines de type BEAS-2B (Frampton *et al.*, 1999). Nos résultats ont montré que les métaux en solutions peuvent effectivement induire la sécrétion de l'IL-1 β mais pas de l'IL-8 dans les cellules THP-1. En revanche, dans la majorité des conditions testées dans notre étude, leur adsorption à la surface des particules de carbones semble potentialiser la capacité des particules à induire la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires.

La taille des particules est un paramètre qui peut aussi influencer la réponse immunitaire. En effet, une étude comparative sur l'effet de la taille des particules de noir de carbone a été réalisée sur des cellules épithéliales humaines A549 (Printex 90 (ufCB) et de Hubber 990 (CB)). Ces auteurs ont ainsi montré des augmentations de la sécrétion d'IL-8 variables selon la taille et selon les doses d'exposition. Les CB induisent la sécrétion d'IL-8 uniquement à 250 $\mu\text{g/mL}$. Au contraire, pour les ufCB, une induction plus importante et dose dépendante est observée à partir de 15 $\mu\text{g/mL}$ jusqu'à 63 $\mu\text{g/mL}$ (Monteiller *et al.*, 2007). En revanche, nos résultats montrent une induction de la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires et plus particulièrement de l'IL-8 aussi bien pour les CB que pour les ufCB. Toutefois l'exposition aux ufCB des cellules THP-1 différenciées avec une concentration en PMA de 0,2 μM induit au contraire une chute significative de la sécrétion. L'origine de cette diminution spécifique de l'IL-8 reste à déterminer.

Modulation de la réponse aux LPS par les particules

L'effet d'une pré-exposition à des particules sur la capacité des THP-1 à répondre à un agent pathogène a également été étudié dans le cadre de ce travail. Les cellules THP-1 ont été exposées 24 heures aux polluants, puis 24 heures aux LPS en absence de polluant. Les

cytokines mesurées sont : l'IL-1 β , l'IL-8, l'IL-6, le TNF- α , l'IL-12 et l'IL-10. L'IL-6 et le TNF- α sont des cytokines de la phase aiguë de l'inflammation. L'IL-10 et l'IL-12 sont des cytokines de régulation de réponse immunitaire cellulaire.

Les différentes cytokines mesurées peuvent être classées selon leurs actions au cours de la réponse inflammatoire. Ainsi l'IL-1 β et l'IL-8 peuvent être qualifiées de cytokines précoces, l'IL-6 et le TNF- α de cytokines de la phase aiguë de l'inflammation, l'IL-10 et l'IL-12 de cytokines de régulation. Nous avons pu constater dans notre étude que les sécrétions d'IL-1 β et d'IL-8 en réponse aux LPS après des pré-expositions aux polluants particulaires étaient significativement différentes. En revanche une grande similarité dans les sécrétions d'IL-6 et de TNF- α a été observée. Concernant l'IL-12 et l'IL-10, leurs sécrétions en réponse aux LPS après une pré-exposition aux polluants particulaires sont différentes (Tableau 22).

Tableau 22 : Effets des particules, des métaux et des HAP sur la sécrétion des cytokines IL-1 β , IL-8, IL-6, TNF- α , IL-12 et IL-10 après stimulation par les LPS. Les cellules THP-1 différenciées ont été exposées pendant 24 heures aux différents polluants, suivi par une incubation aux LPS (10 ng/mL pour IL-1 β , IL-8, IL-6, TNF- α et 100 ng/mL pour IL-12 et IL-10) pendant 24 heures. Les concentrations en cytokines mesurées dans les surnageants de cultures sont comparées aux témoins non exposés respectifs. - : non déterminé.

Polluants	IL-1 β	IL-8	IL-6	TNF- α	IL-12	IL-10
	<i>Cytokines précoces</i>		<i>Cytokines de la phase aiguë de l'inflammation</i>		<i>Cytokines de régulation</i>	
PM_{2,5}	→ ou ↘ (automne)	→ ou ↗	↗ ou ↘ (automne)	↗ ou ↘ (automne)	-	-
CB	↘	↗	↗	↗	→	↗
ufCB	↘	↘	↗	↗	↘	→
Métaux	↘	→ ou ↘	→ ou ↘	→ ou ↘	-	-
HAP	↗	↗	-	-	↗	→
Particules + métaux	↘	↗	↗	→ ou ↗	-	-
Particules + HAP	↘	↗ (CB) ou ↘ (ufCB)	-	-	→	↗

Peu de travaux dans la littérature reportent l'effet des particules sur la réponse aux LPS de cellules immunitaires. Une étude concernant l'action des CB puis des LPS a été réalisée par Mundandhara et collaborateurs (2006). Dans cette étude, la production d'IL-8 et en TNF- α par des macrophages alvéolaires humains exposés à 200 μ g/ml de CB puis 1 ng/mL de LPS n'est pas modifiée, alors que nos expérimentations ont montré au contraire une induction de la sécrétion. Cette différence peut s'expliquer en partie par les différentes

concentrations en CB (50 µg/mL dans notre étude contre 200 µg/mL) et en LPS (10 ng/mL dans notre étude contre 1 ng/mL) utilisées. Les principaux résultats concernent essentiellement les DEP et les HAP adsorbés. Ainsi, une inhibition de la sécrétion de l'IL-1 chez des macrophages alvéolaires de rats après exposition à des DEP puis LPS a été montrée (Yang *et al.*, 1997). Ce résultat est en accord avec nos observations si on les compare avec les résultats obtenus avec les particules dopées en HAP. Une autre étude portant sur les DEP et les extraits organiques de DEP, montre que des macrophages alvéolaires humains exposés à ces polluants pendant 24 heures, puis à des LPS, produisent moins d'IL-8 et de TNF-α par rapport aux cellules non exposées (Mundandhara *et al.*, 2006). Ce résultat va à l'encontre des mesures obtenues pour l'IL-8 avec les HAP seuls dans notre étude. Cette différence peut s'expliquer par la diversité et la concentration élevée des composants organiques contenus dans les DEP.

Des expositions aux DEP et aux LPS peuvent modifier les sécrétions d'IL-10 aboutissant à une induction ou une inhibition selon les concentrations utilisées (Pacheco *et al.*, 2001). Ainsi, la sécrétion de l'IL-10 n'est observée que pour des doses élevées en DEP (> 30 µg/mL) et en LPS (> 100 ng/mL) (Pacheco *et al.*, 2001). Dans notre cas, la mesure d'IL-10 nécessite une concentration en LPS de 100 ng/mL pour induire une sécrétion mesurable. Cette dernière est augmentée par une pré-exposition aux particules dopées en HAP.

Concernant les études *in vivo*, une exposition intra-trachéale de rats à des DEP inhibe la sécrétion des cytokines (IL-1 et TNF-α) par les macrophages alvéolaires en réponse à une exposition à des LPS alors que les CB n'ont pas d'effet. La présence de composés adsorbés (HAP notamment) à la surface des particules pourrait de ce fait contribuer à une sensibilisation des individus à des infections pulmonaires (Yang *et al.*, 1999). Nos résultats montrent également une diminution des cytokines précoces pro-inflammatoires après une exposition aux particules dopées aux HAP.

L'ensemble des résultats a montré de nombreuses modifications des sécrétions des cytokines en réponse aux LPS, les mécanismes qui sous-tendent ces observations ne sont pas encore connus. Mais l'hypothèse d'une interaction directe des particules avec les protéines de signalisation intracellulaire peut être avancée (Figure 43). Les LPS, en se liant au TLR-4 *via* le LBP et le CD14, induisent les voies de signalisations du NF-κB et des MAPKs

responsables de la synthèse des cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , IL-8, IL-6 et TNF- α). Selon Pacheco et collaborateurs (2001), les DEP se lient au facteur de transcription NF- κ B au niveau des sites promoteurs des cytokines et peuvent exercer aussi bien un effet inhibiteur qu'un effet stimulateur sur la transcription des gènes (Pacheco *et al.*, 2001; Chan *et al.*, 2006). De plus, il a été montré que la fraction organique des DEP (HAP notamment) induisait une activation des voies MAPKs (Bonvallot *et al.*, 2001). De même, un effet des PM₁₀ sur les protéines de la voie des MAPKs et sur l'activation des facteurs de transcription AP-1 et NF- κ B a été montré. Les particules favorisent la fixation de ces facteurs de transcription sur les sites promoteurs des médiateurs de l'inflammation (Donaldson & Stone, 2003). En effet, de part leur taille, certaines particules peuvent pénétrer dans le cytoplasme des cellules et perturber les processus de phosphorylation des MAPKs et/ou l'activation des facteurs de transcription, donc la production de cytokines. Ainsi, les CB pénètrent dans les cellules par endocytose se situant dans une vacuole phagocytaire, alors que les particules les ufCB sont observées au niveau du cytosol et dans des organites. Cependant leur mécanisme de pénétration n'est pas complètement élucidé (Geiser *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2008).

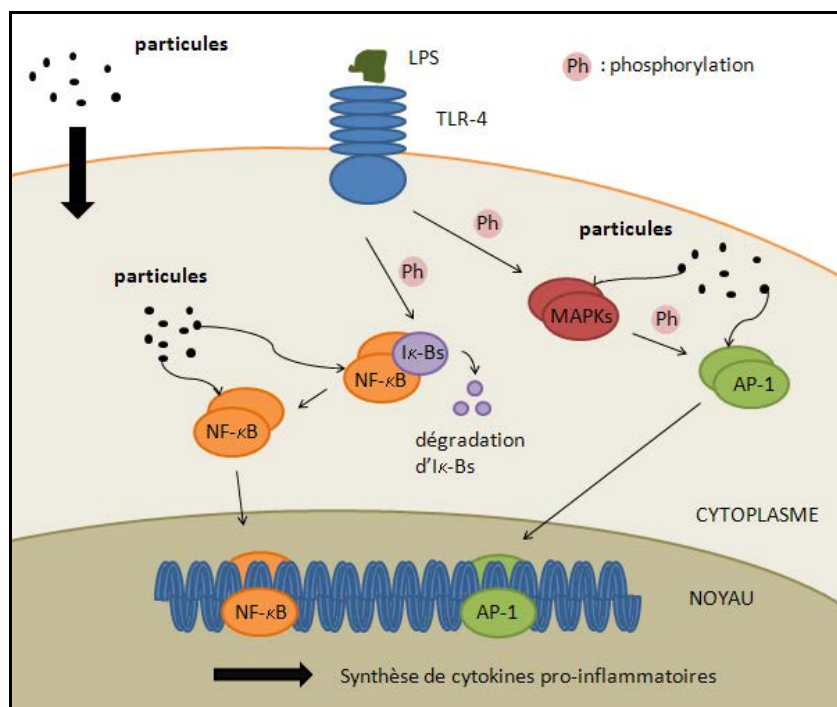


Figure 43 : Hypothèse d'interactions possibles des particules avec les voies de transduction du TLR-4. En réponse à des LPS, la transduction du signal passe par l'activation des voies du NF- κ B et des MAPKs qui induit la synthèse de cytokines pro-inflammatoires, d'après Kawai & Akira (2006).

Induction du stress oxydant par les particules ultrafines, le rôle du HNE

Les ufCB induisent des modifications significatives de la sécrétion des cytokines qui pourraient être la conséquence d'un déséquilibre oxydant de la cellule comme suggéré par différents auteurs (Donaldson and Stone, 2003).

La mesure en milieu acellulaire du potentiel oxydant des particules de noir de carbone ufCB et CB a mis en évidence que seuls les ufCB présentent un potentiel oxydant dans nos conditions expérimentales. La capacité des ufCB à générer un stress oxydant intracellulaire a aussi été mise en évidence par une diminution du rapport GSH/GSSG. Montellier et collaborateurs ont aussi montré une diminution des concentrations intracellulaires de GSH après exposition (pendant 4 heures) pour divers particules dont des ufCB, sur des cellules épithéliales humaines de type A549 (Monteiller *et al.*, 2007). Le stress oxydant serait la conséquence de la propriété des ufCB à générer des ROS (Stone *et al.*, 1998; Donaldson & Stone, 2003; Beck-Speier *et al.*, 2005; Koike & Kobayashi, 2006). La génération des ROS par les ufCB expliquerait non seulement l'induction du stress oxydant mais aussi l'induction de la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires *via* l'activation des voies de signalisation intracellulaires dépendante du statut redox de la cellule (Figure 44). Les DEP, ainsi que les particules atmosphériques sont également susceptibles de générer la formation de ROS de part leur composition en HAP et métaux (réaction de Fenton) (Hiura *et al.*, 1999; Tao *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2008).

Les ROS engendrés par les ufCB sont susceptibles de réagir avec les lipides des membranes cellulaires et peuvent être à l'origine de la formation de HNE (Forman *et al.*, 2008). Nous avons effectivement mis en évidence au cours de ce travail la formation de HNE après exposition des THP-1 à des ufCB. Une récente étude a montré par ailleurs la formation du MDA, un autre composé de la peroxydation lipidique dans des macrophages alvéolaires de rats, *in vitro*, après une exposition à des particules de noir de carbone mais aussi à des DEP (Lundborg *et al.*, 2007). Les particules ultrafines induisent donc une peroxydation lipidique en conditions *in vitro* démontrée par la formation de MDA et de HNE.

Le HNE est connu à la fois comme marqueur de la peroxydation lipidique mais aussi comme un médiateur du stress oxydant (Uchida, 2003). Nous avons donc émis l'hypothèse

que le HNE formé suite aux expositions aux particules ufCB, pouvait être impliqué dans le stress oxydant induit par ces particules (Figure 44).

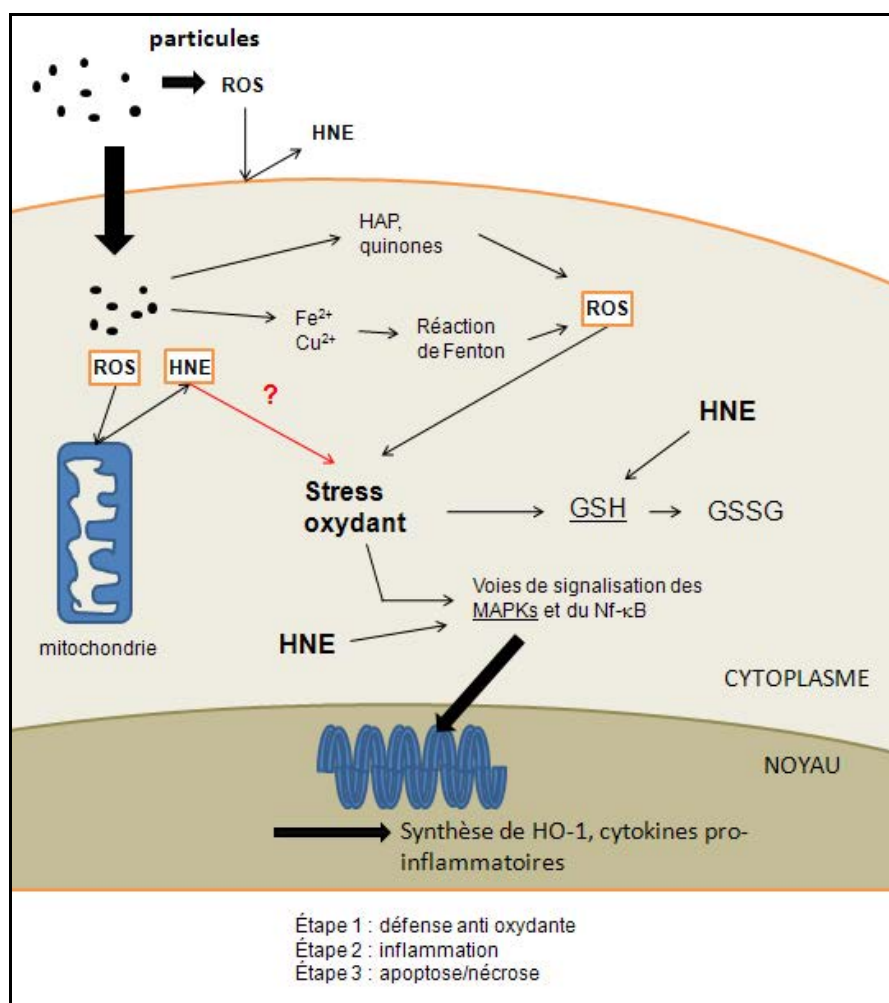


Figure 44 : Induction du stress oxydant et des cytokines pro-inflammatoires par les particules ultrafines, rôle hypothétique du HNE. Les particules induisent la formation de ROS qui provoquent un stress oxydant impliqué dans la régulation de l'expression des protéines anti-oxydantes et des cytokines pro-inflammatoires. La peroxydation lipidique et la formation de HNE qui en découle peut-elle contribuer à ce phénomène ? d'après Donaldson (2003) et Li (2008) (Donaldson & Stone, 2003; Li et al., 2008).

Pour vérifier cette hypothèse, des marqueurs du stress oxydant ont été mesurés après expositions des cellules THP-1 au HNE. Ce composé induit l'expression de la HO-1 contrairement aux ufCB. L'induction de la HO-1 par le HNE est en accord avec des résultats obtenus sur des cellules pulmonaires de souris (Li *et al.*, 1996) mais aussi sur des macrophages humains (Hamilton *et al.*, 1998). L'induction de la HO-1 au niveau transcriptionnel par le HNE a été démontrée dans des cellules épithéliales pulmonaires. Les auteurs ont également identifié une partie de la voie de signalisation activée, il s'agit de l'ERK, une des voies de signalisation des MAPKs (Iles *et al.*, 2005).

Dans nos conditions expérimentales, le HNE induit une diminution dose-dépendante de la concentration en glutathion oxydé et réduit. Bien que les ufCB induisent aussi une diminution du glutathion total, il s'accompagne d'une élévation du taux de glutathion oxydé. La diminution du glutathion suite à l'exposition au HNE pourrait traduire une conjugaison entre le HNE et le glutathion, suivie d'une exportation hors de la cellule (Enoiu *et al.*, 2002). Des observations comparables ont été montrées sur des cellules humaines HBE1 : après une exposition de 3 heures au HNE (de 5 μ M à 30 μ M), la concentration en glutathion est soit inchangée soit diminuée selon la dose : pour une concentration de 30 μ M, la quantité de glutathion est diminuée de 70 % ; pour la concentration de 5 μ M, la concentration est inchangée et à partir de 10 μ M elle diminue de manière dose-dépendante (Dickinson *et al.*, 2002). Dans nos conditions expérimentales, la diminution du glutathion peut aussi s'expliquer par une fuite non spécifique des molécules de bas poids moléculaire du fait de l'altération membranaire importante traduite par la mesure de la libération de LDH (47 % de cytotoxicité à 25 μ M).

Le HNE induit effectivement un stress oxydant mais il ne mime pas les modifications induites par les ufCB.

V. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Ce travail a permis de montrer que d'une manière générale, les particules ont un effet modulateur sur la sécrétion des cytokines. Les particules atmosphériques PM_{2,5} induisent la sécrétion de l'IL-1 β et de l'IL-8 par les cellules THP-1 de manière significativement différente selon la saison. Il a été montré notamment que les PM_{2,5} automnales augmentent de 10 fois la sécrétion de l'IL-1 β . L'exposition à des LPS après exposition à des PM_{2,5} induit la sécrétion de l'IL-6 et du TNF- α , alors que les sécrétions d'IL-1 β et d'IL-8 sont inchangées par rapport aux témoins. Concernant l'effet des composés adsorbés sur les particules, il a été montré, dans nos conditions expérimentales, que les métaux testés (Fer, Zinc, Plomb et Cuivre) n'affectent pas la sécrétion des cytokines. En revanche, parmi les HAP testés, le B[a]P a un effet pro-inflammatoire. Les CB dopées en HAP, n'ont pas d'effet inflammatoire plus important que les CB non dopées, ceci pourrait être la conséquence d'une biodisponibilité diminuée des HAP. Les ufCB induisent une diminution de la sécrétion de cytokines. Cet effet est encore plus significatif lorsque les ufCB sont dopées en HAP. Ces résultats suggèrent un important effet immuno-toxique. La taille apparaît comme le paramètre prépondérant dans la modulation de la sécrétion de cytokines. En effet, les particules ultrafines de noir de carbone semblent avoir un effet inhibiteur sur la sécrétion de cytokines alors que les particules fines n'ont pas d'effet ou un faible effet inducteur.

C'est pourquoi, seules les particules ultrafines ont été retenues pour l'étude du stress oxydant. En effet il a été montré que les ufCB ont un potentiel oxydant en système acellulaire plus important que les CB, elles ont donc été choisies car elles sont susceptibles de générer un déséquilibre de la balance oxydante des cellules. Il a été montré que les ufCB induisent un stress oxydant car le rapport GSH/GSSG est diminué par rapport aux témoins. De plus, la formation d'un produit de la peroxydation lipidique, le HNE, a été mise en évidence suite à l'exposition aux ufCB. Le HNE est capable d'induire un stress oxydant (modification du rapport GSH/GSSG et modulation de l'expression de la HO-1). Cependant, le HNE ne mime pas l'induction du stress oxydant induit par les cellules. C'est pourquoi il n'est pas possible de conclure quant à l'implication du HNE dans le déclenchement de la réponse oxydante aux particules. Cependant, il constitue un marqueur de la peroxydation lipidique après une exposition à des particules présentant un caractère oxydant.

Dans la perspective d'une campagne de prélèvement de $PM_{2,5}$ associée à une mesure *in vitro* de leurs effets biologiques, différents indicateurs peuvent être envisagés. Toutefois, la mesure de la sécrétion d'IL-1 β par des cellules THP-1 exposées à ces particules après 24 heures a permis d'obtenir des réponses significativement différentes selon la saison envisagée, donc une différence de leur potentiel pro-inflammatoire. La mesure de cette seule cytokine dans ces conditions expérimentales semble être une approche intéressante.

Comme il a été observé que la toxicité de particules de noir de carbone est déterminée par la taille, il serait également intéressant d'étudier l'effet de la taille de particules atmosphériques sur leur potentiel oxydant. En effet, les techniques de prélèvements permettant de collecter des $PM_{2,5}$ et des PM_1 il sera désormais possible de mettre en évidence une modulation de l'induction du stress oxydant en fonction de la taille de particules atmosphériques. Cette modulation pourra être mise en évidence par la mesure de marqueurs du stress oxydant comme le glutathion mais aussi le HNE, produit de la peroxydation lipidique dont la formation a été montrée après un contact à des particules ultrafines de noir de carbone. La mesure de la sécrétion de cytokines en parallèle permettrait de mieux comprendre le lien entre les phénomènes inflammatoires et l'induction d'un stress oxydant induit par les particules atmosphériques.

VI. RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abrink M, Gobl AE, Huang R, Nilsson K & Hellman L. (1994). Human cell lines U-937, THP-1 and Mono Mac 6 represent relatively immature cells of the monocyte-macrophage cell lineage. *Leukemia* **8**, 1579-1584.
- AFNOR. (1985). Air ambiant - Concepts relatifs à l'échantillonnage des matières particulaires en suspension (Norme AFNOR X43-022).
- Akira S & Takeda K. (2004). Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* **4**, 499-511.
- Alastuey A, Querol X, Plana F, Viana M, Ruiz CR, Sanchez de la Campa A, de la Rosa J, Mantilla E & Garcia dos Santos S. (2006). Identification and chemical characterization of industrial particulate matter sources in southwest Spain. *J Air Waste Manag Assoc* **56**, 993-1006.
- Anderson M, Svartengren M, Philipson K & P. C. (1988). Regional human lung deposition studied by repeated investigations. *J Aerosol Sci* **19**, 1121-1124.
- Auwerx J. (1991). The human leukemia cell line, THP-1: a multifaceted model for the study of monocyte-macrophage differentiation. *Experientia* **47**, 22-31.
- Baeza-Squiban A, Bonvallet V, Boland S & Marano F. (1999). Airborne particles evoke an inflammatory response in human airway epithelium. Activation of transcription factors. *Cell Biol Toxicol* **15**, 375-380.
- Baeza A & Marano F. (2007). [Air pollution and respiratory diseases: a central role for oxidative stress]. *Med Sci (Paris)* **23**, 497-501.
- Baggiolini M, Loetscher P & Moser B. (1995). Interleukin-8 and the chemokine family. *Int J Immunopharmacol* **17**, 103-108.
- Bai Y, Suzuki AK & Sagai M. (2001). The cytotoxic effects of diesel exhaust particles on human pulmonary artery endothelial cells in vitro: role of active oxygen species. *Free Radic Biol Med* **30**, 555-562.
- Baker MA, Cerniglia GJ & Zaman A. (1990). Microtiter plate assay for the measurement of glutathione and glutathione disulfide in large numbers of biological samples. *Anal Biochem* **190**, 360-365.
- Balashazy I, Hofmann W & Heistracher T. (2003). Local particle deposition patterns may play a key role in the development of lung cancer. *J Appl Physiol* **94**, 1719-1725.
- Barbara JA, Van ostade X & Lopez A. (1996). Tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha): the good, the bad and potentially very effective. *Immunol Cell Biol* **74**, 434-443.
- Barlow PG, Brown DM, Donaldson K, MacCallum J & Stone V. (2008). Reduced alveolar macrophage migration induced by acute ambient particle (PM10) exposure. *Cell Biol Toxicol* **24**, 243-252.
- Baulig A. (2004a). Rôle des particules fines PM2,5 dans l'induction des pathologies respiratoires d'origine inflammatoire. Comparaison avec les particules de Diesel.

- Baulig A. (2004b). Rôle des particules fines PM_{2,5} dans l'induction des pathologies respiratoires d'origine inflammatoire. Comparaison avec les particules de Diesel. Université Paris VII - Denis Diderot, Paris.
- Baulig A, Blanchet S, Rumelhard M, Lacroix G, Marano F & Baeza-Squiban A. (2007). Fine urban atmospheric particulate matter modulates inflammatory gene and protein expression in human bronchial epithelial cells. *Front Biosci* **12**, 771-782.
- Baulig A, Poirault JJ, Ausset P, Schins R, Shi T, Baralle D, Dorlhene P, Meyer M, Lefevre R, Baeza-Squiban A & Marano F. (2004). Physicochemical characteristics and biological activities of seasonal atmospheric particulate matter sampling in two locations of Paris. *Environ Sci Technol* **38**, 5985-5992.
- Baulig A, Sourdeval M, Meyer M, Marano F & Baeza-Squiban A. (2003). Biological effects of atmospheric particles on human bronchial epithelial cells. Comparison with diesel exhaust particles. *Toxicol In Vitro* **17**, 567-573.
- Baumann H & Gauldie J. (1994). The acute phase response. *Immunol Today* **15**, 74-80.
- Bazzoni F & Beutler B. (1996). The tumor necrosis factor ligand and receptor families. *N Engl J Med* **334**, 1717-1725.
- Beck-Speier I, Dayal N, Karg E, Maier KL, Schumann G, Schulz H, Semmler M, Takenaka S, Stettmaier K, Bors W, Ghio A, Samet JM & Heyder J. (2005). Oxidative stress and lipid mediators induced in alveolar macrophages by ultrafine particles. *Free Radic Biol Med* **38**, 1080-1092.
- Becker S, Dailey L, Soukup JM, Silbajoris R & Devlin RB. (2005a). TLR-2 is involved in airway epithelial cell response to air pollution particles. *Toxicol Appl Pharmacol* **203**, 45-52.
- Becker S, Dailey LA, Soukup JM, Grambow SC, Devlin RB & Huang YC. (2005b). Seasonal variations in air pollution particle-induced inflammatory mediator release and oxidative stress. *Environ Health Perspect* **113**, 1032-1038.
- Benoit M, Desnues B & Mege JL. (2008). Macrophage polarization in bacterial infections. *J Immunol* **181**, 3733-3739.
- Bevilacqua MP, Nelson RM, Mannori G & Cecconi O. (1994). Endothelial-leukocyte adhesion molecules in human disease. *Annu Rev Med* **45**, 361-378.
- Boland S, Baeza-Squiban A, Fournier T, Houcine O, Gendron MC, Chevrier M, Jouvenot G, Coste A, Aubier M & Marano F. (1999). Diesel exhaust particles are taken up by human airway epithelial cells in vitro and alter cytokine production. *Am J Physiol* **276**, L604-613.
- Boland S, Bonvallet V, Fournier T, Baeza-Squiban A, Aubier M & Marano F. (2000). Mechanisms of GM-CSF increase by diesel exhaust particles in human airway epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **278**, L25-32.

- Bolton JL, Trush MA, Penning TM, Dryhurst G & Monks TJ. (2000). Role of quinones in toxicology. *Chem Res Toxicol* **13**, 135-160.
- Bonvallot V, Baeza-Squiban A, Baulig A, Brulant S, Boland S, Muzeau F, Barouki R & Marano F. (2001). Organic compounds from diesel exhaust particles elicit a proinflammatory response in human airway epithelial cells and induce cytochrome p450 1A1 expression. *Am J Respir Cell Mol Biol* **25**, 515-521.
- Borm PJ, Robbins D, Haubold S, Kuhlbusch T, Fissan H, Donaldson K, Schins R, Stone V, Kreyling W, Lademann J, Krutmann J, Warheit D & Oberdorster E. (2006). The potential risks of nanomaterials: a review carried out for ECETOC. *Part Fibre Toxicol* **3**, 11.
- Brook RD. (2008). Cardiovascular effects of air pollution. *Clin Sci (Lond)* **115**, 175-187.
- Brook RD, Franklin B, Cascio W, Hong Y, Howard G, Lipsett M, Luepker R, Mittleman M, Samet J, Smith SC, Jr. & Tager I. (2004). Air pollution and cardiovascular disease: a statement for healthcare professionals from the Expert Panel on Population and Prevention Science of the American Heart Association. *Circulation* **109**, 2655-2671.
- Brown DM, Donaldson K, Borm PJ, Schins RP, Dehnhardt M, Gilmour P, Jimenez LA & Stone V. (2004a). Calcium and ROS-mediated activation of transcription factors and TNF-alpha cytokine gene expression in macrophages exposed to ultrafine particles. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **286**, L344-353.
- Brown DM, Donaldson K & Stone V. (2004b). Effects of PM10 in human peripheral blood monocytes and J774 macrophages. *Respir Res* **5**, 29.
- Brown DM, Wilson MR, MacNee W, Stone V & Donaldson K. (2001). Size-dependent proinflammatory effects of ultrafine polystyrene particles: a role for surface area and oxidative stress in the enhanced activity of ultrafines. *Toxicol Appl Pharmacol* **175**, 191-199.
- Burgess AW & Metcalf D. (1980). The nature and action of granulocyte-macrophage colony stimulating factors. *Blood* **56**, 947-958.
- Carty CL, Gehring U, Cyrus J, Bischof W & Heinrich J. (2003). Seasonal variability of endotoxin in ambient fine particulate matter. *J Environ Monit* **5**, 953-958.
- Chan RC, Wang M, Li N, Yanagawa Y, Onoe K, Lee JJ & Nel AE. (2006). Pro-oxidative diesel exhaust particle chemicals inhibit LPS-induced dendritic cell responses involved in T-helper differentiation. *J Allergy Clin Immunol* **118**, 455-465.
- Chatenoud L & Dy M. (2002). Cytokines. In *Immunologie*, 4ème edn, ed. Flammarion, pp. 142. Corlet, Paris.
- Chen Q, Carroll HP & Gadina M. (2006). The newest interleukins: recent additions to the ever-growing cytokine family. *Vitam Horm* **74**, 207-228.

- Cho HY, Reddy SP & Kleeberger SR. (2006). Nrf2 defends the lung from oxidative stress. *Antioxid Redox Signal* **8**, 76-87.
- Choi AM & Alam J. (1996). Heme oxygenase-1: function, regulation, and implication of a novel stress-inducible protein in oxidant-induced lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol* **15**, 9-19.
- Choi JH, Kim JS, Kim YC, Kim YS, Chung NH & Cho MH. (2004). Comparative study of PM2.5 - and PM10 - induced oxidative stress in rat lung epithelial cells. *J Vet Sci* **5**, 11-18.
- Chung F. (2001). Anti-inflammatory cytokines in asthma and allergy: interleukin-10, interleukin-12, interferon-gamma. *Mediators Inflamm* **10**, 51-59.
- Churg A & Brauer M. (1997). Human lung parenchyma retains PM2.5. *Am J Respir Crit Care Med* **155**, 2109-2111.
- Churg A, Wright JL & Stevens B. (1990). Exogenous mineral particles in the human bronchial mucosa and lung parenchyma. I. Nonsmokers in the general population. *Exp Lung Res* **16**, 159-175.
- Collison LW & Vignali DA. (2008). Interleukin-35: odd one out or part of the family? *Immunol Rev* **226**, 248-262.
- Comporti M. (1998). Lipid peroxidation and biogenic aldehydes: from the identification of 4-hydroxynonenal to further achievements in biopathology. *Free Radic Res* **28**, 623-635.
- Dagher Z, Garcon G, Billet S, Gosset P, Ledoux F, Courcot D, Aboukais A & Shirali P. (2006). Activation of different pathways of apoptosis by air pollution particulate matter (PM2.5) in human epithelial lung cells (L132) in culture. *Toxicology* **225**, 12-24.
- Dagher Z, Garcon G, Gosset P, Ledoux F, Surpateanu G, Courcot D, Aboukais A, Puskaric E & Shirali P. (2005). Pro-inflammatory effects of Dunkerque city air pollution particulate matter 2.5 in human epithelial lung cells (L132) in culture. *J Appl Toxicol* **25**, 166-175.
- Daigle CC, Chalupa DC, Gibb FR, Morrow PE, Oberdorster G, Utell MJ & Frampton MW. (2003). Ultrafine particle deposition in humans during rest and exercise. *Inhal Toxicol* **15**, 539-552.
- Dalal NS, Suryan MM, Vallyathan V, Green FH, Jafari B & Wheeler R. (1989). Detection of reactive free radicals in fresh coal mine dust and their implication for pulmonary injury. *Ann Occup Hyg* **33**, 79-84.
- Decker T & Lohmann-Matthes ML. (1988). A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity. *J Immunol Methods* **115**, 61-69.

- Decker T, Stockinger S, Karaghiosoff M, Muller M & Kovarik P. (2002). IFNs and STATs in innate immunity to microorganisms. *J Clin Invest* **109**, 1271-1277.
- Devouassoux G, Saxon A, Metcalfe DD, Prussin C, Colomb MG, Brambilla C & Diaz-Sanchez D. (2002). Chemical constituents of diesel exhaust particles induce IL-4 production and histamine release by human basophils. *J Allergy Clin Immunol* **109**, 847-853.
- Diaz-Sanchez D. (1997). The role of diesel exhaust particles and their associated polyaromatic hydrocarbons in the induction of allergic airway disease. *Allergy* **52**, 52-56; discussion 57-58.
- Dick CA, Singh P, Daniels M, Evansky P, Becker S & Gilmour MI. (2003). Murine pulmonary inflammatory responses following instillation of size-fractionated ambient particulate matter. *J Toxicol Environ Health A* **66**, 2193-2207.
- Dickinson DA, Iles KE, Watanabe N, Iwamoto T, Zhang H, Krzywanski DM & Forman HJ. (2002). 4-hydroxynonenal induces glutamate cysteine ligase through JNK in HBE1 cells. *Free Radic Biol Med* **33**, 974.
- Dinarello CA. (1994). The interleukin-1 family: 10 years of discovery. *Faseb J* **8**, 1314-1325.
- Dinarello CA. (1996). Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood* **87**, 2095-2147.
- Dinarello CA. (2002). The IL-1 family and inflammatory diseases. *Clin Exp Rheumatol* **20**, S1-13.
- Dockery DW, Pope CA, 3rd, Xu X, Spengler JD, Ware JH, Fay ME, Ferris BG, Jr. & Speizer FE. (1993). An association between air pollution and mortality in six U.S. cities. *N Engl J Med* **329**, 1753-1759.
- Dominici F, McDermott A, Daniels M, Zeger SL & Samet JM. (2005). Revised analyses of the National Morbidity, Mortality, and Air Pollution Study: mortality among residents of 90 cities. *J Toxicol Environ Health A* **68**, 1071-1092.
- Donaldson K & Stone V. (2003). Current hypotheses on the mechanisms of toxicity of ultrafine particles. *Ann Ist Super Sanita* **39**, 405-410.
- Dye JA, Lehmann JR, McGee JK, Winsett DW, Ledbetter AD, Everitt JI, Ghio AJ & Costa DL. (2001). Acute pulmonary toxicity of particulate matter filter extracts in rats: coherence with epidemiologic studies in Utah Valley residents. *Environ Health Perspect* **109 Suppl 3**, 395-403.
- Enoiu M, Herber R, Wennig R, Marson C, Bodaud H, Leroy P, Mitrea N, Siest G & Wellman M. (2002). gamma-Glutamyltranspeptidase-dependent metabolism of 4-hydroxynonenal-glutathione conjugate. *Arch Biochem Biophys* **397**, 18-27.
- Esterbauer H, Schaur RJ & Zollner H. (1991). Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med* **11**, 81-128.

- Favier A. (2003). Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *l'actualité chimique*, 108-115.
- Forman HJ, Fukuto JM, Miller T, Zhang H, Rinna A & Levy S. (2008). The chemistry of cell signaling by reactive oxygen and nitrogen species and 4-hydroxynonenal. *Arch Biochem Biophys* **477**, 183-195.
- Forman HJ, Torres M & Fukuto J. (2002). Redox signaling. *Mol Cell Biochem* **234-235**, 49-62.
- Foster JR. (2001). The functions of cytokines and their uses in toxicology. *Int J Exp Pathol* **82**, 171-192.
- Foucaud L, Wilson MR, Brown DM & Stone V. (2007). Measurement of reactive species production by nanoparticles prepared in biologically relevant media. *Toxicol Lett* **174**, 1-9.
- Frampton MW, Ghio AJ, Samet JM, Carson JL, Carter JD & Devlin RB. (1999). Effects of aqueous extracts of PM(10) filters from the Utah valley on human airway epithelial cells. *Am J Physiol* **277**, L960-967.
- Gadina M, Ferguson PR & Johnston JA. (2003). New interleukins: are there any more? *Curr Opin Infect Dis* **16**, 211-217.
- Garcon G, Dagher Z, Zerimech F, Ledoux F, Courcot D, Aboukais A, Puskaric E & Shirali P. (2006). Dunkerque City air pollution particulate matter-induced cytotoxicity, oxidative stress and inflammation in human epithelial lung cells (L132) in culture. *Toxicol In Vitro* **20**, 519-528.
- Geiser M, Rothen-Rutishauser B, Kapp N, Schurch S, Kreyling W, Schulz H, Semmler M, Im Hof V, Heyder J & Gehr P. (2005). Ultrafine particles cross cellular membranes by nonphagocytic mechanisms in lungs and in cultured cells. *Environ Health Perspect* **113**, 1555-1560.
- Geng H, Meng Z & Zhang Q. (2005). Effects of blowing sand fine particles on plasma membrane permeability and fluidity, and intracellular calcium levels of rat alveolar macrophages. *Toxicol Lett* **157**, 129-137.
- Ghio AJ. (2004). Biological effects of Utah Valley ambient air particles in humans: a review. *J Aerosol Med* **17**, 157-164.
- Ghio AJ & Devlin RB. (2001). Inflammatory lung injury after bronchial instillation of air pollution particles. *Am J Respir Crit Care Med* **164**, 704-708.
- Ghio AJ, Hall A, Bassett MA, Cascio WE & Devlin RB. (2003). Exposure to concentrated ambient air particles alters hematologic indices in humans. *Inhal Toxicol* **15**, 1465-1478.

- Ghio AJ, Kim C & Devlin RB. (2000). Concentrated ambient air particles induce mild pulmonary inflammation in healthy human volunteers. *Am J Respir Crit Care Med* **162**, 981-988.
- Gilmour PS, Beswick PH, Brown DM & Donaldson K. (1995). Detection of surface free radical activity of respirable industrial fibres using supercoiled phi X174 RF1 plasmid DNA. *Carcinogenesis* **16**, 2973-2979.
- Gilmour PS, Ziesenis A, Morrison ER, Vickers MA, Drost EM, Ford I, Karg E, Mossa C, Schroepel A, Ferron GA, Heyder J, Greaves M, MacNee W & Donaldson K. (2004). Pulmonary and systemic effects of short-term inhalation exposure to ultrafine carbon black particles. *Toxicol Appl Pharmacol* **195**, 35-44.
- Gold DR, Litonjua A, Schwartz J, Lovett E, Larson A, Nearing B, Allen G, Verrier M, Cherry R & Verrier R. (2000). Ambient pollution and heart rate variability. *Circulation* **101**, 1267-1273.
- Gonzalez-Flecha B. (2004). Oxidant mechanisms in response to ambient air particles. *Mol Aspects Med* **25**, 169-182.
- Gordon S. (2003). Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* **3**, 23-35.
- Gruys E, Toussaint MJ, Niewold TA & Koopmans SJ. (2005). Acute phase reaction and acute phase proteins. *J Zhejiang Univ Sci B* **6**, 1045-1056.
- Hamilton JA. (2008). Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity. *Nat Rev Immunol* **8**, 533-544.
- Hamilton RF, Jr., Li L, Eschenbacher WL, Szweda L & Holian A. (1998). Potential involvement of 4-hydroxynonenal in the response of human lung cells to ozone. *Am J Physiol* **274**, L8-16.
- Harrison RM, Smith DJ & Kibble AJ. (2004). What is responsible for the carcinogenicity of PM2.5? *Occup Environ Med* **61**, 799-805.
- Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Muller-Newen G & Schaper F. (2003). Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J* **374**, 1-20.
- Heinrich PC, Castell JV & Andus T. (1990). Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem J* **265**, 621-636.
- Hervé-Bazin B. (2007). *Les Nanoparticules*. EDP Sciences, Les Ulis.
- Hetland RB, Schwarze PE, Johansen BV, Myran T, Uthus N & Refsnes M. (2001). Silica-induced cytokine release from A549 cells: importance of surface area versus size. *Hum Exp Toxicol* **20**, 46-55.

- Hiura TS, Kaszubowski MP, Li N & Nel AE. (1999). Chemicals in diesel exhaust particles generate reactive oxygen radicals and induce apoptosis in macrophages. *J Immunol* **163**, 5582-5591.
- Hoffmann B, Moebus S, Mohlenkamp S, Stang A, Lehmann N, Dragano N, Schmermund A, Memmesheimer M, Mann K, Erbel R & Jockel KH. (2007). Residential exposure to traffic is associated with coronary atherosclerosis. *Circulation* **116**, 489-496.
- Holgate ST, Devlin RB, Wilson SJ & Frew AJ. (2003). Health effects of acute exposure to air pollution. Part II: Healthy subjects exposed to concentrated ambient particles. *Res Rep Health Eff Inst*, 31-50; discussion 51-67.
- Huang NH, Wang Q & Xu DQ. (2008). Immunological effect of PM_{2.5} on cytokine production in female Wistar rats. *Biomed Environ Sci* **21**, 63-68.
- Hutchison GR, Brown DM, Hibbs LR, Heal MR, Donaldson K, Maynard RL, Monaghan M, Nicholl A & Stone V. (2005). The effect of refurbishing a UK steel plant on PM₁₀ metal composition and ability to induce inflammation. *Respir Res* **6**, 43.
- Iles KE, Dickinson DA, Wigley AF, Welty NE, Blank V & Forman HJ. (2005). HNE increases HO-1 through activation of the ERK pathway in pulmonary epithelial cells. *Free Radic Biol Med* **39**, 355-364.
- Imrich A, Ning Y & Kobzik L. (2000). Insoluble components of concentrated air particles mediate alveolar macrophage responses in vitro. *Toxicol Appl Pharmacol* **167**, 140-150.
- Imrich A, Ning Y, Lawrence J, Coull B, Gitin E, Knutson M & Kobzik L. (2006). Alveolar macrophage cytokine response to air pollution particles: Oxidant mechanisms. *Toxicol Appl Pharmacol*.
- Jakab GJ, Risby TH, Sehnert SS, Hmieleski RR & Gilmour MI. (1990). Suppression of alveolar macrophage membrane-receptor-mediated phagocytosis by model particle-adsorbate complexes: physicochemical moderators of uptake. *Environ Health Perspect* **89**, 169-174.
- Jalava PI, Salonen RO, Halinen AI, Penttinen P, Pennanen AS, Sillanpaa M, Sandell E, Hillamo R & Hirvonen MR. (2006). In vitro inflammatory and cytotoxic effects of size-segregated particulate samples collected during long-range transport of wildfire smoke to Helsinki. *Toxicol Appl Pharmacol* **215**, 341-353.
- Jauraud MC & Lévy F. (1999). Effets cellulaires et moléculaires de l'amiante. *Med Sc* **15**, 1370-1378.
- Jeffery PK & Li D. (1997). Airway mucosa: secretory cells, mucus and mucin genes. *Eur Respir J* **10**, 1655-1662.
- Kawai T & Akira S. (2006). TLR signaling. *Cell Death Differ* **13**, 816-825.
- Kelly FJ. (1999). Gluthathione: in defence of the lung. *Food Chem Toxicol* **37**, 963-966.

- Kelly FJ. (2003). Oxidative stress: its role in air pollution and adverse health effects. *Occup Environ Med* **60**, 612-616.
- Kim CS & Kang TC. (1997). Comparative measurement of lung deposition of inhaled fine particles in normal subjects and patients with obstructive airway disease. *Am J Respir Crit Care Med* **155**, 899-905.
- Klegeris A, Bissonnette CJ & McGeer PL. (2003). Reduction of human monocytic cell neurotoxicity and cytokine secretion by ligands of the cannabinoid-type CB2 receptor. *Br J Pharmacol* **139**, 775-786.
- Knuckles TL & Dreher KL. (2007). Fine oil combustion particle bioavailable constituents induce molecular profiles of oxidative stress, altered function, and cellular injury in cardiomyocytes. *J Toxicol Environ Health A* **70**, 1824-1837.
- Kobach A, Totlandsdal AI, Lag M, Refsnes M & Schwarze PE. (2008). Differential binding of cytokines to environmentally relevant particles: a possible source for misinterpretation of in vitro results? *Toxicol Lett* **176**, 131-137.
- Koike E & Kobayashi T. (2006). Chemical and biological oxidative effects of carbon black nanoparticles. *Chemosphere* **65**, 946-951.
- Kumagai Y, Arimoto T, Shinyashiki M, Shimojo N, Nakai Y, Yoshikawa T & Sagai M. (1997). Generation of reactive oxygen species during interaction of diesel exhaust particle components with NADPH-cytochrome P450 reductase and involvement of the bioactivation in the DNA damage. *Free Radic Biol Med* **22**, 479-487.
- Kunkel SL, Standiford T, Kasahara K & Strieter RM. (1991). Interleukin-8 (IL-8): the major neutrophil chemotactic factor in the lung. *Exp Lung Res* **17**, 17-23.
- Kunzli N, Jerrett M, Mack WJ, Beckerman B, LaBree L, Gilliland F, Thomas D, Peters J & Hodis HN. (2005). Ambient air pollution and atherosclerosis in Los Angeles. *Environ Health Perspect* **113**, 201-206.
- Laden F, Schwartz J, Speizer FE & Dockery DW. (2006). Reduction in fine particulate air pollution and mortality: Extended follow-up of the Harvard Six Cities study. *Am J Respir Crit Care Med* **173**, 667-672.
- Lambrecht BN. (2006). Alveolar macrophage in the driver's seat. *Immunity* **24**, 366-368.
- Li L, Hamilton RF, Jr., Kirichenko A & Holian A. (1996). 4-Hydroxynonenal-induced cell death in murine alveolar macrophages. *Toxicol Appl Pharmacol* **139**, 135-143.
- Li N & Nel AE. (2006). Role of the Nrf2-mediated signaling pathway as a negative regulator of inflammation: implications for the impact of particulate pollutants on asthma. *Antioxid Redox Signal* **8**, 88-98.

- Li N, Sioutas C, Cho A, Schmitz D, Misra C, Sempf J, Wang M, Oberley T, Froines J & Nel A. (2003). Ultrafine particulate pollutants induce oxidative stress and mitochondrial damage. *Environ Health Perspect* **111**, 455-460.
- Li N, Xia T & Nel AE. (2008). The role of oxidative stress in ambient particulate matter-induced lung diseases and its implications in the toxicity of engineered nanoparticles. *Free Radic Biol Med* **44**, 1689-1699.
- Li XY, Brown D, Smith S, MacNee W & Donaldson K. (1999). Short-term inflammatory responses following intratracheal instillation of fine and ultrafine carbon black in rats. *Inhal Toxicol* **11**, 709-731.
- Li XY, Gilmour PS, Donaldson K & MacNee W. (1997). In vivo and in vitro proinflammatory effects of particulate air pollution (PM10). *Environ Health Perspect* **105 Suppl 5**, 1279-1283.
- Long JF, Waldman WJ, Kristovich R, Williams M, Knight D & Dutta PK. (2005). Comparison of ultrastructural cytotoxic effects of carbon and carbon/iron particulates on human monocyte-derived macrophages. *Environ Health Perspect* **113**, 170-174.
- Lucey DR, Clerici M & Shearer GM. (1996). Type 1 and type 2 cytokine dysregulation in human infectious, neoplastic, and inflammatory diseases. *Clin Microbiol Rev* **9**, 532-562.
- Lundborg M, Bouhafs R, Gerde P, Ewing P, Camner P, Dahlen SE & Jarstrand C. (2007). Aggregates of ultrafine particles modulate lipid peroxidation and bacterial killing by alveolar macrophages. *Environ Res* **104**, 250-257.
- Ma J, Chen T, Mandelin J, Ceponis A, Miller NE, Hukkanen M, Ma GF & Kontinen YT. (2003). Regulation of macrophage activation. *Cell Mol Life Sci* **60**, 2334-2346.
- MacNee W & Donaldson K. (2000). Exacerbations of COPD: environmental mechanisms. *Chest* **117**, 390S-397S.
- MacNee W & Donaldson K. (2003). Mechanism of lung injury caused by PM10 and ultrafine particles with special reference to COPD. *Eur Respir J Suppl* **40**, 47s-51s.
- Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A & Locati M. (2004). The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol* **25**, 677-686.
- Marano F, Aubier M, Brochard P, de Blay F, Marthan R, Nemery B, Nemmar A & Wallaërt B. (2004). Impacts des particules atmosphériques sur la santé : aspects toxicologiques. *Pollution atmosphérique* **3**, 87-96.
- Masclat P & Marchand N. (2004). Méthodes de prélèvement et d'analyse des aérosols. *Techniques de l'Ingénieur* **P4 040**.

- Mathé F, Houdret JL, Galloo JC & Guillermo R. (1998). La mesure des particules en suspension dans l'air ambiant : Applications dans les réseaux français de surveillance de la qualité de l'air. *Analisis Magazine* **26**, 27-33.
- Matsumoto K & Kanmatsuse K. (2000). Interleukin-18 and interleukin-12 synergize to stimulate the production of vascular permeability factor by T lymphocytes in normal subjects and in patients with minimal-change nephrotic syndrome. *Nephron* **85**, 127-133.
- Mazzarella G, Ferraraccio F, Prati MV, Annunziata S, Bianco A, Mezzogiorno A, Liguori G, Angelillo IF & Cazzola M. (2007). Effects of diesel exhaust particles on human lung epithelial cells: an in vitro study. *Respir Med* **101**, 1155-1162.
- Mege JL, Meghari S, Honstetter A, Capo C & Raoult D. (2006). The two faces of interleukin 10 in human infectious diseases. *Lancet Infect Dis* **6**, 557-569.
- Mitschik S, Schierl R, Nowak D & Jorres RA. (2008). Effects of particulate matter on cytokine production in vitro: a comparative analysis of published studies. *Inhal Toxicol* **20**, 399-414.
- Miyajima A, Kitamura T, Harada N, Yokota T & Arai K. (1992). Cytokine receptors and signal transduction. *Annu Rev Immunol* **10**, 295-331.
- Monn C & Becker S. (1999). Cytotoxicity and induction of proinflammatory cytokines from human monocytes exposed to fine (PM_{2.5}) and coarse particles (PM_{10-2.5}) in outdoor and indoor air. *Toxicol Appl Pharmacol* **155**, 245-252.
- Monteiller C, Tran L, MacNee W, Faux S, Jones A, Miller B & Donaldson K. (2007). The pro-inflammatory effects of low-toxicity low-solubility particles, nanoparticles and fine particles, on epithelial cells in vitro: the role of surface area. *Occup Environ Med* **64**, 609-615.
- Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL & O'Garra A. (2001). Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* **19**, 683-765.
- Mosser DM. (2003). The many faces of macrophage activation. *J Leukoc Biol* **73**, 209-212.
- Mukaida N. (2003). Pathophysiological roles of interleukin-8/CXCL8 in pulmonary diseases. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **284**, L566-577.
- Mundandhara SD, Becker S & Madden MC. (2006). Effects of diesel exhaust particles on human alveolar macrophage ability to secrete inflammatory mediators in response to lipopolysaccharide. *Toxicol In Vitro* **20**, 614-624.
- Murphy PM, Baggiolini M, Charo IF, Hebert CA, Horuk R, Matsushima K, Miller LH, Oppenheim JJ & Power CA. (2000). International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol Rev* **52**, 145-176.
- Murphy SA, BeruBe KA, Pooley FD & Richards RJ. (1998). The response of lung epithelium to well characterised fine particles. *Life Sci* **62**, 1789-1799.

- Nathan CF. (1987). Secretory products of macrophages. *J Clin Invest* **79**, 319-326.
- Nel AE, Diaz-Sanchez D & Li N. (2001). The role of particulate pollutants in pulmonary inflammation and asthma: evidence for the involvement of organic chemicals and oxidative stress. *Curr Opin Pulm Med* **7**, 20-26.
- Niedbala W, Wei XQ, Cai B, Hueber AJ, Leung BP, McInnes IB & Liew FY. (2007). IL-35 is a novel cytokine with therapeutic effects against collagen-induced arthritis through the expansion of regulatory T cells and suppression of Th17 cells. *Eur J Immunol* **37**, 3021-3029.
- O'Neill MS, Veves A, Zanobetti A, Sarnat JA, Gold DR, Economides PA, Horton ES & Schwartz J. (2005). Diabetes enhances vulnerability to particulate air pollution-associated impairment in vascular reactivity and endothelial function. *Circulation* **111**, 2913-2920.
- O'Shea JJ, Gadina M & Schreiber RD. (2002). Cytokine signaling in 2002: new surprises in the Jak/Stat pathway. *Cell* **109 Suppl**, S121-131.
- Oberdorster G, Oberdorster E & Oberdorster J. (2005). Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Perspect* **113**, 823-839.
- OMS. (2005). La pollution atmosphérique par les particules en suspension : ses effets sur la santé (Aide-mémoire EURO 04/05). *Organisation Mondiale de la Santé*.
- OMS. (2006). Lignes directrices OMS relatives à la qualité de l'air : particules, ozone, dioxyde d'azote et dioxyde de soufre. Mise à jour mondiale 2005. Synthèse de l'évaluation des risques, pp. 21. *Organisation Mondiale de la Santé*.
- Ostro B, Broadwin R, Green S, Feng WY & Lipsett M. (2006). Fine particulate air pollution and mortality in nine California counties: results from CALFINE. *Environ Health Perspect* **114**, 29-33.
- Pacheco KA, Tarkowski M, Sterritt C, Negri J, Rosenwasser LJ & Borish L. (2001). The influence of diesel exhaust particles on mononuclear phagocytic cell-derived cytokines: IL-10, TGF-beta and IL-1 beta. *Clin Exp Immunol* **126**, 374-383.
- Paris S, Chambard JC & Pouyssegur J. (1988). Tyrosine kinase-activating growth factors potentiate thrombin- and AIF4- -induced phosphoinositide breakdown in hamster fibroblasts. Evidence for positive cross-talk between the two mitogenic signaling pathways. *J Biol Chem* **263**, 12893-12900.
- Park EK, Jung HS, Yang HI, Yoo MC, Kim C & Kim KS. (2007). Optimized THP-1 differentiation is required for the detection of responses to weak stimuli. *Inflamm Res* **56**, 45-50.

- Payne JP, Kemp SJ, Dewar A, Goldstraw P, Kendall M, Chen LC & Tetley TD. (2004). Effects of airborne World Trade Center dust on cytokine release by primary human lung cells in vitro. *J Occup Environ Med* **46**, 420-427.
- Penning TM, Burczynski ME, Hung CF, McCoull KD, Palackal NT & Tsuruda LS. (1999). Dihydrodiol dehydrogenases and polycyclic aromatic hydrocarbon activation: generation of reactive and redox active o-quinones. *Chem Res Toxicol* **12**, 1-18.
- Person A & Tymen G. (2005). Mesurage des particules en suspension dans l'air en relation avec la santé. *Pollution atmosphérique*, 271-285.
- Poli G & Schaur RJ. (2000). 4-Hydroxynonenal in the pathomechanisms of oxidative stress. *IUBMB Life* **50**, 315-321.
- Poma A, Limongi T, Pisani C, Granato V & Picozzi P. (2006). Genotoxicity induced by fine urban air particulate matter in the macrophages cell line RAW 264.7. *Toxicol In Vitro* **20**, 1023-1029.
- Pope CA, 3rd, Burnett RT, Thun MJ, Calle EE, Krewski D, Ito K & Thurston GD. (2002). Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long-term exposure to fine particulate air pollution. *Jama* **287**, 1132-1141.
- Pope CA, 3rd, Burnett RT, Thurston GD, Thun MJ, Calle EE, Krewski D & Godleski JJ. (2004). Cardiovascular mortality and long-term exposure to particulate air pollution: epidemiological evidence of general pathophysiological pathways of disease. *Circulation* **109**, 71-77.
- Pope CA, 3rd & Dockery DW. (2006). Health effects of fine particulate air pollution: lines that connect. *J Air Waste Manag Assoc* **56**, 709-742.
- Pope CA, 3rd, Thun MJ, Namboodiri MM, Dockery DW, Evans JS, Speizer FE & Heath CW, Jr. (1995). Particulate air pollution as a predictor of mortality in a prospective study of U.S. adults. *Am J Respir Crit Care Med* **151**, 669-674.
- Porcheray F, Viaud S, Rimaniol AC, Leone C, Samah B, Dereuddre-Bosquet N, Dormont D & Gras G. (2005). Macrophage activation switching: an asset for the resolution of inflammation. *Clin Exp Immunol* **142**, 481-489.
- Pozzi R, De Berardis B, Paoletti L & Guastadisegni C. (2003). Inflammatory mediators induced by coarse (PM_{2.5-10}) and fine (PM_{2.5}) urban air particles in RAW 264.7 cells. *Toxicology* **183**, 243-254.
- Pozzi R, De Berardis B, Paoletti L & Guastadisegni C. (2005). Winter urban air particles from Rome (Italy): effects on the monocytic-macrophagic RAW 264.7 cell line. *Environ Res* **99**, 344-354.
- Probst N, Grivei E, Minet P, Fockedey E & Van Lierde A. (2004). Metal coated carbon black, carbon black compositions and their applications. *World Intellectual Property Organization*.

- Qiu XB & Cadenas E. (1997). The role of NAD(P)H:quinone oxidoreductase in quinone-mediated p21 induction in human colon carcinoma cells. *Arch Biochem Biophys* **346**, 241-251.
- Quisefit JP & Gaudichet A. (1998). Prélèvement des aérosols atmosphériques et analyses inorganiques. *Analisis Magazine* **26**, 21-27.
- Raetz CR & Whitfield C. (2002). Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu Rev Biochem* **71**, 635-700.
- Refsnes M, Hetland RB, Ovrevik J, Sundfor I, Schwarze PE & Lag M. (2006). Different particle determinants induce apoptosis and cytokine release in primary alveolar macrophage cultures. *Part Fibre Toxicol* **3**, 10.
- Richert P. (2008). Chantier n°33 du Grenelle de l'Environnement - Rapport Air et Atmosphère.
- Rietschel ET, Brade H, Holst O, Brade L, Muller-Loennies S, Mamat U, Zahringer U, Beckmann F, Seydel U, Brandenburg K, Ulmer AJ, Mattern T, Heine H, Schletter J, Loppnow H, Schonbeck U, Flad HD, Hauschildt S, Schade UF, Di Padova F, Kusumoto S & Schumann RR. (1996). Bacterial endotoxin: Chemical constitution, biological recognition, host response, and immunological detoxification. *Curr Top Microbiol Immunol* **216**, 39-81.
- Risom L, Moller P & Loft S. (2005). Oxidative stress-induced DNA damage by particulate air pollution. *Mutat Res* **592**, 119-137.
- Rodriguez S, Querol X, Alastuey A, Viana MM, Alarcon M, Mantilla E & Ruiz CR. (2004). Comparative PM10-PM2.5 source contribution study at rural, urban and industrial sites during PM episodes in Eastern Spain. *Sci Total Environ* **328**, 95-113.
- Ruminy P, Gangneux C, Claeysens S, Scotte M, Daveau M & Salier JP. (2001). Gene transcription in hepatocytes during the acute phase of a systemic inflammation: from transcription factors to target genes. *Inflamm Res* **50**, 383-390.
- Russell DG. (2007). Who puts the tubercle in tuberculosis? *Nat Rev Microbiol* **5**, 39-47.
- Ryno M, Rantanen L, Papaioannou E, Konstandopoulos AG, Koskentalo T & Savela K. (2006). Comparison of pressurized fluid extraction, Soxhlet extraction and sonication for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in urban air and diesel exhaust particulate matter. *J Environ Monit* **8**, 488-493.
- Saber AT, Jacobsen NR, Bornholdt J, Kjaer SL, Dybdahl M, Risom L, Loft S, Vogel U & Wallin H. (2006). Cytokine expression in mice exposed to diesel exhaust particles by inhalation. Role of tumor necrosis factor. *Part Fibre Toxicol* **3**, 4.
- Sagai M, Saito H, Ichinose T, Kodama M & Mori Y. (1993). Biological effects of diesel exhaust particles. I. In vitro production of superoxide and in vivo toxicity in mouse. *Free Radic Biol Med* **14**, 37-47.

- Saldiva PH, Clarke RW, Coull BA, Stearns RC, Lawrence J, Murthy GG, Diaz E, Koutrakis P, Suh H, Tsuda A & Godleski JJ. (2002). Lung inflammation induced by concentrated ambient air particles is related to particle composition. *Am J Respir Crit Care Med* **165**, 1610-1617.
- Salvi S, Blomberg A, Rudell B, Kelly F, Sandstrom T, Holgate ST & Frew A. (1999). Acute inflammatory responses in the airways and peripheral blood after short-term exposure to diesel exhaust in healthy human volunteers. *Am J Respir Crit Care Med* **159**, 702-709.
- Salvi S & Holgate ST. (1999). Mechanisms of particulate matter toxicity. *Clin Exp Allergy* **29**, 1187-1194.
- Schafer FQ & Buettner GR. (2001). Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic Biol Med* **30**, 1191-1212.
- Schaumann F, Borm PJ, Herbrich A, Knoch J, Pitz M, Schins RP, Luetting B, Hohlfeld JM, Heinrich J & Krug N. (2004). Metal-rich ambient particles (particulate matter 2.5) cause airway inflammation in healthy subjects. *Am J Respir Crit Care Med* **170**, 898-903.
- Schaur RJ. (2003). Basic aspects of the biochemical reactivity of 4-hydroxynonenal. *Mol Aspects Med* **24**, 149-159.
- Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T & Hume DA. (2004). Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol* **75**, 163-189.
- Schwartz J. (2001). Is there harvesting in the association of airborne particles with daily deaths and hospital admissions? *Epidemiology* **12**, 55-61.
- Schwarze PE, Ovrevik J, Lag M, Refsnes M, Nafstad P, Hetland RB & Dybing E. (2006). Particulate matter properties and health effects: consistency of epidemiological and toxicological studies. *Hum Exp Toxicol* **25**, 559-579.
- Siegel PD, Saxena RK, Saxena QB, Ma JK, Ma JY, Yin XJ, Castranova V, Al-Humadi N & Lewis DM. (2004). Effect of diesel exhaust particulate (DEP) on immune responses: contributions of particulate versus organic soluble components. *J Toxicol Environ Health A* **67**, 221-231.
- Sies H. (1991). Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am J Med* **91**, 31S-38S.
- Simkhovich BZ, Kleinman MT & Kloner RA. (2008). Air pollution and cardiovascular injury epidemiology, toxicology, and mechanisms. *J Am Coll Cardiol* **52**, 719-726.
- Singh S, Shi T, Duffin R, Albrecht C, van Berlo D, Hohr D, Fubini B, Martra G, Fenoglio I, Borm PJ & Schins RP. (2007). Endocytosis, oxidative stress and IL-8 expression in human lung epithelial cells upon treatment with fine and ultrafine TiO₂: role of the

- specific surface area and of surface methylation of the particles. *Toxicol Appl Pharmacol* **222**, 141-151.
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ & Klenk DC. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* **150**, 76-85.
- Sorensen M, Schins RP, Hertel O & Loft S. (2005). Transition metals in personal samples of PM_{2.5} and oxidative stress in human volunteers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **14**, 1340-1343.
- Soukup JM & Becker S. (2001). Human alveolar macrophage responses to air pollution particulates are associated with insoluble components of coarse material, including particulate endotoxin. *Toxicol Appl Pharmacol* **171**, 20-26.
- Squadrito GL, Cueto R, Dellinger B & Pryor WA. (2001). Quinoid redox cycling as a mechanism for sustained free radical generation by inhaled airborne particulate matter. *Free Radic Biol Med* **31**, 1132-1138.
- Stone V, Shaw J, Brown DM, MacNee W, Faux SP & Donaldson K. (1998). The role of oxidative stress in the prolonged inhibitory effect of ultrafine carbon black on epithelial cell function. *Toxicol In Vitro* **12**, 649-659.
- Stone V, Tuinman M, Vamvakopoulos JE, Shaw J, Brown D, Petterson S, Faux SP, Borm P, MacNee W, Michaelangeli F & Donaldson K. (2000). Increased calcium influx in a monocytic cell line on exposure to ultrafine carbon black. *Eur Respir J* **15**, 297-303.
- Stout RD & Suttles J. (2004). Functional plasticity of macrophages: reversible adaptation to changing microenvironments. *J Leukoc Biol* **76**, 509-513.
- Sun Q, Jones K, McClure B, Cambareri B, Zacharakis B, Iversen PO, Stomski F, Woodcock JM, Bagley CJ, D'Andrea R & Lopez AF. (1999). Simultaneous antagonism of interleukin-5, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and interleukin-3 stimulation of human eosinophils by targetting the common cytokine binding site of their receptors. *Blood* **94**, 1943-1951.
- Sunyer J & Basagana X. (2001). Particles, and not gases, are associated with the risk of death in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Int J Epidemiol* **30**, 1138-1140.
- Tao F, Gonzalez-Flecha B & Kobzik L. (2003). Reactive oxygen species in pulmonary inflammation by ambient particulates. *Free Radic Biol Med* **35**, 327-340.
- Thannickal VJ & Fanburg BL. (2000). Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **279**, L1005-1028.
- Tilg H, Trehu E, Atkins MB, Dinarello CA & Mier JW. (1994). Interleukin-6 (IL-6) as an anti-inflammatory cytokine: induction of circulating IL-1 receptor antagonist and soluble tumor necrosis factor receptor p55. *Blood* **83**, 113-118.

- Torres M & Forman HJ. (1999). Activation of several MAP kinases upon stimulation of rat alveolar macrophages: role of the NADPH oxidase. *Arch Biochem Biophys* **366**, 231-239.
- Tracey D, Klareskog L, Sasso EH, Salfeld JG & Tak PP. (2008). Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: a comprehensive review. *Pharmacol Ther* **117**, 244-279.
- Tracey KJ & Cerami A. (1993). Tumor necrosis factor, other cytokines and disease. *Annu Rev Cell Biol* **9**, 317-343.
- Trinchieri G. (1995). Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Annu Rev Immunol* **13**, 251-276.
- Trinchieri G, Wysocka M, D'Andrea A, Rengaraju M, Aste-Amezaga M, Kubin M, Valiante NM & Chehimi J. (1992). Natural killer cell stimulatory factor (NKSF) or interleukin-12 is a key regulator of immune response and inflammation. *Prog Growth Factor Res* **4**, 355-368.
- Tsuchiya S, Yamabe M, Yamaguchi Y, Kobayashi Y, Konno T & Tada K. (1980). Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int J Cancer* **26**, 171-176.
- Uchida K. (2003). 4-Hydroxy-2-nonenal: a product and mediator of oxidative stress. *Prog Lipid Res* **42**, 318-343.
- Valavanidis A, Fiotakis K & Vlachogianni T. (2008). Airborne particulate matter and human health: toxicological assessment and importance of size and composition of particles for oxidative damage and carcinogenic mechanisms. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev* **26**, 339-362.
- Valavanidis A, Vlahoyianni T & Fiotakis K. (2005). Comparative study of the formation of oxidative damage marker 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) adduct from the nucleoside 2'-deoxyguanosine by transition metals and suspensions of particulate matter in relation to metal content and redox reactivity. *Free Radic Res* **39**, 1071-1081.
- van Eeden SF, Tan WC, Suwa T, Mukae H, Terashima T, Fujii T, Qui D, Vincent R & Hogg JC. (2001). Cytokines involved in the systemic inflammatory response induced by exposure to particulate matter air pollutants (PM(10)). *Am J Respir Crit Care Med* **164**, 826-830.
- Vassilakos C, Saraga D, Maggos T, Michopoulos J, Pateraki S & Helmis CG. (2005). Temporal variations of PM2.5 in the ambient air of a suburban site in Athens, Greece. *Sci Total Environ* **349**, 223-231.
- Vincent R, Goegan P, Johnson G, Brook JR, Kumarathasan P, Bouthillier L & Burnett RT. (1997). Regulation of promoter-CAT stress genes in HepG2 cells by suspensions of particles from ambient air. *Fundam Appl Toxicol* **39**, 18-32.

- Vogel CF, Sciuillo E, Wong P, Kuzmicky P, Kado N & Matsumura F. (2005). Induction of proinflammatory cytokines and C-reactive protein in human macrophage cell line U937 exposed to air pollution particulates. *Environ Health Perspect* **113**, 1536-1541.
- Wichmann HE. (2007). Diesel exhaust particles. *Inhal Toxicol* **19 Suppl 1**, 241-244.
- Wilson MR, Lightbody JH, Donaldson K, Sales J & Stone V. (2002). Interactions between ultrafine particles and transition metals in vivo and in vitro. *Toxicol Appl Pharmacol* **184**, 172-179.
- Xia T, Korge P, Weiss JN, Li N, Venkatesen MI, Sioutas C & Nel A. (2004). Quinones and aromatic chemical compounds in particulate matter induce mitochondrial dysfunction: implications for ultrafine particle toxicity. *Environ Health Perspect* **112**, 1347-1358.
- Yang HM, Barger MW, Castranova V, Ma JK, Yang JJ & Ma JY. (1999). Effects of diesel exhaust particles (DEP), carbon black, and silica on macrophage responses to lipopolysaccharide: evidence of DEP suppression of macrophage activity. *J Toxicol Environ Health A* **58**, 261-278.
- Yang HM, Ma JY, Castranova V & Ma JK. (1997). Effects of diesel exhaust particles on the release of interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha from rat alveolar macrophages. *Exp Lung Res* **23**, 269-284.
- Zanobetti A, Canner MJ, Stone PH, Schwartz J, Sher D, Eagan-Bengston E, Gates KA, Hartley LH, Suh H & Gold DR. (2004). Ambient pollution and blood pressure in cardiac rehabilitation patients. *Circulation* **110**, 2184-2189.
- Zanobetti A & Schwartz J. (2001). Are diabetics more susceptible to the health effects of airborne particles? *Am J Respir Crit Care Med* **164**, 831-833.
- Zanobetti A, Schwartz J & Dockery DW. (2000a). Airborne particles are a risk factor for hospital admissions for heart and lung disease. *Environ Health Perspect* **108**, 1071-1077.
- Zanobetti A, Schwartz J & Gold D. (2000b). Are there sensitive subgroups for the effects of airborne particles? *Environ Health Perspect* **108**, 841-845.
- Zarkovic N. (2003). 4-hydroxynonenal as a bioactive marker of pathophysiological processes. *Mol Aspects Med* **24**, 281-291.
- Zhou J, Zhu P, Jiang JL, Zhang Q, Wu ZB, Yao XY, Tang H, Lu N, Yang Y & Chen ZN. (2005). Involvement of CD147 in overexpression of MMP-2 and MMP-9 and enhancement of invasive potential of PMA-differentiated THP-1. *BMC Cell Biol* **6**, 25.

Liste des tableaux et figures

TABLEAUX

Tableau 1 : Caractéristiques des différentes classes de particule.....	18
Tableau 2 : Méthodes de récupération des particules sur les filtres de collecte.....	22
Tableau 3 : Surfaces spécifiques des particules de noir de carbone en fonction de la taille des particules	54
Tableau 4 : Principales espèces réactives de l'oxygène	57
Tableau 5 : Antioxydants contenus dans le surfactant	61
Tableau 6 : Caractéristiques des particules fines et des particules ultrafines.....	70
Tableau 7 : Dilutions optimales des milieux de cultures pour chaque condition expérimentale pour les cellules THP-1 ayant été différenciées pendant 48 heures, pour la détermination des concentrations en cytokines	78
Tableau 8 : Tests de deux protocoles de traitement aux ultrasons pour la récupération des PM _{2,5} sur différents types de filtres	87
Tableau 9 : Bilan de récupération des PM _{2,5} sur les filtres	89
Tableau 10 : Résultats d'analyses en HAP de PM _{2,5} sur filtre	91
Tableau 11 : Résultats d'analyses en métaux de PM _{2,5} sur filtre	90
Tableau 12 : Sécrétion des cytokines inflammatoires par les cellules THP-1 différenciées avec du Phorbol 12-myristate 13-acétate (PMA)	94
Tableau 13 : Effets des PM _{2,5} sur la viabilité des cellules THP-1.....	95
Tableau 14 : Effets des métaux et des particules (CB et ufCB), seules ou dopées avec des métaux, sur la viabilité des cellules THP-1.....	101
Tableau 15 : Effets des HAP et des particules (CB et ufCB), seules ou dopées avec des HAP, sur la viabilité des cellules THP-1.....	112
Tableau 16 : Evaluation de la cytotoxicité par la mesure de l'activité LDH après traitement aux ufCB	122
Tableau 17 : Evaluation de la mortalité par un test d'exclusion au bleu Trypan après traitement aux ufCB	123
Tableau 18 : Effet des particules ufCB sur le glutathion intracellulaire par la mesure du glutathion total (GSX) et du glutathion disulfide (GSSG).....	126
Tableau 19 : Evaluation de la cytotoxicité par la mesure de l'activité LDH après traitement au HNE.....	127
Tableau 20 : Effet du HNE sur le glutathion intracellulaire par la mesure du glutathion total (GSX) et du glutathion disulfide (GSSG)	129

Tableau 21 : Effets des particules, des métaux et des HAP sur la sécrétion des cytokines IL-1 β et IL-8.....	135
--	-----

Tableau 22 : Effets des particules, des métaux et des HAP sur la sécrétion des cytokines IL-1 β , IL-8, IL-6, TNF- α , IL-12 et IL-10 après stimulation par les LPS	138
--	-----

FIGURES

Figure 1 : Photographies en MEB de deux types de filtres.....	20
Figure 2 : Schéma de l'appareil respiratoire	29
Figure 3 : Schéma des différents mécanismes de dépôts des particules inhalées dans les voies respiratoires	31
Figure 4 : Zones de déposition préférentielle des particules en fonction de leur taille au niveau de la zone nasopharyngée, trachéobronchique et alvéolaire	32
Figure 5 : La réaction inflammatoire au niveau pulmonaire.....	39
Figure 6 : Pléiotropisme et redondance des cytokines	43
Figure 7 : Interaction entre l'antigène et le macrophage dans l'initiation et la médiation de l'inflammation ainsi que la réparation tissulaire	45
Figure 8 : Voies de transduction du TLR-4.....	46
Figure 9 : L'IL-1 est un puissant inducteur à l'origine de nombreuses actions biologiques ...	48
Figure 10 : Polarisation de la réponse immunitaire par le jeu de l'IL-10, l'IL-12 et l'IFN- γ ..	51
Figure 11 : Déséquilibre dans la balance redox d'une cellule.....	56
Figure 12 : Origines des différents radicaux libres oxygénés, nitrogénés et des espèces réactives de l'oxygène produits au niveau cellulaire.....	57
Figure 13 : Formule semi-développée du 4-hydroxy-2-nonenal.....	59
Figure 14 : Hiérarchisation des phénomènes biologiques en fonction du ratio GSH/GSSG ...	60
Figure 15 : Cycle redox des quinones et production de ROS	64
Figure 16 : Eléments du Partisol 2000 et de la tête de prélèvement	68
Figure 17 : Photographies d'un même filtre avant (A) et après (B) les deux sonications	69
Figure 18 : Schéma du protocole des expositions <i>in vitro</i>	74
Figure 19 : Protocole ELISA sandwich pour les mesures des concentrations des cytokines étudiées.....	77
Figure 20 : Protocole de marquage d'immunocytologie pour la mise en évidence des adduits aux HNE.....	83
Figure 21 : Concentrations en PM _{2,5} en fonction de la saison (en $\mu\text{g}/\text{m}^3$)	88
Figure 22 : Chromatogramme correspondant à l'analyse par HPLC des échantillons obtenus à partir des particules dopées en pyrène.....	92
Figure 23 : Gamme d'étalonnage du pyrène réalisée par HPLC.....	93
Figure 24 : Effet des PM _{2,5} sur la sécrétion d'IL-1 β par des cellules THP-1 différenciées.....	96
Figure 25 : Effet des PM _{2,5} sur la sécrétion d'IL-8 par des cellules THP-1 différenciées	97
Figure 26 : Effet des PM _{2,5} sur la sécrétion d'IL-6 par des cellules THP-1 différenciées	99
Figure 27 : Effet des PM _{2,5} sur la sécrétion du TNF- α par des cellules THP-1 différenciées.....	100
Figure 28 : Effet des métaux, particules (CB et ufCB) et des particules dopées avec des métaux sur la sécrétion d'IL-1 β par des cellules THP-1 différenciées.	103
Figure 29 : Effet des métaux, particules (CB et ufCB) et des particules dopées avec des métaux sur la sécrétion d'IL-1 β par des cellules THP-1 différenciées en réponse à une stimulation par des LPS.....	104
Figure 30 : Effet des métaux, particules (CB et ufCB) et des particules dopées avec des métaux sur la sécrétion d'IL-8 par des cellules THP-1 différenciées	106

Figure 31 : Effet des métaux, particules (CB et ufCB) et des particules dopées avec des métaux sur la sécrétion d'IL-8 par des cellules THP-1 différenciées en réponse à une stimulation par des LPS.....	107
Figure 32 : Effet des métaux, particules (CB et ufCB) et des particules dopées avec des métaux sur la sécrétion d'IL-6 par des cellules THP-1 différenciées en réponse à une stimulation par des LPS.....	109
Figure 33 : Effet des métaux, particules (CB et ufCB) et des particules dopées avec des métaux sur la sécrétion du TNF- α par des cellules THP-1 différenciées en réponse à une stimulation par des LPS.....	111
Figure 34 : Effet des HAP, particules (CB et ufCB) et des particules dopées avec des HAP sur la sécrétion d'IL-1 β par des cellules THP-1 différenciées.....	113
Figure 35 : Effet des HAP, particules (CB et ufCB) et des particules dopées avec des HAP sur la sécrétion d'IL-1 β par des cellules THP-1 différenciées en réponse à une stimulation par des LPS.....	115
Figure 36 : Effet des HAP, particules (CB et ufCB) et des particules dopées avec des HAP sur la sécrétion d'IL-8 par des cellules THP-1 différenciées.....	116
Figure 37 : Effet des HAP, particules (CB et ufCB) et des particules dopées avec des HAP sur la sécrétion d'IL-8 par des cellules THP-1 différenciées en réponse à une stimulation par des LPS.....	117
Figure 38 : Effet des HAP, particules (CB et ufCB) et des particules dopées avec des HAP sur la sécrétion d'IL-12 par des cellules THP-1 différenciées en réponse à une stimulation par des LPS.....	119
Figure 39 : Effet des HAP, particules (CB et ufCB) et des particules dopées avec des HAP sur la sécrétion d'IL-10 par des cellules THP-1 différenciées en réponse à une stimulation par des LPS.....	120
Figure 40 : Oxydation du DCFH par des particules CB et ufCB en milieu acellulaire	121
Figure 41 : Mise en évidence de la formation d'adduits au HNE par Immunohistochimie, après exposition de cellules THP-1 au HNE ou aux ufCB	124
Figure 42 : Effet du HNE sur l'expression intracellulaire de la HO-1 dans des cellules THP-1 non différenciées	128
Figure 43 : Hypothèse d'interactions possibles des particules avec les voies de transduction du TLR-4.....	140
Figure 44 : Induction du stress oxydant et des cytokines pro-inflammatoires par les particules ultrafines, rôle hypothétique du HNE	142

RESUME

Les particules constituent une composante préoccupante de la pollution atmosphérique, notamment la fraction PM_{2,5} (diamètre aérodynamique inférieur à 2,5 µm) qui est capable de pénétrer dans les poumons jusqu'aux alvéoles pulmonaires. Elle peut être à l'origine de processus d'inflammations entraînant des pathologies respiratoires. Des travaux ont notamment montré que des macrophages alvéolaires exposés à des PM_{2,5} sécrètent des cytokines inflammatoires. L'identification des composés des PM_{2,5} responsables des effets observés, n'est pas encore élucidée. La composition en métaux, et en composés organiques ainsi que les caractéristiques physiques des particules sont des facteurs qui ont tous été proposés comme étant impliqués dans l'induction de la réponse inflammatoire.

L'objectif de cette thèse est d'étudier *in vitro* les effets des particules sur la réponse immunitaire de cellules de type macrophage, la lignée cellulaire THP-1. Les paramètres mesurés sont la sécrétion de cytokines inflammatoires et des marqueurs du stress oxydant en vue d'une explication mécanistique des phénomènes observés. Il a été montré que des PM_{2,5} induisent de façon significative la sécrétion de cytokines IL-1β et IL-8. Des particules de noir de carbone (fines et ultrafines) dopées en métaux n'induisent pas (ou très peu) de sécrétion de cytokines supérieure à celle induite par des particules non dopées. En revanche, l'effet d'hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) adsorbés à la surface de particules dépend de la taille de celles-ci. Ainsi, la comparaison des effets des HAP seuls à ceux adsorbés aux particules a montré que les particules ultrafines potentialisent les effets des HAP. La taille apparaît comme le paramètre le plus déterminant dans la modulation de la sécrétion des cytokines. Les particules ultrafines, caractérisées par un fort potentiel oxydant, induisent également un stress oxydant *in vitro*. Elles génèrent la formation d'un produit de peroxydation lipidique, le HNE qui lui-même est un médiateur du stress oxydant. Cependant, ce composé ne mime pas le stress oxydant induit par les particules ultrafines.

Mots clés : particule, THP-1, cytokine, inflammation, stress oxydant, HNE

ABSTRACT

Particles are concerning constituent of the atmospheric pollution, in particular the PM_{2,5} fraction (aerodynamic diameter lower than 2,5 µm) which is capable of penetrating into lungs up to alveoli. It can be the cause of inflammation processes leading to respiratory diseases. Studies have shown that alveolar macrophages exposed to PM_{2,5} secrete inflammatory cytokines. Identification of PM_{2,5} compounds responsible for observed effects, is not clarified yet. Factors such as the composition in metals and organic compounds, as well as the physical characteristics of particles have all been proposed as being involved in the induction of the inflammatory response.

The aim of this thesis is to study *in vitro* effects of particles on the immune response of macrophages, specifically of the cell line THP-1. The parameters measured are the secretion of inflammatory and oxidative stress markers, in order to give a mechanistic explanation of observed phenomena. It was shown that PM_{2,5} induce in a significant way the secretion of cytokines IL-1β and IL-8. Black carbon particles (fine and ultrafine) coated with metals do not (or very slightly induce) a secretion of cytokines superior to that induced by uncoated particles. On the contrary, effect of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) adsorbed on particles surface depends on its size. Comparison between the effects of PAHs alone and those adsorbed on particles, showed that ultrafine particles potentiate PAH effects. Particle size appears to be the most determining parameter in the modulation of cytokines secretion. Ultrafine particles, characterized by a strong oxidizing potential, also induce an oxidative stress *in vitro*. They lead to the formation of a lipid peroxidation product, the HNE which is a mediator of the oxidative stress. However, HNE does not mime the oxidative stress induced by ultrafine particles.

Keywords: fine particle, THP-1, cytokine, inflammation, oxidative stress, HNE